

**Biblioteca Central
Fac. Cs. Exactas
U.N.L.P.**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**

**Estudio de factores físicos, químicos y biológicos que inciden en la
estabilidad, detección y distribución post mortem de drogas de
relevancia toxicológica.**

Luis Alberto Ferrari

Directora de Tesis: Doctora Leda Giannuzzi

**Trabajo de Tesis para optar al título de Doctor de la Facultad de
Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata**

2005

*“En el atardecer de la vida serás examinado en el amor”
San Juan de la Cruz, Carmelita y Doctor de la Iglesia.*



**Biblioteca Central
Cs. Exactas
U.N.L.P.**

A mis hijos, Luis Nicolás, Miriam Belén y María Eugenia.

A mi esposa Miriam.

A mis padres y a mis hermanos Cristina, Liliana y Daniel.

A mis suegros María Teresa y Nicolás.

Agradecimientos y reconocimientos

A la Profesora Leda Giannuzzi por apoyarme e infundirme aliento para la realización de este arduo trabajo.

A “Tío Dani” por efectuar múltiples advertencias en la consecución del trabajo.

A la Dra. Miriam Arado, quien me ayudó, con sus discusiones, a elaborar las difíciles interpretaciones sobre metabolismo de la cocaína y su relevancia forense.

A César Agustín Nardo, por su ayuda incondicional y su alta capacidad científica.

Al Dr. Gerardo Burton de la Facultad de Ciencia Exactas y Naturales de la UBA por su valiosa colaboración en el análisis del jarabe de propóleos mediante RMN.

Al INBIOLP por haber colaborado en el análisis de lípidos complejos.

A las doctoras Marta Stoichevich de Suñol y Zulema Wamba por su importante actuación en los episodios de intoxicación masivas del dietilenglicol y metanol.

A todos aquellos colegas, amigos y conocidos que de algún modo colaboraron o me apoyaron en todas las etapas para llegar hasta esta instancia, especialmente a la Ing. Susana Stoichevich valiosa analista de nuestro laboratorio y Nicolás Sredcoff un eficiente y sabio técnico.

A mi maestro, Egregio Profesor Emérito Manuel Guatelli, quien inculcó años atrás colocar la tesis como una de las metas de realización profesional.

A mis amigos de toda la vida: Oscar, Juan, Mingo, Ferni, César, Gloria, Rosa, Turca, Liliana, Sany, Sandra y

Al que me ha confortado en todas las fatigas físicas y morales, a ése Buen Maestro tantas veces olvidado y prescindido, esta humilde contribución...

INDICE GENERAL

Pág.

INTRODUCCIÓN.

Capítulo 1. Aspectos generales sobre toxicología forense y postmortem.	1
1.2. Factores involucrados en los fenómenos postmortales	5
Capítulo 2. Toma y remisión de muestras en el análisis toxicológico forense	11
2.1. Información básica que debe consignarse para casos de análisis postmortem.	11
2.2. Recolección y almacenamiento de muestras en el ámbito legal-forense	12
2.2.1. Materiales biológicos que deben remitirse al laboratorio toxicológico clínico y/o forense	12
2.2.1.1. Modo correcto de remitir el material para estudio	12
2.3. Aspectos adicionales relacionados con la toma y conservación de muestras para análisis de drogas en fluidos biológicos	15
Capítulo 3. Analítica toxicológica en los estudios postmortem.	17
3.1. Generalidades	17
3.2 Análisis de matrices biológicas para la detección de drogas	21
3.2.1. Preparación de la muestra	21
3.2.2 Aislamiento del analito	22
3.2.2.1 Métodos para la extracción de tóxicos orgánicos fijos	23
3.2.2.1.1 Método de Stas-Otto-Kohn Abrest	23
3.2.2.1.2. Método de Alan Curry	24
3.2.2.1.3. Método de Daubney- Nickolls	24
3.2.2.1.4. Método de Fassi	24
3.2.2.1.5. Extracción en fase sólida (SPE)	24
3.2.2.1.5.1 Generalidades sobre el proceso de extracción	26
3.2.3 Concentración del extracto	27
3.2.4-Identificación del analito	28
3.2.4.1-Metodología para el análisis de drogas en fluidos biológicos sin orientación	29
3.2.5. Procedimientos de confirmación y cuantificación	33
3.2.5.1- Confirmación y cuantificación por cromatografía de gases	34
3.2.5.2. Confirmación y cuantificación por Cromatografía Líquida	34
3.2.5.2.1. Generalidades	34
3.2.5.2.2. Estado del tema	35

3.2.5.2.3 Tendencias futuras	37
3.3. Rastreo rápido para drogas básicas, ácidas, neutras y sus metabolitos en fluidos biológicos y tejidos por HPLC con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD)	38
Capítulo 4. Toxicología de alcoholes	40
4.1. Generalidades	40
4.2. Alcohol etílico	41
4.2.1. Metabolismo	42
4.2.2. Curvas de absorción-eliminación de etanol en sangre y Cálculos de Alcholemla Retrospectiva	45
4.2.2. Pérdida y producción de etanol durante el resguardo de las muestras	50
4.3. Metanol	51
4.3.1. Generalidades	51
4.3.2 Toxicocinética y manifestaciones clínicas	52
4.3.3 Analítica toxicológica	55
4.4. Glicoles	56
4.4.1. Generalidades	56
4.4.2. Etilenglicol	57
4.4.2.1 Toxicocinética	57
4.4.2.2. Manifestaciones clínicas	57
4.4.2.3. Tratamiento y pronóstico	58
4.4.2.4. Prevención	59
4.4.2.5. Toxicidad	59
4.4.2.6. Estudios postmortem	61
4.4.3. Dietilenglicol	61
4.4.3.1. Generalidades	61
4.4.3.2. Metabolismo y toxicidad	62
4.4.3.3. Intoxicaciones masivas registradas	64
4.4.3.4. Propóleos: su contaminación	67
4.4.3.4.1. Generalidades	67
4.4.4. Otros glicoles	68
Capítulo 5. Compuestos tóxicos volátiles generados en incendios de materiales plásticos nitrogenados.	69
5.1. Ácido cianhídrico y cianuros alcalinos	69

5.1.1. Generalidades	69
5.1.2. Origen, propiedades y usos del HCN y los cianuros alcalinos.	69
5.1.3 Biotransformación en el hombre	70
3.1.4. Toxicidad y Manifestaciones clínicas	71
3.1.5. Aspectos médicos forenses	72
3.1.6. Analítica Toxicológica	72
5.1.7. Ácido cianhídrico en incendio de materiales sintéticos nitrogenados	73
5.2. Monóxido de carbono	74
5.2.1. Propiedades físicas del monóxido de carbono	74
5.2.2. Toxicocinética y mecanismo de acción del monóxido de carbono	75
5.2.3. Efectos en la salud de la exposición al monóxido de carbono	77
5.2.3.1 Efectos cardiovasculares	78
5.2.3.2. Efectos pulmonares agudos	81
5.2.3.3. Efectos cerebrovasculares y neurocompartimental	81
5.2.4. Monóxido de carbono en el humo de tabaco	83
5.2.5. Intoxicación por monóxido de carbono	83
Capítulo 6. Drogas de uso indebido	88
6.1. Introducción	88
6.2. La hoja de coca y la cocaína	89
6.2.1. Consideraciones botánicas y socio-culturales sobre la hoja de coca	90
6.2.2. Tratamiento de la hoja de coca con fines ilícitos	91
6.2.3. Cocaína	91
6.2.3.1 Vías de administración, incidencia y formas de uso.	92
6.2.3.2. Metabolización de cocaína y excreción	93
6.2.3.2.1 Pirólisis	94
6.2.3.3. Estudio de la estabilidad de la cocaína en muestras de sangre en diversas condiciones de preservación	95
6.2.4. Aislamiento, purificación e identificación de cocaína y estructuras relacionadas proveniente de materiales biológicos. (Sangre, orina y vísceras).	99
6.2.5. Matrices alternativas: estudios postmortem de cocaína y productos de biotransformación en pelo.	101
6.2.5.1 Esferas judiciales que emplean el estudio de sustancias de abuso en pelo	102
6.2.5.2. Aspecto Anatómico y fisiológico	104

6.2.5.3. Incorporación de Drogas al Organismo	106
6.2.5.4. Permanencia de droga en el pelo	108
6.2.5.5. Estudios sobre dosis - concentración en pelo	109
6.2.5.6. Relación Droga – Metabolito.	109
6.2.5.7. Cadena de custodia	110
6.2.5.8. Procedimientos analíticos para pelo	110

OBJETIVOS DE LA TESIS

Objetivo general	112
Objetivos específicos	113

MATERIALES Y METODOS

Capítulo 7. Materiales, técnicas y metodologías aplicadas en los ensayos	115
7.1. Determinación de ácido cianhídrico: Método de Gettler-Goldbaum adaptado	115
7.2 Determinación de monóxido de carbono	116
7.2.1. Método de microdifusión (Técnica de Feldstein-Klendshoj).	116
7.2.2. Método de Gettler y Freimuth.	117
7.3. Reseña del caso de intoxicación masiva con gases tóxicos (CO y HCN)	118
7.4. Metodología para la determinación de metanol y ácido fórmico	119
7.5. Reseña del caso de intoxicación masiva con metanol.	120
7.5.1 Muestras	120
7.5.2 Clasificación de las víctimas en grupos	120
7.6. Metodología para la determinación de dietilenglicol (DEG)	120
7.6.1. Condiciones de ensayo para el análisis de jarabe de propóleos	120
7.6.2. Aislamiento y condiciones cromatográficas para el análisis de DEG en sangre y vísceras.	121
7.6.3. Condiciones del ensayo de cromatografía para muestras viscerales	122
7.6.4. Determinación de parámetros bioquímicos ensayados	122
7.7. Reseña del caso de intoxicación masiva con DEG	122
7.7.1 Clasificación de víctimas en grupos de acuerdo al tiempo de supervivencia	123

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Capítulo 8. Factores físicos y químicos involucrados en la generación de ácido cianhídrico y monóxido de carbono en incendios. Tratamiento de los datos analíticos en la predicción de su acción biológica.	135
Capítulo 9. Estabilidad, pérdidas y generación de alcohol etílico	146
9.1. Estudio del origen de las pérdidas y generación de alcohol etílico en muestras sanguíneas	146
9.2. Cinética de decaimiento de la concentración de etanol	151
9.2.1 Predicción del tiempo necesario para la reducción de la concentración de etanol a la mitad de la inicial.	156
9.3 Cálculo de la energía de activación	157
9.4. Estudio de relación de áreas entre la señal previa al estándar interno (amina de putrefacción) y estándar interno: isopropanol (R).	159
9.5. Estudio de la variación de etanol agregado a muestras de sangre entera bajo diferentes condiciones de preservación.	160
9.6. Conclusión y comentarios sobre las muestras analizadas en este capítulo	164
Capítulo 10. Distribución y estabilidad del metanol y el ácido fórmico en intoxicaciones metílicas. Propuesta de un índice a través de relaciones de concentración del analito entre órganos para inferir la certeza o no de intoxicación a partir de datos post mortem.	165
10.1. Distribución de metanol y ácido fórmico en el hombre	165
10.2. Análisis post mortem de la distribución del ácido fórmico en una intoxicación aguda por metanol.	169
Capítulo 11 Estabilidad y factores físicos y químicos que inciden en la detección de dietilenglicol en tejidos humanos. Correlación entre parámetros de medio interno y la acidosis metabólica. Estimación de la dosis letal para el episodio estudiado.	178
11.1 Estudio de la concentración en jarabes de propóleos contaminados con dietilenglicol.	178
11.2 Aislamiento e identificación de DEG en sangre y vísceras	181
11.3 Análisis de la fracción semicristalina separada del extracto metanólico a baja temperatura	182
11.4 Manifestaciones clínicas características halladas en esta intoxicación masiva.	195
11.5. Análisis de los parámetros bioquímicos de medio interno	195

11.6 Estimación de la dosis letal de DEG para el episodio	199
Capítulo 12. Cocaína y sus productos de biotransformación en materiales biológicos	
proveniente de cadáveres	205
12.1. Rutas principales de metabolización durante procesos enzimáticos	207
12.1.1. Vía hidrolítica	208
12.1.2. Vía pirolítica	209
12.1.3 Aril hidroxilación	210
12.1.4. Trans-esterificación	210
12.2. Otros alcaloides	211
12.3. Interpretación de los resultados obtenidos del estudio de cocaína y sus productos de biotransformación en personas vivas.	212
12.4. Estabilidad de la cocaína y sus productos de biotransformación en diversos órganos durante el proceso postmortem	213
12.3.1 Estudio de la cocaína y sus metabolitos en diversas matrices: interpretación forense	216
12.4. Interpretaciones forenses cuando se incorporan los datos de matrices alternativas a las tradicionales.	
CONCLUSIONES FINALES.	220
BIBLIOGRAFIA.	226
ANEXO.	253

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diversas zonas de muestreo en cuerpos exhumados, ataúd y zonas adyacentes.....	Pág. 9
Figura 2. Ampolla de decantación modificada (ad hoc) para la extracción directa según la técnica de Fassi.....	Pág. 25
Figura 3: Fracción copolimérica de intercambio catiónico.....	Pág.26
Figura 4: Fracción copolimérica no polar.....	Pág.27
Figura 5: dispositivo plástico conteniendo el relleno de sílica de fase unida para la separación y elusión de analitos.....	Pág.27
Figura 6: Biotransformaciones más importantes del alcohol etílico en humanos.	Pág.43
Figura 7: Mecanismo posible de generación de sustancias psicoactivas a través de la interacción entre neurotransmisores y acetaldehído producido en la primera etapa de biotransformación del etanol.....	Pág.44
Figura 8: Curva de absorción y eliminación de alcohol etílico en sangre.....	Pág.47
Figura 9: Cinética seguida por el etanol en seres humanos.....	Pág.48
Figura 10 Proceso de biotransformación del metanol en el hombre.....	Pág.54
Figura 11 Camino metabólico propuesto para la oxidación del DEG. ADH (Alcohol deshidrogenasa), ALDH (aldehído deshidrogenada).....	Pág. 63
Figura 12 Estadística sobre Incidentes reportados con sospecha de intoxicación oxicarbonada (fuente: Enargas).....	Pág.86
Figura 13 Esquema de tratamiento terapéutico para intoxicaciones oxicarbonada (Fuente:Maldonado et al, 2004- cit. Enargas).....	Pág. 87
Figura 14 Estructuras químicas de la cocaína y compuestos relacionados.....	Pág.92
Figura 15 Comportamiento de las concentraciones de cocaína y EME en muestras sin preservantes químicos, temperatura ambiente y pH fisiológico.....	Pág.96
Figura 16 Comportamiento de las concentraciones de cocaína y el producto de transformación formado in situ, en muestras de sangre entera preservadas solo con frío y a pH fisiológico.....	Pág.96
Figura 17 Decurso y transformación de la cocaína en soluciones buffers a 25°C, con formación de BZ, como principal producto de biotransformación.....	Pág. 97

Figura 18 Estabilidad de la cocaína en sangre preservada con NaF a 4°C y pH fisiológico.....	Pág. 98
Figura 19 Comportamiento de la cocaína en condiciones de preservación más estrictas. Frío, preservante químico y pH ácido.....	Pág. 98
Figura 20 Esquema: procedimiento para el aislamiento de drogas por SPE.....	Pág.100
Figura 21 Dispositivo para el análisis de ácido cianhídrico mediante el método de Welter & Goldbaum.....	Pág.115
Figura 22 Dispositivo para la determinación de monóxido de carbono mediante el método de Gettler & Freimuth.....	Pág.117
Figura 23 Histograma correspondiente a las relaciones de concentración de monóxido de carbono y ácido cianhídrico en las 35 víctimas fatales de ésta investigación.....	Pág.137
Figura 24 Esquema que muestra los índices de letalidad (LI) para datos de este trabajo y otros autores, ubicados en las zonas previas definidas.....	Pág.139
Figura 25 Cinética de decaimiento del etanol en muestras de sangre a) 25°C, b) 4°C y c) – 10°C, con distintos porcentajes de Cámara de aire.....	Pág.147
Figura 26. Efecto del contenido de la cámara de aire en el recipiente sobre los valores de ko (constante de decaimiento del etanol) a 25° C, 4°C y -10°C.....	Pág.149
Figura 27: Efecto de la temperatura de almacenamiento sobre los valores de ko (constante de decaimiento del etanol) con 0%CA, 5%CA, 20%CA, 35%CA, 65%CA.....	Pág.150
Figura.28 Gráfico de contorno que permite predecir el tiempo necesario para que la concentración de etanol caiga a la mitad del valor inicial en las diferentes condiciones estudiadas. Con 0%CA, 5%CA, 20%CA, 35%CA, 65%CA.....	Pág.152
Figura 29 Dependencia de la constante de decaimiento del etanol en función de la temperatura 0%CA, 5%CA, 20%CA, 35%CA, 65%CA.....	Pág.154
Figura 30 Relación de áreas entre la señal previa al estándar interno (amina de putrefacción) y estándar interno: Isopropanol (R) en función del tiempo a las diferentes condiciones estudiadas.....	Pág.155
Figura 31: Efecto del almacenamiento a diferentes temperaturas sobre muestras de sangre entera sin agregado de alcohol y con 5% de NaF y con 5%CA.25°C, 4°C, - 10°C.....	Pág.157

Figura 32 Variación en la concentración de alcohol agregado a muestras de sangre entera con NaF y 5%CA. a) 25°C, b)4°C y c)-10°C. Concentración inicial: 0.84 g/L , 1.64 g/L, 2.70 g/L y 3.56 g/L.....	Pág.158
Figura 33 Concentración de metanol y ácido fórmico en (g/L or g/Kg) en grupo 1, 2 y 3 en sangre, hígado, pulmón, cerebro y riñón.....	Pág.161
Figura 34 Relación promedio de la concentración en sangre de metanol respecto de los distintos tejidos para los grupos 2 y 3.....	Pág.163
Figura 35 Gráfico mostrando la correlación entre a) concentración de ácido fórmico en cerebro y la concentración correspondiente en sangre ($r^2=0.86$, $n=15$), b) ácido fórmico en riñón y la concentración correspondiente en pulmón para los grupo 1, grupo 2 y grupo 3.....	Pág.166
Figura 36 Correlación entre el índice LI y la relación de concentraciones en diversos órganos	Pág.169
Figura 37 Correlación entre Índice de Letalidad vs. Concentración total de ácido fórmico (mg/L) para grupo 1, grupo 2 y grupo 3. Datos de Tanaka y Hantson.....	Pág.171
Figura 38 Espectro RMN de una muestra de jarabe de propóelos contaminado con DEG.....	Pág.177
Figura 39 Espectro RMN – DEPT de otra muestra de jarabe de propóelos contaminado con DEG.....	Pág.178
Figura 40. Esquema de procedimiento y resultado del estudio de la fracción incógnita Semicristalina, con indicación de porcentajes de lípidos complejos.....	Pág.180
Figura 41 Cromatografía (GC-FID) obtenido del análisis de ácidos grasos libres totales, luego de eterificar con metanol.....	Pág.181
Figura 42. Espectro obtenido para lípidos totales mediante TLC-FID. Obsérvese la resolución alcanzada con el segundo sistema de fase móvil.....	Pág.182
Figura 43. Espectro obtenido mediante TLC-FID de estándares resueltos en el segundo sistema de fase móvil utilizado.....	Pág.183
Figura 44. Resolución de los lípidos polares mediante cromatografía TLC-FID, indicando los porcentajes relativos de fosfolípidos.....	Pág.184
Figura 45. Gráfico de torta donde se observa la composición y porcentaje de la fracción semicristalina estudiada.....	Pág.186

Figura 46 Cromatograma de un extracto visceral correspondiente a una de las víctimas del envenenamiento. Flujo de gas carrier a 20 cm ³ /min y temperatura de horno de 150°C, 1 min. Grad. 10°C/min hasta 200°C.....	Pág.188
Figura 47 Cromatogramas correspondiente a la misma víctima cuyos cromatogramas precedentes se muestran. El ensayo fue realizado con carrier a 12 cm ³ /min y temperatura de horno 110°C, 2 min, grad.8°C/min hasta temperatura final de 200°C. Se muestra separación y resolución de los picos.....	Pág.189
Figura 48 Cromatograma ampliado del análisis anterior, donde se observan el DEG y el EG como estándar interno y su aceptable resolución.....	Pág.190
Figura 49 Correlación entre los parámetros ácido base en el episodio tóxico con DEG. a)EB vs GAP b) pH vs EB para grupo 1, grupo II, grupo III.....	Pág.196
Figura 50. Relación entre dosis de DEG y GAP aniónico para 13 de las 15 víctimas estudiadas. (r ² = 0.63 y 0.78).....	Pág.199
Figura 51 Caminos metabólicos seguidos por la cocaína en tejidos humanos. Insechmid, 2004- con permiso del Editor de la publicación del FBI).....	Pág.203
Figura 52 vías de biotransformación de la cocaína, conocidas hasta hoy.....	Pág.205
Figura 53 concentración de cocaína y benzoilecgonina en función del tiempo, determinadas en orinas de consumidores.....	Pág.209

II. TABLAS:

Tabla 1. Muestreo de tejidos para estudios toxicológicos forenses. Órganos y/o fluidos, cantidad necesaria y tipo de compuestos comúnmente investigados.....	Pág.15
Tabla 2. Clasificación de los tóxicos que comúnmente se investigan, por grupo y método de aislamiento aplicado.	Pág.22
Tabla 3. Algunas reacciones de color utilizadas en el laboratorio toxicológico forense en la fase analítica inicial.....	Pág.30
Tabla 4. Sistemas de rastreo o screening por cromatografía en capa delgada.....	Pág.31
Tabla 5. Concentración de Etilenglicol en casos fatales (g/L o g/Kg).....	Pág.61
Tabla 6. Metabolismo de DEG (1.1g/Kg) en ratas Wistar macho (Wiener, 1989).	Pág.64
Tabla 7 Ventana de detección y tipo de drogas que se investigan.....	Pág.101
Tabla 8 Condiciones experimentales ensayadas en los estudios de etanol contaminado en muestras de sangre entera.	Pág.125
Tabla 9: tenor de Monóxido de carbono y ácido cianhídrico en la sangre de las víctimas fatales del incendio de colchones de goma espuma de poliuretano.....	Pág.132
Tabla 10. Niveles de CO, Etanol y HCN en sangre de cinco víctimas por incendio de colchones.....	Pág.135
Tabla 11 Concentración de alcohol etílico y relación entre productos de putrefacción y estándar interno en sangres enteras preservadas en distintas condiciones de temperatura y con % variables de cámara de aire.....	Pág.145
Tabla 12 Parámetros obtenidos del ajuste de la cinética de primer orden a los datos experimentales. R^2 : coeficiente de determinación.....	Pág.148
Tabla 13. Parámetros del ajuste de la ecuación (15) a los datos experimentales...	Pág.149
Tabla 14: Parámetros del ajuste de la ecuación (16) a los valores de k_0	Pág.150
Tabla 15 Aplicación de la ecuación de Arrhenius para evaluar el efecto de la temperatura sobre la velocidad de decaimiento de etanol (k_0) a diferentes niveles de %CA.....	Pág.153
Tabla 16 Concentración de etanol (g/L) en sangre contaminadas con diferentes concentraciones de alcohol y almacenadas en distintas condiciones de temperatura y con % variables de cámara de aire (CA).....	Pág.156
Tabla 17 Concentración de ácido fórmico (g/L o g/Kg) en diferentes matrices biológicas correspondiente a 15 víctimas involucradas en intoxicación metálica.....	Pág.165

Tabla 18. Metanol y ácido fórmico en 15 casos, considerándole tiempo transcurrido hasta el análisis.....	Pág.173
Tabla 19. Contenido de DEG y PEG en las muestras de jarabes pertenecientes a cada una de las víctimas de la intoxicación masiva.....	Pág.176
Tabla 20. Víctimas en la que se consigna sexo, edad, tiempo de sobrevivida (TS), DEG en sangre y vísceras, aplicación de terapia , tiempo transcurrido entre la muerte y el análisis en laboratorio. Las últimas tres columnas indican el grado de acidosis metabólica, tenor del daño renal y grado de daño hepático.....	Pág.191
Tabla 21. Parámetros del estado ácido base y concentraciones de DEG en sangre y vísceras.....	Pág.194
Tabla 22 Cálculo estimado de DEG en mg suponiendo un consumo entre 5 y 20 ml de jarabe de propóleos.....	Pág.198
Tabla 23. Cocaína y sus metabolitos en 8 casos postmortem.....	Pág.210
Tabla 24. Resultados de los estudios de cocaína y metabolitos en diversas matrices alternativas y en vísceras (putrúlagos).....	Pág.214
Tabla 25. Concentración de cocaína (COC) y benzoilecgonina (BZ) en cuatro casos de exhumaciones en pelo pericraneal y púbico, expresados en ng/mg de pelo.....	Pág.216

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1

ASPECTOS GENERALES SOBRE TOXICOLOGÍA FORENSE Y POSTMORTEM.

Relacionada estrechamente con la Medicina Legal, la Toxicología Forense, auxiliar de la justicia, constituye una rama de la ciencia toxicológica que ha progresado en forma sorprendente, principalmente en la última década y en los aspectos referidos al análisis postmortal (Repetto, 1995; Baselt, 2000; Drummer y Gerostamoulos, 2002; Madea y Mushoff, 2004).

Aunque la definición de Toxicología aceptada por la mayoría de los especialistas, incluye un amplio rango de aplicación tal como: toxicología regulatoria, toxicología de alimentos, toxicología de fármacos, toxicología clínica, (por ejemplo mediante la determinación de drogas en orina de individuos vivos) toxicología ambiental (respecto de agentes que impactan negativamente en el medio ambiente); la aplicación más común es identificar sustancias químicas que pueden constituirse como agentes causales de la muerte o injuria en seres humanos.

El campo de aplicación de la Toxicología Forense se enmarca mayoritariamente en el ámbito de la Medicina Legal; esto en virtud de su aplicación en la resolución de problemas de índole judicial, que pueden surgir cuando una sustancia química se halla implicada en un daño a la salud humana, inclusive el óbito. Entre ambas ciencias existe una estrecha relación interdisciplinar dentro de este marco restringido. En este sentido, el toxicólogo forense puede contribuir a determinar la causa de la muerte, o simplemente establecer que grado de relación tiene una sustancia química con ella. Corresponderá entonces al toxicólogo forense interpretar en cuál de los diversos eslabones se encuentra la relación sustancia química – muerte, de significación médico-legal; esto es, si está asociada, relacionada, si la ha inducido, o ha sido directamente responsable de la misma (Repetto, 1997).

Entre los objetivos que persigue la toxicología forense en las investigaciones post-mortem, se encuentran: el análisis cuali - cuantitativo de drogas o venenos en los especímenes biológicos recolectados durante la autopsia y la interpretación de los resultados analíticos hallados, así como el comportamiento y los efectos fisiológicos de aquellas sustancias detectadas. La correcta interpretación de los resultados en toxicología forense es muy dependiente de la evaluación de diferentes procesos que suceden en forma simultánea con los fenómenos postmortales. Entre ellos podemos incluir la redistribución postmortem, fenómenos putrefactivos y de autólisis (que pueden afectar el comportamiento farmacocinético de ciertas

drogas) y aspectos pre-analíticos y analíticos (Shepherd et al, 1992; Hilberg et al, 1999; Cook et al, 2000; Skopp, 2004; Watson y McKinney, 2004; Jones, 2004).

Resulta muy importante en la interpretación toxicológica postmortem considerar la estabilidad de drogas o de sus metabolitos (Manhoff et al, 1991; Repetto, 1995; Drummer, 2004).

La inestabilidad puede derivar de procesos físicos y químicos, algunos de los cuales ocurren igualmente durante el proceso post-mortem o fuera de ese ambiente.

Entre los factores de inestabilidad química podemos nombrar las reacciones hidrolíticas (como por ejemplo la hidrólisis de la cocaína o la heroína).

Los procesos metabólicos pueden ser generados por enzimas endógenas (factor biológico) que continúan operando después de la muerte o por enzimas que se producen luego de la invasión bacteriana u otros factores que ocurren en este ambiente especial. Entre estos, la hidrólisis de la heroína a través de esterasas, hidrólisis de ácido acetil salicílico y cocaína o activación de prodrogas, generalmente a través de esterasas, son solo algunos ejemplos (Logan y Peterson, 1994; Warner y Norman, 2000; Drummer, 2002, 2004); la nitro reducción, deconjugación con glucurónido, S-oxidación de fenotiacinas, son ejemplos de modificación de la estabilidad de drogas por actividad enzimática derivada de la acción bacteriana. Durante las modificaciones que ocurren en el período postmortem, es interesante notar que algunos procesos enzimáticos ocurren mejor en condiciones anaeróbicas, mientras que los procesos químicos son acelerados por la presencia de oxígeno o radicales libres. A menudo, la inestabilidad química es difícil de diferenciar de los procesos mediados por enzimas, por ejemplo lo que sucede con la cocaína (Warner y Norman, 2000). También, la concentración de drogas puede modificarse por la presencia de cofactores reducidos (NADH, NADPH) que median la degradación de compuestos como el flunitrazepam (Yamazaki y Wakasugui, 1994; Drummer, 1997).

Varios grupos de investigadores han mostrado que algunas drogas, tales como propoxifeno, antidepresivos tricíclicos (amitriptilina, imipramina, digoxina) pueden aumentar su concentración durante el proceso post-mortem (Jones y Pounder, 1987; Prouty y Anderson, 1990; Shepherd et al, 1992). Estos estudios muestran una relación entre el intervalo postmortem (tiempo entre la muerte y la autopsia) y el aumento de la concentración de la droga en sangre. Se han observado diferencias de concentración entre la hallada en sangre de grandes vasos periféricos de los órganos del sistema gastrointestinal (Vg. vena cava inferior) y otros sitios periféricos externos a estos, por ejemplo la sangre de la vena subclavia y la vena femoral. Este hecho ha sido descrito y definido como redistribución postmortem (Shepherd et al, 1992; Patiño, 1993; Pounder et al, 1996; Moriya y Hashimoto, 1999; Cook et al, 2000).

Varias drogas presentan redistribución post-mortem. Entre ellas, podemos nombrar al alprazolam, amitriptilina, amoxapine, anfetamina, cafeína, cesimipramina, digoxina, imipramina, metanfetamina, norfluoxetina, nortriptilina, fenilciclidina, propranolol, trimipramina, verapamil entre otras. La determinación de estas drogas en sangre periférica ha mostrado ser más confiable cuando se compara con las concentraciones pre-mortem (Prouty y Anderson, 1990). Así, en los casos de sospecha de sobredosis de drogas o en caso de desconocimiento de causal de muerte, debe recogerse y analizarse una muestra de sangre femoral o de vena subclavia (Pounder et al, 1996; Hilberg et al, 1999; Leikin y Watson, 2003; Jones, 2004).

Para el caso de muertes debido a consumo múltiple de drogas, Backer y Poklis (1999) han informado que algunas drogas no muestran un incremento en la relación concentración en corazón / vena femoral, mientras que otras sí lo hacen.

Algunos autores han propuesto que la concentración de la droga en hígado es mejor indicador de toxicidad (Apple y Bandl, 1988; Prouty y Anderson, 1990).

Para alcohol etílico, algunos estudios han mostrado que la concentración en sangre de corazón cambia durante el proceso postmortem y se ha recomendado el análisis en sangre femoral para estos casos (Briglia, 1992; Pounder y Smith, 1995; Leikin y Watson, 2003). Otros estudios (Winek, 1996) han mostrado que la concentración de alcohol no cambia en un cuerpo intacto y que la diferencia de concentración de alcohol entre el corazón y sangre femoral es mínima y probablemente se deba a cambios en la fase de absorción durante el consumo de alcohol. Sin embargo, en los casos que ocurre una infiltración de bacterias en el cuerpo, se recomienda una determinación de alcohol en muestra de sangre femoral. Asimismo debe considerarse la producción de alcohol endógeno (proporcional a la concentración de glucosa) que puede ser varias veces mayor en sangre proveniente de corazón que en sangre femoral (O'Neal y Poklis, 1996).

Por otro lado, el rol que cumplen determinados productos de biotransformación de alcoholes aún se encuentra bajo debate. El ácido fórmico ha sido propuesto para monitorear el grado de afectación en una intoxicación metanólica, pero su propuesta como índice o parámetro de letalidad es aún discutido (Tonkabony, 1975; Jacobsen y McMartin, 1986; Pla et al, 1991; Tanaka et al, 1991; Liesivuori y Savolainen, 1991; Tedeschi et al, 1998). Los estudios en intoxicaciones masivas sugieren que el formiato puede ser un buen parámetro para evaluar el grado de intoxicación y el decurso de su eliminación para mantener condiciones apropiadas en el medio interno, tendientes a evitar la acidosis metabólica. Esto último es especialmente

cierto en los casos de sobrevidas mayores a 48 horas (Ferrari et al, 1997). No obstante la observación, no hay registro bibliográfico que sugiera al formiato y su concentración como pronóstico de sobrevida y guarismos postmortem que indiquen envenenamiento fehaciente (Eriksen et al, 1963; Wu, 1985; Ferrari et al, 2002).

De manera análoga (con interpretaciones mucho más oscuras) sucede con las biotransformaciones ante mortem y postmortem del dietilenglicol. (Bowie y McKenzie, 1972; Wiener, 1989; Mathews et al, 1991; Ferrari et al, 1997, 2004).

Lo anteriormente expuesto indica que los conocimientos de los procesos que influyen en los cambios postmortem son aún rudimentarios y las interpretaciones comparativas se hallan limitadas a un pequeño número de casos (Shepherd, 1992; Coe, 1993; Jenkins et al, 1999; Hilberg et al, 1999; Garrote et al, 2000; Baselt, 2000; Drummer y Gerostamoulos, 2002; Leikin y Watson, 2003; Jones, 2004).

Asimismo, los factores físicos, químicos y biológicos que ocurren en los procesos postmortem e influyen en la detección de drogas, requieren aún de profundas investigaciones para poder interpretar correctamente el resultado analítico encontrado.

Cabe señalar aquí, que este último aspecto ha sido escasamente abordado por los pocos especialistas en toxicología postmortem o "necrocinética". Esta profundización de conocimientos es de fundamental importancia para el toxicólogo forense en su vinculación con las otras ciencias forenses, especialmente con la medicina legal.

Por otra parte, existen actualmente nuevas técnicas analíticas, que permiten la obtención de eluatos muy puros y altos rendimientos extractivos, permitiendo así disminuir ostensiblemente el límite de detección de las drogas. Por ejemplo, la extracción en fase sólida (SPE) o la microextracción en fase sólida (SPME) desarrollada por Pawliszyn (1995) integra muestreo, extracción y concentración en un simple procedimiento. Existe un importante número de informes bibliográficos que indican la utilidad de ambas técnicas (SPE y SPME) para el análisis de drogas y xenobióticos en general en muestras biológicas. Sin embargo, para ciertas drogas como las objeto de uso indebido, los procedimientos empleados para su correcto empleo indicando recuperación de la técnica, no han sido aún suficientemente descriptas para matrices biológicas complejas como sangre, tejidos y matrices no convencionales como es el pelo. Esta última matriz adquiere gran importancia dado que constituye un elemento en el cual determinadas drogas son almacenadas sin sufrir deterioro con el tiempo. Sin embargo, el estudio de drogas en pelo es un campo poco explorado y de gran aplicabilidad en la toxicología postmortem. Además, ésta matriz es la única que puede

ser utilizada para aseverar consumos mediatos de drogas de abuso, aplicándose a casos donde debe discutirse la incorporación de la droga por cierto tiempo; con consecuencias legales importantísimas (tenencia de hijos, expedición de licencias de conducir, seguimiento de tratamientos de detoxificación) inclusive en casos de doping humanos o animal y en competencias deportivas (Kintz, 1995; Pichini et al, 1996; Flanagan, 1999; Sporkert y Pragst, 2000; Wennig, 2000; Kintz, 2004). En cuanto a la aplicación postmortem, ha sido muy útil su estudio para garantizar la idoneidad de la prueba analítica al permitir descartar casos de contaminación intencional por drogas o la imputación de un delito a un individuo bajo la acción de estupefacientes (Ferrari y Arado, 2000; Arado, 2004).

1.1. Factores involucrados en los fenómenos postmortales

En los últimos años ha habido un avance muy importante en la toxicología forense postmortem. Después de la muerte el cuerpo no se comporta como un compartimiento estático. Existe disimilitud entre concentraciones de diferentes drogas y sus metabolitos ya sea en sangre arterial o venosa durante la vida; por ello, no resulta sorprendente que haya también diferencias después de la muerte.

Existen distintos fenómenos postmortem que dificultan la interpretación y extrapolación del resultado analítico forense al tiempo de la muerte. Entre estos fenómenos podemos citar cambios en la composición del tejido debido a procesos putrefactivos, acción de enzimas que aumentan o inhiben la autólisis celular, tiempo, la humedad y condiciones de temperatura; aún entre la posición del cuerpo en la muerte y la extracción de la matriz biológica, que dificultan el completo conocimiento de los eventos que afectan la muestra hasta su llegada al laboratorio forense.

Para ilustrar un tanto mejor ésta compleja circunstancia pasaremos brevemente a describir el fenómeno de muerte celular, relacionado con la farmacocinética post-mortem o, como han preferido llamarla actualmente algunos autores, *necrocinética*.

A menudo se tiende a pensar que inmediatamente después de la muerte el organismo cesa todas sus funciones y el cuerpo se viene a comportar como un sistema estático. La siguiente explicación intenta revertir esta idea.

Una vez producida la muerte, el cuerpo sufre numerosos cambios. Estos comienzan a nivel celular debido a una isquemia (del griego ischein: detener y haima: sangre), entendiéndose por tal a una deficiencia local y temporal de sangre, debida principalmente a una vasoconstricción, determinando rápidamente la necrosis de la zona afectada. Esta puede ser

inicialmente imperceptible, pero a medida que transcurre el tiempo post-óbito, el deterioro se hace evidente. El mecanismo y la secuencia de eventos que ocurren durante la isquemia y la hipoxia celular han sido bien determinados en modelo animal y humano. Normalmente existen dentro de las células proteínas cargadas negativamente cuya relevante concentración produce una alta presión osmótica coloidal. El sodio es intercambiado por el potasio a través de la adenosin trifosfatasa (ATPasa) y dependiente energéticamente de la bomba sodio-potasio. Esta bomba mantiene un gradiente iónico donde la concentración intracelular de sodio y potasio son más bajas y más altas, respectivamente que las correspondientes a la concentración extracelular.

En los estados de hipoxia, la primer función celular afectada es la respiración aeróbica y la fosforilación oxidativa mitocondrial. Con la depleción o interrupción de llegada de oxígeno a la célula, la tensión intracelular de este disminuye provocando la interrupción de la fosforilación oxidativa y la síntesis de ATP. Así, el ATP remanente es consumido y la célula convierte la glicólisis en forma anaeróbica, los fosfatos en forma inorgánica y se acumula ácido láctico. Por tanto el pH intracelular se hace más ácido. Asimismo, con la depleción de ATP y ATPasa la bomba sodio/potasio comienza a alterarse y como consecuencia el sodio se acumula dentro de la célula y el potasio difunde fuera de ella. Esta concentración intracelular de soluto arrastra osmóticamente agua hacia dentro de la célula. Este incremento de concentración de catabolitos y de entrada de agua provoca una alteración en el retículo endoplásmico y edema celular. En éste estado los ribosomas se separan del retículo endoplásmico. A medida que la hipoxia continúa, se forman *ampollas* en la superficie celular, perdiendo de este modo su estructura normal. Las mitocondrias se hinchan y la función mitocondrial disminuye.

Hasta este punto los cambios celulares serían potencialmente reversibles si el oxígeno fuera restituido, pero como la hipoxia continúa atento la naturaleza del proceso post-mortal, la injuria y los cambios morfológicos son irreversibles. En este devenir sin retorno, la membrana plasmática y la mitocondria son dañadas, el calcio se acumula intracelularmente y los lisosomas se agrandan, produciéndose además pérdida de proteínas, coenzimas esenciales y ácido ribonucleico. Los metabolitos esenciales para la producción de ATP ya dejan de estar disponibles por parte de la célula.

Es interesante consignar, en esta instancia lo que Shepherd et al (1992) expresaron en su revisión, acerca de la muerte celular: "el exacto punto de la muerte celular no ha sido establecido". La célula muerta es definida como el estado en el cual esta es incapaz de alguna

función, incluyendo la motilidad, capacidad de tomar o ingresar materiales para su actividad, síntesis, control homeostático y reproducción. Minutos después de la “muerte celular” la disminución del pH celular y la disrupción de la composición iónica intracelular, la deja a merced de la injuria por actividad lisosomal. Enzimas, como RNAasas, DNAasas, proteasas, glucosidasas, son activadas por ese aumento de acidez, produciendo así la autólisis de los componentes celulares.

La autólisis es más rápida en células con alta concentración de enzimas hidrolíticas, como sucede en el páncreas y en la mucosa gástrica; y más lenta en células cardíacas, hepáticas y renales. En los fibroblastos y otras células que no contienen lisosomas y enzimas hidrolíticas, la autólisis se ve más demorada.

Como epílogo de este proceso, la integridad celular se pierde y solo permanecen en el espacio que fue “vida” restos celulares degradados.

En el siguiente esquema podemos apreciar los diversos sitios de muestreo, dentro y adyacente al depósito de un ataúd confinado en tierra, donde se halla un cuerpo humano luego del deceso y en los que la toma de muestra es relevante, para el ulterior análisis en laboratorio luego de la exhumación del mismo.

En la actualidad no se conoce con certeza la distribución postmortem de determinadas drogas de interés toxicológico siendo esto importante en la interpretación y evaluación de los resultados encontrados. Tampoco se conoce en profundidad los fenómenos fisico- químicos que afectan la estabilidad del analito en la muestra durante el proceso de aislamiento y aún después de éste; es decir luego de la extracción y purificación.

Existen diferencias en la concentración de algunas drogas según la forma que han sido recolectadas. Es sabido que la presencia de cámara de aire en la muestra sanguínea a ser analizada para la determinación de alcohol etílico, puede arrojar importantes errores por volatilización del analito (Parsons, 2002). La temperatura de conservación juega además un rol importante (Winek, 1996). Inclusive algunos investigadores (Sreerama y Hardin, 2003) han advertido la importancia que reviste el tipo de material del recipiente donde es guardada la muestra, en la pérdida de analitos como el etanol. Similar situación se da en casos post-mortem que involucran al compuesto volátil utilizado como anestésico, éter etílico, que ha sido usado para adormecer a las víctimas en casos de homicidios (Ward et al, 1997). Otro aspecto que presenta poca información bibliográfica se refiere a la variación en la concentración de algunas drogas en función del tiempo entre la muerte y el análisis de

laboratorio. Dicho tiempo puede influenciar en los resultados hallados para alcoholes y determinadas drogas de abuso.

En el laboratorio forense debido al curso legal de los casos, es común recibir materiales biológicos obtenidos algunos días posteriores al óbito o aún en algunos casos las muestras son tomadas de cuerpos exhumados.

Sin embargo, a pesar de los importantes avances en el conocimiento y la utilización de modelos bioquímicos apropiados, aún existen dificultades para formular principios ciertos o predicciones sobre las transformaciones y/o procesos originados, afectando de esta manera, la interpretación de los datos post-mortem (Prouty y Anderson, 1990; Pounder, 1996; Toseland, 1999; Drummer, 2002; Skoop, 2004).

En el dominio de la toxicología forense postmortem los valores umbrales son de gran importancia para la interpretación del resultado analítico (Wennig, 2000; Winek, 2001).

De esta manera, el empleo de datos de concentraciones terapéuticas y tóxicas en sangre, que se encuentran en bibliografía y conocidas como valores de corte (cut off), presenta algunas limitaciones en el campo forense que deben ser consideradas (Winek et al, 2001; Uges, 2004).

Otro aspecto que requiere un estudio profundo se refiere a los límites de detección de estas técnicas según las matrices biológicas estudiadas. Asimismo, análisis de desviación standard relativa en términos de eficiencia de extracción para compuestos como alcoholes y drogas de abuso.

Lo anteriormente expuesto indica que el análisis completo de la situación representa un desafío para el laboratorio toxicológico, puesto que el analito puede sufrir alteraciones que afectan su determinación e interpretación en el campo de la toxicología postmortem y por ende, indirectamente, a la eficiencia de la magistratura en la administración de justicia.

El presente plan de tesis enfocó su estudio en la distribución y estabilidad postmortem de compuestos tóxicos como son las sustancias gaseosas: monóxido de carbono, ácido cianhídrico, sustancias volátiles como alcoholes (etanol, dietilenglicol y metanol) y la cocaína como modelo de drogas de abuso, siendo esta la de mayor relevancia toxicológica en nuestro medio. La elección de estos tóxicos se realizó debido a que los mismos estuvieron implicados en diversas situaciones registradas como intoxicaciones masivas en nuestro país lo que hizo posible contar con numerosos casos, lo cual proporcionaron un sustento científico con validez estadística al procesar los resultados emanados de las investigaciones analíticas. Para el caso de la cocaína se eligió en base a su gran relevancia postmortem y su frecuente detección en casos criminales tales como homicidios, violación seguida de muerte, robos violentos y

suicidios. Previo a describir los compuestos considerados en ésta contribución se estimó muy importante hacer referencia a la toma de muestra en el análisis toxicológico de rutina, ya que esta etapa condicionará el éxito o fracaso del análisis.

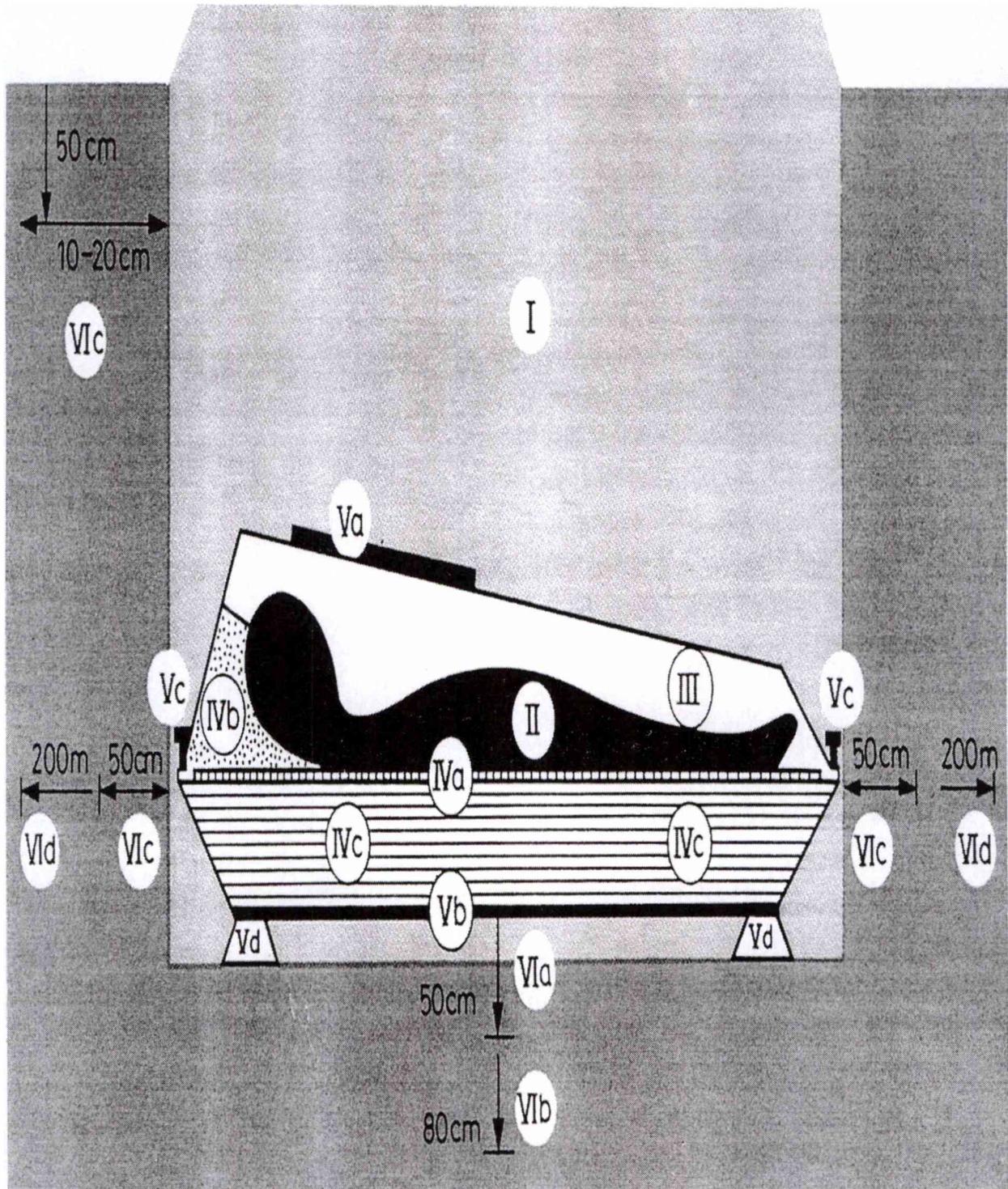


Figura 1: Ubicación de los sitios de muestreo durante la exhumación de un cuerpo para estudio toxicológico en caso de sospecha de envenenamiento (Spech, cit. Müller, 1995)

En la Figura 1, I es la tierra existente sobre el ataúd, generalmente superior a 50 centímetros de la tapa del mismo. II cadáver. III. Accesorios del cofre. IV. Lámina o placa base: a) Mortaja o sudario, b) cabezal a modo de almohada. c) cerramiento de madera. V. ataúd: a) sostén donde se hallan los ornamentos. b) tarima de apoyo. c) goznes o bisagras. d) pies de montaje del ataúd. VI. Suelo: a) inmediatamente debajo del cofre b) 50 –80 centímetros del ataúd. c) pared lateral de grava. d) 2 metros hacia fuera de la pared de grava. e) tierra “neutral” a unos 10 – 20 metros de la pared de grava.

CAPITULO 2

TOMA Y REMISIÓN DE MUESTRAS EN EL ANÁLISIS TOXICOLÓGICO FORENSE

La adecuada selección, recolección, preservación y envío de especímenes biológicos y cualquier otra muestra con el propósito de una investigación toxicológica es de fundamental importancia. El éxito de un estudio analítico y su interpretación depende en grado sumo de esta etapa. Esto no sólo es advertido por investigadores de prestigio internacional, sino también surge de la experiencia espigada en los últimos años. (Ministerio de Salud, 2000; Müller, 2001; Skoop, 2004).

Es cierto que no todo estudio analítico toxicológico debe concluir necesariamente en ámbito forense. No obstante los acontecimientos extraordinarios acaecidos en las dos últimas décadas nos han enseñado a movernos con prudencia en este sentido. Es decir, la posibilidad que nuestros estudios terminen debatiéndose en un estrado judicial. Cada laboratorio debe dar instrucciones precisas sobre el tipo de matriz y cantidad necesaria (según la metodología que aplicará) que contemple una cantidad adicional para repetición del análisis, si este fuera requerido.

No resulta ocioso insistir en este punto. Sigue advirtiéndose fallas graves en este estadio del análisis.

2.1. Información básica que debe consignarse para casos de análisis postmortem

Debe remitirse el informe de autopsia minucioso, indicando los mínimos detalles de la observación macroscópica. Si el médico autopsiante estima, aunque no esté totalmente seguro, la probable existencia de alguna sustancia tóxica, debe consignarlo o bien el analista requerirlo. Además, es relevante informar:

- Historia Clínica (especialmente casos de mala praxis).
- Drogas que se piensa o se sabe consumía el individuo.
- Profesión ó actividad laboral que desarrollaba.
- Síntomas ó conducta que presentaba el individuo antes de fallecer.

Remitir todo efecto que se estime pudo estar relacionado con el deceso de la víctima.

En caso de individuos vivos, consignar todo dato aportado por el mismo paciente o familiares, tipo de tareas que desarrolla, hábitos alimentarios, etc. El profesional médico debería expresar sus sospechas, aunque no las considere relevantes. Téngase en cuenta que el analista se vale

mucho de esas observaciones para poner énfasis en la búsqueda de una o varias sustancias y sus congéneres; más aún, cuando no se tiene una orientación bien definida al respecto.

2.2. Recolección y almacenamiento de muestras en el ámbito legal-forense

2.2.1. Materiales biológicos que deben remitirse al laboratorio toxicológico clínico y/o forense

El tipo de muestras que puede ser remitida en caso de individuos fallecidos puede ser sangre, orina, vísceras: pulmón, corazón, cerebro, tráquea, hígado, riñón, bazo, tejido adiposo (grasa), pelo (pericraneal, púbico, axilar), uñas, humor vítreo, bilis.

Es importante que el profesional que intervenga en la toma de muestra seleccione aquellas que según la anamnesis ofrezcan mayor posibilidad de detección de un compuesto que se presuma involucrado en el caso.

Tipo de muestras en individuos vivos: sangre o suero, orina, vómito, pelos, uñas, saliva. La selección de algunas de estas matrices queda también supeditada a la disponibilidad de las mismas o bien al tipo de tóxico sospechado y sus características farmacocinéticas.

La Tabla 1 muestra las diversas matrices objeto de análisis toxicológico postmortem, cantidades que se recomienda remitir al laboratorio y drogas que suelen investigarse.

2.2.1.1. Modo correcto de remitir el material para estudio

A. Vísceras

Deben colocarse en recipientes rigurosamente limpios, sin agregado de ningún tipo de sustancia con fines de preservación u otro motivo.

Si pudiera disponerse de un recipiente para cada órgano sería ideal, pero se acepta en la práctica colocarlos de la siguiente manera:

Recipiente

I: Cerebro

II: Hígado, riñón y bazo.-

III: Pulmón y corazón.-

IV: Estómago y su contenido.-

Dichos recipientes pueden ser de vidrio incoloro aunque si se dispone de frascos de vidrio color caramelo, estos serían más apropiados, especialmente para sustancias fotosensibles. El cierre debe ser perfecto. Si no es posible debe sellarse con parafina. Evitar tapas de papel ó

cartón. Pueden utilizarse recipientes plásticos con tapas del mismo material que permiten cierre perfecto.

Las bolsas plásticas apropiadas deben cerrarse herméticamente por algún medio, por ejemplo calor. Actualmente hay disponible bolsas plásticas de distintos tamaños para envasar las muestras con un tipo de cierre inviolable. Ello implica que en el caso de pretender abrir los recipientes una vez cerrados se destruye el soporte, lo cual permite detectar maniobras dolosas de apertura.

Debe rotularse correctamente con iniciales o numeraciones internas del laboratorio que no den lugar a confusión, utilizando escritores con tinta firme resistentes a soluciones acuosas.

Las muestras deben colocarse finalmente en refrigerador a 4°C. La temperatura ideal es -20°C, donde la actividad enzimática en los sistemas biológicos se halla prácticamente paralizada. Estudios minuciosos de degradación de drogas efectuados por Drummer (2000) mostraron que a estas temperaturas los tejidos biológicos sufren poca pérdida de las mismas por biotransformación).

Las muestras se emban en recipientes apropiados (por ejemplo cajas de cartón resistente), asegurando que los mismos dentro de la caja, no puedan sufrir roturas durante el traslado al laboratorio.

Es necesario enviar la muestra lo antes posible al laboratorio, evitando interrumpir la cadena de frío durante el traslado. Si se deben recorrer grandes distancias, pueden utilizarse recipientes de tergopol con hielo en su interior.

B. Sangre

Los recipientes que se envían pueden ser frascos, preferiblemente pequeños, con su respectiva tapa para lograr cierre hermético ó bien tubos de ensayo con cierre perfecto. Puede agregarse fluoruro de sodio como preservador, aunque si es refrigerada y llevada rápidamente al laboratorio no es imprescindible.

En necesario como mínimo 10 ml. para someter este fluido a estudio toxicológico general y 2 ml para estudio de alcoholemia (esto si se cuenta con cromatógrafo gaseoso ó se aplica la técnica de microdifusión).

Cuando se envasa sangre ó suero, no debe quedar espacio vacío en el recipiente es decir, debe evitarse cámara de aire que produce pérdidas importantes no sólo de etanol sino de cualquier otro tóxico volátil. Para evitar esto, llenarse al ras, tapar bien y si es posible debe sellarse con precinto de aluminio (como los viales de medicamentos inyectables).

No enjuagar nunca con alcohol los recipientes que se propone utilizar para colocar sangre ó suero. Tampoco debe utilizarse este solvente para desinfectar la piel del individuo al que se extrae muestra hemática. Es recomendable no solicitar frascos pequeños en hospitales ó unidades sanitarias.

Muchas veces quedan restos de medicamentos que no se extraen con lavado "casero", provocando confusiones en el ulterior estudio analítico. En los casos de extracciones a imputados de un ilícito, se recomienda la extracción de por lo menos DOS muestras sanguíneas consecutivas, con un intervalo de una hora entre ambas extracciones. Anotar la hora y rotular claramente (Importante para determinación de alcoholemias retrospectivas).

C. Orina

En forma similar a la recolección sanguínea, obviamente colocada en recipientes de mayor capacidad.

Enviar como mínimo 10 ml, pero es conveniente remitir toda la existente en vejiga en casos post-mortem o la emitida por individuo vivo, en 24 hs. Rotular y cerrar perfectamente. Colocar día, mes y hora de emisión ó recolección y fecha y hora de una dada circunstancia por la que se le pide la determinación. (v. g: determinación de cocaína o metabolitos). No agregar ninguna sustancia como conservante. Refrigerar a 4°C.

Se recomienda la orina como muestra idónea para el análisis de drogas de abuso, de manera que dicha muestra sea tomada por duplicado en frascos de 50 ml de capacidad. Deben llenarse a sus dos terceras partes, además debería evitarse los frascos plásticos, siempre que sea posible, debido a que las drogas pueden absorberse en la superficie de dichos recipientes y de ésta manera afectaría considerablemente las concentraciones recobradas.

Inmediatamente después de la recolección debe medirse la temperatura (que debe estar entre 32 y 38°C dentro de los cuatro minutos de su recolección) y el pH. Si se sospecha cualquier adulteración se debe notificar al laboratorio. La orina debe chequearse para constatar precipitados, color, si tiene espuma, etc. Se recomienda también la determinación de creatinina (180±80 mg/dl: normal; 10-30mg/dl: probablemente esta diluida; 10mg/dl: diluida) y la determinación de la densidad relativa (1.002-1.020: normal)

D. Pelo

Forma de recolección: Cortar en sector occipital (coronilla), bien al ras del cuero cabelludo, en lo posible 1 ó 2 grs. (en la práctica un puñado o mechón es suficiente). Tomar el extremo

cercano al cuero cabelludo, colocarlo sobre el papel ó cartón y abrochar con aplique. Colocar otro papel o cartón encima del anterior y pegar o atar según corresponda. Es aconsejable guardarlo en hojas de aluminio. El envoltorio debe permanecer firme. Indíquese claramente la zona cercana al cuero cabelludo y la distal.

Tomar vello pubiano y axilar, cortado al ras de la piel y colocarlo en sobre de papel.

Si la muestra se toma de un individuo fallecido es aconsejable arrancar el pelo para obtener el bulbo piloso. Esto último se realiza con el objeto de mejorar las posibilidades de determinación cronológica de la ingesta.

Tabla 1: Matrices biológicas susceptibles de análisis toxicológico postmortem, cantidades que se recomiendan remitir al laboratorio y tipo de drogas que se investigan

Muestra	cantidad	Droga a investigar
Estomago y su contenido	todo	Cualquier droga ingerida
Hígado, riñón y bazo	50g	Drogas en general
Corazón y pulmones		Algunos psicotrópicos, gases y solventes.
bilis	toda	Opiáceos
orina	toda	Idónea para drogas de abuso
cerebro	100g, parte media y central	Solventes liposolubles, psicotrópicos y drogas
sangre	2 muestras de 5ml y 10ml	Una para etanol, otra para drogas
pelos	1 - 2g	Drogas de abuso: incorp. mediata (alta tecnología)

2.3. Aspectos adicionales relacionados con la toma y conservación de muestras para análisis de drogas en fluidos biológicos

El personal que obtenga la muestra es responsable que se rotule y conserve apropiadamente antes que llegue al laboratorio y que sea transportado en forma adecuada, no solo desde el punto de vista de la preservación del envase o la muestra en sí sino también respetando las normas de bioseguridad; además de facilitar los documentos necesarios con todos los requerimientos pertinentes (puntos de pericia).

La toma de la muestra debe ser supervisada con el propósito que no sea adulterada o sustituida lo que llevaría a la invalidación de la misma.

Es importante mantener las muestras en frío y en un lugar oscuro en el período de tiempo entre su toma y el ulterior análisis de las mismas.

Cuando la muestra llega al laboratorio se debe revisar y chequear contra las solicitudes de peritaje para asegurarnos que los datos coincidan plenamente.

En el documento de cadena de custodia debe aparecer toda aclaración que se considere pertinente para ilustrar el estado que se reciben los elementos a periciar y las notas que vienen adjuntas.

CAPÍTULO 3

ANALÍTICA TOXICOLÓGICA EN LOS ESTUDIOS POSTMORTEM

3.1. Generalidades

Toxicología Analítica es la rama de la toxicología que trata la aplicación de métodos y técnicas del análisis químico con el objeto de detectar, identificar y cuantificar la presencia de sustancias, que en determinadas circunstancias pueden originar daños a los seres vivos. Cabe señalar que algunos autores hacen hincapié en dar a esta especialidad de la toxicología una entidad independiente de la Química Analítica (Ojanperä, 2001). Su nacimiento y desarrollo corre paralelo al de la Toxicología Forense a partir de los inicios del siglo XIX, en el cual se hizo necesario contar con pruebas periciales que demostraran la presencia de un veneno determinado con el fin de aclarar los posibles orígenes homicidas de miembros de familias reconocidas en Europa (ej. el caso Lafargué involucraba arsénico; el caso Bocarmé, nicotina. Ambos episodios fueron mencionados por Fabre y Truhaut, 1976).

Los primeros avances del análisis toxicológico consistieron en la puesta a punto de métodos para identificar la presencia de determinados tóxicos en muestras de cadáveres recientes o exhumados. Podemos citar el método de análisis de arsénico de Marsh en 1836, la separación e identificación de arsénico y mercurio por Reinsh en 1841, la detección de fósforo por Mitscherlich en 1855, o la extracción e identificación de la nicotina por Stas en 1850. Paralelamente y como necesidad de detectar la presencia de posibles sustancias extrañas, se hizo necesario desarrollar métodos generales de separación y aislamiento de sustancias tóxicas en muestras de fluidos y tejidos (Müller, 1995). Son Stas y Otto en 1855 quienes proponen una sistemática para el aislamiento de alcaloides, la cual, con ligeras modificaciones ha extendido su aplicación al análisis de tóxicos orgánicos en general por más de 150 años (Repetto, 1997). Esta técnica fue utilizada por el Laboratorio de la Asesoría pericial de los Tribunales de la Provincia de Buenos Aires hasta 1992, donde se reemplazó por las técnicas de columnas con rellenos especiales (tipo Extrelut-Merck®) y de extracción en fase sólida (S. P. E). Las técnicas de micro extracción en fase sólida (S. P. M. E) comenzaron a utilizarse en nuestro laboratorio en 1999.

Los métodos analíticos primitivos empleaban reacciones cualitativas basadas en la generación de color, formación de precipitados o cristales coloreados y métodos separativos de sublimación, destilación o extracción líquido-líquido.

A partir de 1950, comenzaron a aplicarse varias técnicas fisicoquímicas al análisis toxicológico, entre ellas la espectrofotometría, en el rango de radiación visible y ultravioleta; más recientemente hizo su entrada la espectrometría infrarroja y la espectroscopía de resonancia magnética nuclear, técnica ésta de aplicación muy restringida en toxicología, hasta hoy.

Un gran avance en el análisis toxicológico se inició con la utilización de las técnicas cromatográficas en papel, aproximadamente a partir de 1952 y en capa fina en la década de 1960. La fecha clave es 1965 en la que empezó a desarrollarse la cromatografía en fase gaseosa y posteriormente la cromatografía líquida de alta resolución que permiten, mediante el uso de fases estacionarias y de gases o fases líquidas muy diversas y de detectores basados en las distintas propiedades o naturaleza de las sustancias a detectar, contar con una amplia gama de procedimientos analíticos aplicables a familias o grupos diferentes de tóxicos de naturaleza orgánica; además de facilitar la identificación y acortar los tiempos de análisis, permiten la cuantificación de la droga con una mayor exactitud (Maes, 1987; Pflieger et al, 1992; Poletini, 1996; Bogusz, 2000; Dawling, 2004; Kupiec et al, 2004).

Tradicionalmente se han usado diferentes tipos de microensayos químicos que en forma presuntiva y rápidamente dan información cualitativa sobre la presencia de tóxicos individuales, o de grupos y/o familias de medicamentos y drogas. Los resultados de estos ensayos y procedimientos, conocidos usualmente como "métodos de rastreo", deben ser confirmados por otras técnicas o recursos de mayor capacidad identificativa y que posteriormente permitan la respectiva cuantificación. (Mellone, 2001). La evolución de estas técnicas ha permitido arribar al actual auge de los métodos de inmunoensayos, fundamentalmente desarrollados para muestras líquidas con bajas interferencias de la matriz, tales como orina, aguas y sueros (Maes, 1987; Standefer, 1995; Spiehler, 2004).

Respecto a los procedimientos de separación y aislamiento de tóxicos de las diferentes matrices, también se produjeron avances importantes desde la primera sistemática propuesta por Stas y Otto en 1855. La introducción de modificaciones en ésta última, mejoraron los rendimientos en la separación de los analitos en distintas muestras, por extracciones líquido-líquido, utilizando disoluciones acuosas a pH diferentes o distintos disolventes orgánicos, o mezclas de estos, cuyas tensiones iónicas o polaridades favorecen la especificidad y eficacia del proceso extractivo.

El uso de las técnicas analíticas de cromatografía de gases y líquida de alta resolución permiten utilizar micrométodos de extracción directa en pequeños volúmenes de líquidos a pH tamponados, también con pequeñas cantidades del disolvente extractor en tubos de ensayo cerrados, evitando el uso de ampollas de decantación, minimizando así el tiempo de análisis. Esto además disminuye notablemente la cantidad de disolventes orgánicos requeridos para la extracción y evita en muchas ocasiones la necesidad de eliminar por evaporación al disolvente. Todas estas circunstancias permitieron mejorar los límites de detección, incrementar la exactitud y disminuir apreciablemente dichos límites de los analitos, gracias a que puede añadirse a la matriz exiguas cantidades de patrones internos indirectos o directos deuterados (análogos deuterados).

Una importante mejora en el análisis de compuestos orgánicos ha sido la utilización de métodos de **extracción en fase sólida (SPE)**, que usan pequeñas columnas rellenas de gránulos de fases sólidas apolares, polares o de resinas iónicas. Más recientemente se han implantado resinas mixtas, constituidas por fases sólidas apolares y/o polares funcionalizadas con grupos intercambiadores iónicos ácidos o básicos. Puede afirmarse que prácticamente en la actualidad estos métodos de extracción en fase sólida han desplazado a los métodos anteriores debido a su rapidez, obtención de extractos de alta pureza, costo (este es elevado en la etapa de adquisición del sistema de cámara de vacío, pero es compensado en el tiempo con el ahorro de disolventes de pureza analítica) y mejora en los límites de detección, así como los porcentajes de recuperación o extracción de los analitos (Van Horne, 1985; Marko et al, 1990; Quattrocchi et al, 1992; Chen et al, 1994; Cowan y Houghton, 2004).

Otro notable avance ha sido la introducción de los denominados métodos de **micro extracción en fase sólida (SPME)** que permiten la extracción de tóxicos volátiles de muestras gaseosas, líquidas o de vapores liberados por difusión a espacios cerrados o confinados (recipientes). El analito volátil se absorbe sobre fases estacionarias, idénticas a las utilizadas en cromatografía gaseosa, unidas químicamente a fibras muy finas de sílice fundidas insertadas en la aguja de una jeringa. Posteriormente, tras la inyección en un cromatógrafo de gases o de líquidos de alta resolución, se procede a la desorción del analito y el correspondiente análisis cromatográfico, evitándose así la presencia de sustancias interferentes constitutivas de la matriz a analizar (Pawliszyn, 1997, 2000).

La evolución de la pesquisa de compuestos inorgánicos puede abordarse contemplando en forma separada, el análisis de los elementos, cationes metálicos y aniones.

Los ensayos iniciales por métodos que generan color o las reacciones de precipitación, fueron sucedidos por los métodos fotocolorimétricos y posteriormente por los procedimientos espectrofotométricos de emisión.

Sin duda alguna la posterior introducción de la técnica de espectrofotometría de absorción atómica (AAS), utilizando diversos procedimientos para conseguir el paso del elemento metálico desde la matriz analítica a su estado fundamental, ha supuesto uno de los avances analíticos más importantes en su aplicación al análisis toxicológico, al conseguir disminuir varios órdenes de magnitud los límites de detección y cuantificación.

Por otro lado, las Ciencias Forenses han aprovechado los frutos de estos adelantos utilizando por ejemplo, el método para la determinación de Antimonio, Plomo y Bario en el análisis de restos de deflagración de pólvoras con objeto de establecer presencia de restos de *primer o iniciador* y la determinación de distancia de disparo. En éste último caso se manejan niveles de corte del orden de la ppb (parte por billón). El generador de hidruros acoplado al AAS y el uso de los hornos pirolíticos ha incrementado los niveles de detección en forma asombrosa (Margot y Romolo, 2001).

Las muy recientes mejoras tecnológicas y electrónicas han mostrado la importancia de la espectrometría de emisión, al conseguir mediante el uso de fuentes de alta energía el estado de plasma, dando lugar a las técnicas de espectrometría de emisión de plasma (ICP). Estas técnicas permiten efectuar con suma velocidad y exactitud análisis secuenciales de conjuntos de elementos, según las necesidades concretas de cada tipo de análisis.

El análisis de aniones experimentó un notable avance con la posibilidad de analizar aniones específicos, cianuros, sulfuros, fluoruros, etc., utilizando la potenciometría con electrodos, cuya membrana selecciona específicamente el anión a determinar. Al responder a la ley de Nernst, el intervalo de concentraciones es mucho más amplio que el de las técnicas analíticas que cumplen la ley de Beer-Lambert, incrementando las posibilidades de cuantificación de la muestra original sin tener que efectuar diluciones.

La investigación simultánea de varios aniones en muestras líquidas se ha conseguido con notables mejoras tras la introducción de la cromatografía líquida iónica (IC), que usando columnas apropiadas permite no sólo identificar y cuantificar aniones, sino también cationes. Esto último facilita la especiación tanto de aniones como de cationes metálicos.

Es conveniente también resaltar las notables posibilidades y mejoras analíticas que se abren con la introducción de la electroforesis capilar (EC) en sus muy distintas modalidades y las

posibilidades de usar diferentes detectores, incluso el acoplamiento a espectrómetros de masas (Tagliaro et al, 1996; de Zeeuw, 1998; Moffat et al, 2004).

A pesar de las grandes expectativas que fueron puestas sobre esta metodología, encuentra hoy poca aplicación en Toxicología Forense y disciplinas relacionadas. Ha sido usada para el aislamiento de algunas drogas en suero, tal como benzodiazepinas y agentes anabólicos. Los resultados obtenidos son similares a los alcanzados con la extracción en fase sólida (SPE), pero con un costo demasiado alto como para justificar su uso rutinario (Staub, 1997; Allen et al, 2000).

Hoy día la detección de xenobióticos en matrices biológicas es una tarea ardua y compleja, no solo por ser necesario equipamientos relativamente caros, sino también porque aparecen entidades químicas diferentes a las de origen, por transformación parcial o total de las mismas en el organismo. Esto representa un desafío en cuanto a la alta calidad profesional que se espera por parte de los químicos, como así también el desarrollo de técnicas de laboratorio lo suficientemente sensibles y específicas, además de contar con los patrones de referencia de las drogas y sus posibles metabolitos.

Debido a esta amplia variedad de sustancias que pueden estar presentes en un determinado fluido o matriz, se hace casi imposible diseñar un esquema único para aislamiento y determinación de las mismas.

La Tabla 2 que presenta algunos ejemplos, consigna los métodos de aislamiento que se aplican con mayor frecuencia en la investigación de grupos de tóxicos.

3.2 Análisis de matrices biológicas para la detección de drogas

Debido a la disparidad en el origen de las muestras, existen varios procedimientos de rastreo

3.2.1. Preparación de la muestra

Este paso es crucial en los análisis. Generalmente involucra la homogeneización de las muestras, ajuste de pH, pesaje, procedimiento de hidrólisis (ácida, básica o enzimática), precipitación, centrifugación, etc.

Debido a la complejidad de las muestras biológicas esta etapa es relevante. Si no es bien desmenuzado el tejido separado para el estudio, el rendimiento en la etapa posterior de extracción será bajo; el peso debe ser exacto para realizar futuras cuantificaciones de analito y referirlo a la alícuota de tejido tomado. En los casos de extracción directa con disolventes orgánicos, debe homogenizarse muy bien la papilla con un desecante como sulfato de sodio anhidro, llevando a consistencia tal que los gránulos formados se deslicen fácilmente, es

decir, que el tenor de humedad permanezca tan bajo como sea posible; o bien, para el ulterior aislamiento por extracción en fase sólida, deberá estar finamente dividido para un mejor contacto con el disolvente extractivo. Nunca se insistirá demasiado en este aspecto, debiendo reconocer como lo hace Skoop (2004), que la mayor cantidad de errores se originan en la fase preanalítica dependiendo del estado físico de la sustancia, solubilidad y de la naturaleza físico-química de la muestra en cuestión.

Independiente de la modalidad del análisis, tendremos cinco pasos fundamentales, cuya comprensión es de extrema importancia para obtener buenos resultados, y cada uno de ellos representa prácticamente un campo dentro de la toxicología analítica.

Tabla 2. Clasificación de los tóxicos que comúnmente se investigan, por grupo y método de aislamiento aplicado

GRUPO	MÉTODO DE AISLAMIENTO	EJEMPLO
Aniones	Diálisis	Clorato, fluoruro, hipoclorito, persulfito, nitrato, etc.
Metales	Destrucción de la materia orgánica o digestión por microondas	Asrsénico, antimonio, plomo, mercurio, cromo, cadmio, litio
Gases	Destilación fraccionada Microdifusión Espacio-cabeza / GC SPME- GC	Monóxido de carbono, ácido cianhídrico, gas sulfhídrico, gases anestésicos, etc.
Tóxicos volátiles	Destilación fraccionada Espacio-cabeza/ GC Microdifusión SPME- GC	Etanol, metanol, aldehídos, ácido fórmico, tolueno, acetona, naftas, etc.
Pesticidas	Extracción líq-líq Método AOAC (DMSO- Florisil) SPME-GC	Órganofosforados, órganoclorados, carbamatos, piretroides
Drogas	Extracción líq.-líq. SPE; Extrelut; SPME	Psicofármacos y no psicofármacos

3.2.2. Aislamiento del analito

El método de aislamiento dependerá de la naturaleza del tóxico que se quiere aislar. En el caso de los tóxicos orgánicos fijos, la tendencia ha sido desde extracciones sencillas con disolventes orgánicos tales como cloruro de n-butilo, que fue uno de los primeros solventes reconocido como extractor selectivo de drogas; las extracciones con sales y con solventes, o sea los métodos de “*salting out*”, hasta la de uso más extendido hoy como la extracción en

fase sólida (SPE), la cual presenta muchas ventajas con respecto a todas las anteriores como son: mayor selectividad, ahorro de solventes y de tiempo, extractos más limpios y mayor recuperación de los analitos, como fuera expresado precedentemente.

Existen abundantes publicaciones que comparan la extracción líquido-líquido con la SPE, demostrando cada vez más sus ventajas. No obstante ello la extracción se sigue usando, dependiendo de los recursos con que cuenta cada laboratorio (Clarke, 1986; Müller y Giebelmann, 1995; Moffat et al, 2004). También puede mencionarse el empleo de la micro extracción en fase sólida (SPME) como método de aislamiento que permite separar trazas de tóxicos y metabolitos, que no pueden ser extraídos por SPE.

3.2.2.1. Métodos para la extracción de tóxicos orgánicos fijos

A comienzos del siglo pasado poco menos de 50 drogas podían ser clasificadas como tóxicos orgánicos fijos, pero con el impresionante desarrollo de la industria química y farmacéutica, después de la Segunda Guerra Mundial, esta circunstancia ha quedado solo como anécdota, frente a los miles de compuestos peligrosos a que está expuesto el hombre en la actualidad. Asimismo, el conocimiento creciente sobre los procesos biotransformadores de las drogas en el organismo y el rol que cumplen los productos de biotransformación (metabolitos), como marcadores o indicadores toxicológicos, ha hecho de los métodos de aislamiento uno de los pasos más delicados en el proceso de análisis de las drogas en estas matrices complejas.

Para el aislamiento se cuentan con distintos métodos. Unos tienen por objeto obtener un extracto acuoso libre de proteínas (EALP). Los métodos ortodoxos en este sentido son:

3.2.2.1.1 Método de Stas-Otto-Kohn Abrest

Basado en la precipitación con alcohol etílico de las proteínas constituyentes del tejido, previo tratamiento con ácido tartárico. El licor extraído por filtración es evaporado a presión reducida, utilizando para ello un pequeño motor de medio HP, con el objeto de evitar la descomposición de drogas termolábiles. El extracto siruposo obtenido y en caliente, es tratado nuevamente con alcohol etílico y dejado durante 24 horas, volviendo a repetirse el proceso en tres ciclos. Finalmente se retoma el residuo con solución acuosa sulfúrica o tartárica al 5%. Se obtiene un EALP, apto para su fraccionamiento con disolventes orgánicos. Ventajas: Se pueden trabajar mejor las muestras en avanzado estado de putrefacción (por ejemplo vísceras procedentes de exhumaciones) y es relativamente sencillo. La desventaja es que posee bajo rendimiento debido a la formación de flóculos en las etapas de precipitación del método.

A. Curry (1976) consigna algunos porcentajes de recuperación para diversas drogas, pero siempre son pequeños (generalmente menores al 30%). Además el extracto es bastante impuro y requiere ulteriores etapas de purificación.

3.2.2.1.2. Método de Alan Curry

Consiste en tratar la papilla finamente dividida con solución al 50% de tungstato de sodio. Si se tiene certeza que no hay drogas termolábiles puede calentarse hasta 70-80°C y filtrar en Kitasato a presión reducida. Los extractos son bastante limpios. Es un buen método para aislar drogas de naturaleza ácidos débiles (fenacetina, dipirona, ácido acetilsalicílico, barbitúricos, hidantoínas, etc.) No es bueno para drogas de naturaleza base débil.

3.2.2.1.3. Método de Daubney- Nickolls

El homogenato es tratado con sulfato de amonio, calentado y dejado en digestión durante varias horas. Luego es filtrado y el EALP esta listo para la extracción con disolventes orgánicos. Tiene buen rendimiento para drogas básicas (antidepresivos tricíclicos, cocaína, fenotiacinas, etc) pero muy pobre para drogas de naturaleza ácida.

3.2.2.1.4. Método de Fassi: Este método de extracción directa, fue ideado por el toxicólogo argentino Agustín Fassi (1954), basado en las técnicas de Kohn Abrest y Le Breton, que permiten el agotamiento cuantitativo y reducir a la vez el tiempo requerido con las técnicas clásicas. La Fig.2 muestra el dispositivo ad hoc creado para evitar el tedioso método de extracción directa mediante soxhlet. Este dispositivo lleva lana de vidrio comprimida dentro del tetraedro formado por las tres proyecciones de vidrio. Se evita así que el material biológico obture el canal por donde fluye el disolvente extraído desde la ampolla de decantación.

La muestra desecada es dejada unas dos horas en contacto con el disolvente extractor (generalmente eter etílico y cloroformo) agitada cada quince minutos. Se toma el eluido en un vaso de precipitados pequeño y posteriormente se evapora y retoma con 1 ml de etanol pureza analítica.

Esta técnica, con algunas modificaciones, es generalmente la más usada en laboratorios forenses de nuestro medio y puede ser aplicada tanto a las vísceras, sangre, vómitos y alimentos.

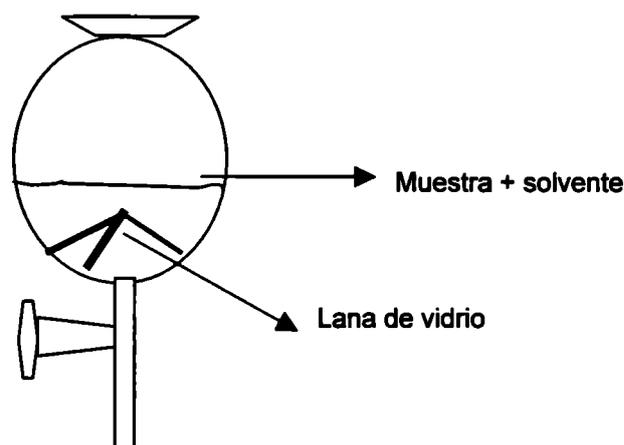


Fig. 2. Ampolla de decantación modificada (*ad hoc*) para la extracción directa según la técnica de Fassi.

Observaciones:

- Este método se emplea para muestras biológicas complejas.
- Se debe dejar, una vez mezclados los tejidos y el sulfato de sodio anhidro, en ambiente libre de humedad hasta que se seque y quede una muestra de consistencia granular deslizable en el recipiente donde se halla contenido.
- El agregado de ácido tartárico (ácido débil) tiene por finalidad formar las sales de las sustancias desconocidas de interés toxicológico que estén presentes y dejarlas en solución y lograr una primer desproteización.
- El sulfato de sodio anhidro elimina toda la humedad.
- No se usa calor y por lo tanto las sustancias termolábiles no son afectadas (si se sospecha efedrina o anfetamina se evaporará a temperatura ambiente ya que son compuestos muy volátiles).
- Si se utilizara una ampolla de decantación común esta deberá estar desprovista de aro de goma en el robinete ni tener tapón del mismo material, ya que se pueden producir interferencias y absorber en la zona del UV y presentar poder reductor.

3.2.2.1.5. Extracción en fase sólida (SPE)

La extracción en fase sólida como método alternativo a la extracción líquido-líquido para el aislamiento de drogas de fluidos biológicos ha ganado mucha popularidad por las ventajas que presentan, como son los altos rendimientos en la recuperación y la simplificación de la labor de manipulación.

En estas técnicas los sorbentes pueden ser de tres clases, de acuerdo a la naturaleza de la interacción que se lleve a cabo. De manera que tenemos sorbentes polares, no-polares y de intercambio iónico.

La mayoría de los reportes en cuanto a la extracción de drogas de fluidos biológicos se realizan con sorbentes no-polares (C_2 , C_8 , C_{18}).

De manera general todos estos procedimientos constan de 7 pasos fundamentales:

1. Acondicionamiento de la columna.
2. Aplicación de la muestra.
3. Lavado de la columna.
4. Ajuste de pH (si se lo requiere).
5. Secado de la columna.
6. Elución de la droga.
7. Concentración del extracto.

El principio es el mismo que utiliza la cromatografía líquida de alta resolución.

En el paso de acondicionamiento el solvente abre las cadenas hidrocarbonadas lo que permite el incremento del área superficial para una mejor interacción con los analitos. Antes de la aplicación de la muestra debe verificarse que no contenga residuos que puedan tapar la columna, por lo tanto se centrifugará previamente.

El lavado tiene como función fundamental remover selectivamente los compuestos endógenos de la matriz biológica para una elución posterior y obtener un extracto limpio. Existen muchas firmas que comercializan estos tipos de columnas, pudiéndose mencionar: WorldWide Monitoring, Analytichem International, Supelco, Superclean, Alltech, Extract.Clean, Bond Elut, Sep-Pak (ver Fig. 5).

3.2.2.1.5.1 Generalidades sobre el proceso de extracción

Se usan solventes y reactivos de grado HPLC. La SPE se realiza en columnas Clean Screen de un mililitro copolimérica (WORLD WIDE MONITORING® o similares). Estas contienen partículas de sílice de $40\mu\text{m}$ enlazadas químicamente a grupos alquilo (C_{18} , C_8) y a grupos bencenpropilsulfónico (intercambio catiónico). El relleno permite participar en ambas interacciones: no polares y de intercambio catiónico (Fig. 3 y 4).

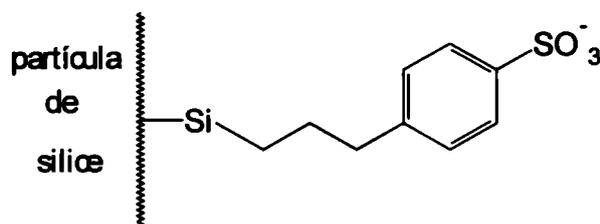


Fig.3 Fracción copolimérica de intercambio catiónico

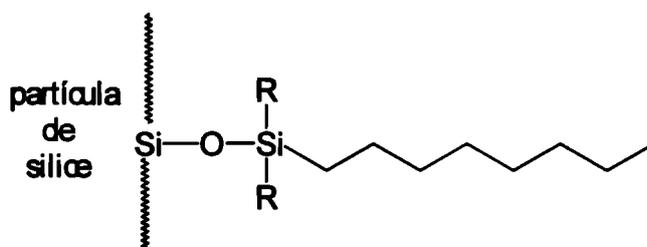


Fig. 4 Fracción copolimérica no polar

La Fig. 5 muestra el esquema de una columna con relleno de sílica y fase líquida unida a los silanoles y con grupos funcionales diversos según el tipo de analitos a separar. Las mezclas de disolventes extractivos son colocados en la parte superior del dispositivo, utilizando una pipeta.

Una bomba extractiva de un cuarto o medio caballo vapor (HP) es utilizada para facilitar el pasaje de la muestra a través del microrelleno que se halla muy comprimido. El acondicionamiento previo de la columna permite una disposición de las cadenas hidrocarbonadas y funciones orgánicas más adecuada para efectuar el proceso de partición entre la fase líquida del relleno y el eluyente.

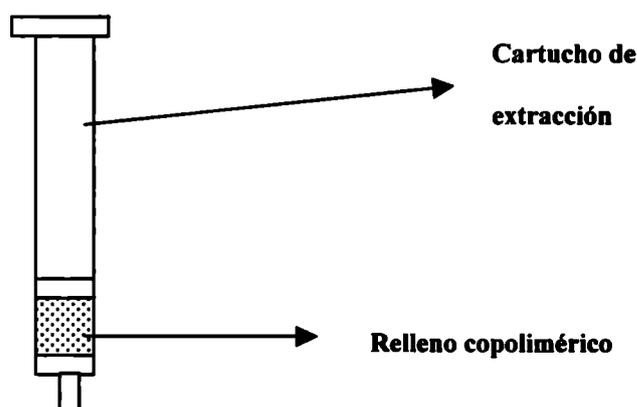


Fig.5 Dispositivo plástico conteniendo el relleno de sílica de fase unida para la separación y elusión de analitos

3.2.3. Concentración del extracto

El objetivo de este paso es colocar el analito en el menor volumen posible y de esta manera aumentar la sensibilidad de los análisis. En el caso de las drogas orgánicas, es importante conocer que la concentración de los extractos debe realizarse en condiciones controladas, aunque lo ideal es concentrar a temperatura ambiente y bajo corriente de nitrógeno.

3.2.4. Identificación del analito

En la identificación del analito existen diferentes niveles de complejidad dependiendo de las técnicas que se utilicen para la detección del mismo. Así, tenemos un nivel primario que utiliza técnicas de separación e identificación como la cromatografía en capa delgada (TLC) y la de alta resolución (HPTLC); la espectrofotometría UV como identificativa, además de las reacciones de color, como de orientación (colour test).

Un nivel secundario involucra técnicas tales como la cromatografía de gases y la líquida de alta resolución ya sea para rastreo como para la determinación orientada. Un nivel terciario utiliza la espectrometría de masas acoplada con una cromatografía separativa tal como la cromatografía de gases y la líquida de alta resolución (GC-MS, HPLC-MS). Esta última técnica (simbolizada también como LC-MS) está desplazando a la cromatografía gaseosa, especialmente a la GC-MS. La creación de bibliotecas para la posterior comparación y la superación de los problemas con la interfase han sido pasos tan importantes que los expertos estiman que LC-MS será la técnica que dominará la analítica toxicológica en la primera década del siglo XXI. El que escribe esta contribución ha notado el incremento de trabajos presentados, utilizando este tipo de técnica, en ocasión de congresos internacionales. Olaf Drummer, prestigioso toxicólogo australiano, ha manifestado que el mejoramiento en la detectabilidad y la especificidad fueron de la mano con el dramático desarrollo en la tecnología computacional. Hubiese sido imposible 20 años atrás aplicar la potencia computacional que se requiere hoy para el análisis de miles de compuestos y sus metabolitos (Drummer, 2002).

Antes de la aplicación de la cromatografía de gases y especialmente de la GC-MS es esencial la derivatización de los grupos funcionales, para la detección de drogas en niveles muy bajos. La derivatización mejora la especificidad, la sensibilidad y la precisión de los análisis. Además, se eliminan considerablemente en los cromatogramas las llamadas colas (tailing) mejorando así, la separación de sustancias conteniendo grupos funcionales tales como -COOH, -NH, -NH₂, -OH.

Los procedimientos de derivatización más utilizados son la silanización (con N, O-bis(trimetil)sililfluoroacetamida BSTFA), además de otras técnicas como la acilación con anhídrido pentafluoropropiónico (PFPA), alquilación y acilación.

3.2.4.1. Metodología para el análisis de drogas en fluidos biológicos sin orientación

Generalmente se recomienda seguir una estrategia que consiste en aplicar una técnica de rastreo inicial para descartar las muestras negativas y confirmar por otra técnica las muestras positivas.

Los rastreos de drogas de abuso en fluidos biológicos suelen realizarse en la mayoría de los laboratorios por una técnica de inmunoensayo o por cromatografía en capa delgada (TLC).

En orina la búsqueda se realiza directamente en las muestras mediante técnicas de inmunoensayo o por reacciones de coloración y también, luego de la extracción, mediante TLC.

Los **inmunoensayos** más utilizados son el IEE (Inmunoensayo Enzimático), el RIE (Radioinmunoensayo), IEF (Inmunoensayo Fluorescente), y el IEA (Inmunoensayo por Aglutinación).

Los tres primeros necesitan instrumentales que son relativamente costosos. Estas técnicas pueden ser utilizadas dependiendo de la disponibilidad con la que cuente cada laboratorio y de la cantidad de muestras a analizar, puesto que estos “KIT” tienen fecha de vencimiento y por ende deben adaptarse a la magnitud del trabajo.

Además existen ensayos simples, o sea para una sola muestra y ensayos en serie para realizar un conjunto de ensayos consecutivos; lógicamente los precios varían de acuerdo al tipo de inmunoensayo: simple o en serie.

En los inmunoensayos es muy importante seguir las instrucciones del fabricante en cuanto a los cuidados para llevar a cabo todos los procedimientos. Tienen la ventaja de presentar una alta sensibilidad y pueden ser aplicados directamente a muestras de orina y plasma sin previa purificación. Sin embargo, la baja especificidad es el mayor problema (muchas reacciones cruzadas).

La marcación puede ser radioisotópica mediante una enzima sustrato o un fluoróforo.

El sistema de detección puede medir radioactividad, absorbancia U.V, fluorescencia, fluorescencia polarizada, etc.

Las **reacciones de coloración** directamente en la orina tienen un uso limitado, solo algunas drogas pueden ser ensayadas por ejemplo: salicilatos, hidrocarburos halogenados, paracetamol, etc. En la Tabla 3 aparecen algunas de las reacciones de coloración en orina que son útiles en la fase inicial del análisis.

En el rastreo por TLC y HPTLC se utilizan placas de silicagel 60 F-254 (con indicador de fluorescencia), variando las fases móviles y los sistemas de revelado (Poole, 2004).

Estos procedimientos se llevan a cabo siempre después de la hidrólisis si hiciera falta y por supuesto luego de las extracciones, las que pueden ser en fase sólida o extracciones líquido-líquido. Luego del aislamiento se debe agregar HCl al 1% en etanol al extracto resultante para evitar las pérdidas de drogas básicas volátiles en el momento de la concentración del extracto.

Tabla 3. Algunas reacciones de color utilizadas en el laboratorio toxicológico forense en la fase analítica inicial.

MUESTRA	REACTIVO	RESPUESTA
2 gotas de orina	Cloruro férrico 5% (2 gotas)	<u>Violeta</u> : posibles salicilatos
0,5 ml de orina	Fujiwara: 0.5ml de KOH + 0.5ml de piridina. 100°C, 2'	<u>Rojo-Violeta</u> : posibles hidrocarburos halogenados
0.1ml de orina hidrolizada	1ml de o-cresol al 1% (2ml) NH ₃ 2M	<u>Azul</u> : posible paracetamol.

Una vez evaporados los extractos se reconstituyen en 100µl de metanol los que van a ser distribuidos en los diferentes sistemas de rastreo descritos en la Tabla 4.

Debido a que la mayoría de las drogas se excretan conjugadas en la orina es necesario realizar la hidrólisis para romper los enlaces entre el ácido glucurónico y las diferentes especies que se forman.

Estos procedimientos de hidrólisis serán abordados cuando se describan las técnicas de determinación directa.

Tabla 4. Sistemas de rastreo por cromatografía en capa delgada

Sistema	estándares	Fase móvil	reveladores
A	Pentobarbital	Cloroformo:acetona 90 : 10	1. Acetato de cobalto en metanol 0.5% 2. HgSO ₄ (5g deHgO + 20ml de H ₂ SO ₄)
	Fenobarbital		
	Amobarbital		
B	Meprobamato	Acetato de etilo	1ml de furfuraldehido en 20ml de
		Metanol	
		NH ₃	
		H ₂ O	

	Indometacina	43:5:0.5:1.5	acetona
		Acetato de etilo	
	Codeína	Metanol	Dragendorff
		NH ₃	
C	Propoxifeno	H ₂ O	
		43:5:0.5:1.5	Iodoplatinato
		Acetato de etilo	H ₂ SO ₄ -FeCl ₃ :
	Amitriptilina	Metanol	2ml FeCl ₃ 5% +
		NH ₃	40ml de agua +
D	Fluoperacina	H ₂ O	60 ml de H ₂ SO ₄
		43:5:0.5:1.5	
	Anfetamina		1. Sal Fast Black K1% en
	Efedrina	Metanol:NH ₃	H ₂ O(fresco)
E	MDMA	100:1.5	2. Vapores de NH ₃
			3. 2-4Dinitroflúorbenceno
	Benzodiazepinas	y Cloroformo:acetona	1.Rociado con HCl 10%
	derivados de la hidrólisis	40:10	2.ObservaciónUV 366nm
Be			(fluorescencia)
	TCH-COOH	Benceno (75)	1.Fast Blue B
		n-Hexano(30)	2. Reactivo de Duquenois
THC		dietilamina(5)	
	Morfina	Tolueno	1.Luz UV 254nm
	Codeína	Acetona	2, Dragendorff
	Heroína	Metanol	3, Iodoplatinato
OP		NH ₃	
		22:22:4:2	
	Cocaína		1.Dragendorff
	Metabolitos de estructura	Metanol:NH ₃	
Co	relacionada.	50:0.5	2.Iodoplatinato
	Cortes o adulterantes		

En la interpretación de los cromatogramas debemos tener en cuenta no solo la relación de frentes relativo de la muestra (Rf) que se está investigando sino también la forma y el color de las máculas, como así también el comportamiento post revelado.

El límite de detección para la cromatografía en capa delgada en general, tiene un valor entre 1 y 5µg, aunque en algunos casos ha podido bajarse diez o veinte veces.

Todas las placas deben exponerse al UV antes de atomizarse con los respectivos reveladores y anotar cualquier dato considerado importante.

El sistema A es selectivo para barbitúricos los que dan máculas blancas que pueden ser fugaces en la mayoría de los casos, por lo que se recomienda anotar los resultados inmediatamente después de rociada la placa. Una modificación efectuada por el autor de esta contribución consiste en usar secuencialmente el reactivo cloruro mercúrico-difenilcarbazona, que reacciona con las máculas resultantes de la aplicación del reactivo de Parry, transformándolas en violáceas intensas. Mediante este cambio se llega a diferenciar bien las máculas que pueden dar coloración confusa con el primer reactivo, generalmente atribuible a impurezas del extracto.

El sistema B es bastante selectivo para carbamatos, pero debemos tener en cuenta que todas las fenotiacinas dan coloración con furfuraldehído.

La combinación de Dragendorff-Iodoplatinato que se utiliza en el sistema C no tiene selectividad, debido a que muchas drogas responden a la misma; sin embargo hay otras que no se definen, como por ejemplo los barbitúricos, meprobamato y anfetaminas.

El sistema D es selectivo para fenotiacinas y antidepresivos.

El sistema E que usa Fast Black K no es selectivo, pero ha mostrado ser útil para la detección de anfetaminas, anfetaminas cicladas (ej. éxtasis) y compuestos relacionados, como también para drogas bloqueadoras β-adrenérgicas.

Los colores producidos con este reactivo son estables y se tornan más intensos a medida que pasa el tiempo. Las aminas primarias (como las aminas de putrefacción: cadaverina y putrecina) dan color violeta y las secundarias anaranjado.

Muchas drogas que responden en el sistema C tienen metabolitos que lo hacen en el sistema E, de manera que se torna más fácil la identificación preliminar (clorciclicina, propoxifeno, etc).

El sistema Be es muy selectivo para benzofenonas, lo que significa que lo es también para las benzodicepinas las cuales se convierten en sus respectivas benzofenonas por hidrólisis ácida.

El sistema THC es selectivo para cannabinoles.

El sistema Op se usa para la detección de opiáceos, fundamentalmente morfina.

3.2.5. Procedimientos de confirmación y cuantificación

3.2.5.1. Confirmación y cuantificación por cromatografía de gases

En la literatura especializada se reportan muchos métodos de confirmación de los resultados provenientes de los rastreos de drogas de abuso. La cromatografía de gases, no obstante su utilidad para realizar rastreos, es una magnífica técnica de confirmación, especialmente de las conclusiones obtenidas a través de los inmunoensayos y de los procedimientos de cromatografía en capa delgada.

La eficiencia de los métodos de confirmación por cromatografía dependerá en general de la columna cromatográfica en cuestión. Son muy útiles las columnas empacadas o capilares conteniendo fases estacionarias tales como SE-30, OV-1, SE-54, OV-17, OV-225, ya que sirven para la separación de una extensa gama de drogas ácidas y básicas.

Un aspecto importante es garantizar que las condiciones de la columna se mantengan estables durante los análisis, para esto como medida de precaución deben realizarse cromatografías de muestras controles antes y después de las muestras por confirmar. También las columnas deben acondicionarse por lo menos 30°C por encima de la temperatura a la cual se van a realizar los análisis y durante 15 horas, no debiendo sobrepasar la temperatura máxima recomendada por el fabricante. Cuando la droga se va a cuantificar es esencial realizar una curva de calibración al mismo tiempo que se están corriendo las muestras y por supuesto, las drogas correspondientes a la calibración deben estar en la misma matriz que las muestras por cuantificar.

Otro aspecto importante es que en la mayoría de los casos resulta esencial realizar procedimientos de derivatización, antes de proceder a los análisis cromatográficos.

La derivatización de los extractos, aunque prolonga el tiempo requerido para realizar un análisis, disminuye su costo, mejora la especificidad, la sensibilidad, la precisión, la linealidad, además de mejorar la estabilidad de los analitos y evitar la descomposición térmica de los mismos.

Son susceptibles de una derivatización las moléculas que contengan grupos funcionales tales como -COOH, -OH, -SH, y NH₂, y los procedimientos más utilizados son la silanización, (para compuestos que contienen grupos -OH, -NHR o NH₂) alquilación y acilación. También los hidrógenos activos en las moléculas suelen sustituirse por tres grupos alquilo.

Los agentes derivatizantes más utilizados en el análisis de drogas son:

- N,O-bis-trimetilsililtrifluoroacetamida (BSTFA).
- N,O-bis-trimetilsililacetamida (BSA).
- N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA).
- Hexametildisilano (HMDS) + piridina.
- Trimetilclorosilano (TMCS) + piridina.
- Anhídrido pentafluoropropiónico. (PFPA).
- Anhídrido trifluoroacético (TFAA).
- N-metil-N-ter-butildimetilsililtrifluoroacetamida (MTBSTFA).
- t-butildimetilsililtrifluoroacetamida (TBDMTFA).
- Hidróxido de tetrametilamonio (TMAH).
- Anhídrido heptafluorobutírico (HFBA).

De modo que la silanización, la alquilación y la acilación son los procedimientos de derivatización más utilizados en los análisis de droga por Cromatografía de gases o por CG acoplada con la espectrometría de masas.

Es importante hacer notar que los derivados se preparan poco tiempo antes de realizar los análisis, debido a que algunos de ellos se pueden descomponer.

A modo de ejemplos citaremos algunas técnicas de confirmación por cromatografía de gases reportadas por los expertos de las Naciones Unidas.

3.2.5.2. Confirmación y cuantificación por Cromatografía Líquida

3.2.5.2.1. Generalidades

La introducción de la cromatografía de gases en la década de 1950 y de la cromatografía líquida de alta resolución (High Performance Liquid Chromatography, HPLC), quince años después, dotaron a la química y a las ciencias de la vida con dos poderosas herramientas.

El postrer crecimiento de la cromatografía líquida (1970-1980) ha sido particularmente impresionante pero no sorprendente en vista de su amplia aplicación, con posibilidad de análisis de compuestos térmicamente inestables, que exhiben baja volatilidad, con altos pesos moleculares y/o amplios rangos de polaridad (Poletini, 1999).

Una de las contribuciones más significativas a la cromatografía líquida como técnica analítica de rutina fue la introducción de la fase reversa químicamente enlazada, ya que puede ser usada para una gran variedad de compuestos orgánicos: no iónicos, ionizables e iónicos, con

la apropiada elección de aditivos en las fases móviles, dentro de las limitaciones de los pKa y de pH.

Además de esta versatilidad, que ha permitido resolver los problemas de separaciones, ofrece la posibilidad de inyección de muestras acuosas, considerada inicialmente como una gran ventaja y de distintos sistemas de detección tales como ultravioleta-visible, fluorescencia (natural o formación de derivados pre o post-columna), electroquímico, etc.

Sin embargo dos cuestiones han dificultado su utilización para el barrido de compuestos en una sistemática toxicológica:

1ª. La necesidad de establecer una colección de datos de tiempos de retención, ya que en HPLC están influenciados por la reproducibilidad de los mismos (incluso con idénticos materiales empaquetados), diferencias en parámetros técnicos e instrumentales, tamaño de columna, volúmenes muertos y diferente precisión en los sistemas de bombeo con la consecutiva variación en la composición de la fase móvil o perfil del gradiente (Bogusz et al, 1991).

2ª. La baja especificidad de una detección a longitud de onda simple, en el ultravioleta-visible, que es el método de detección más usado (Logan et al, 1990).

3.2.5.2.2. Estado del tema.

Los avances tecnológicos en los equipos, columnas y detectores han mejorado el control de los factores que afectan el comportamiento de la retención y la reproducibilidad.

A pesar de la buena situación actual de la HPLC en el análisis toxicológico, se siguen presentando problemas que podemos clasificar como:

- Relacionados al instrumental: presión, fugas, chequeo de válvulas, mezcladores, lámparas del detector etc. Suelen ser simples después de identificarlos, aunque son tediosos. Pueden prevenirse con un buen mantenimiento.
- Relacionados a la separación propiamente dicha: línea de base, tiempos de retención (cambio de columna, fases móviles, tipo de columna, temperatura), perfiles de los cromatogramas (colas en los picos, picos fantasmas, negativos, dobles o asimétricos, anchos), inestabilidad del detector, etc. El comportamiento es obvio pero suele ser difícil identificar el problema y a veces imposible de corregir.

En algunos casos se sigue aprovechando la posibilidad de inyección de muestras acuosas o bien la filtración y precipitación directa con disolventes. Sin embargo, la complejidad de los fluidos biológicos y los casos en que bajas concentraciones pueden ser tóxicas, aconsejan efectuar extracción, purificación y concentración, o bien en forma independiente a la determinación, donde la fase sólida compite con la extracción líquido-líquido, o en línea con el cromatógrafo, mediante el uso de pre-columnas para pre-concentración y purificación y posterior envío a la columna analítica (column switching), pre-tratamiento con diálisis entre otros. Estos sistemas permiten la inyección directa de la muestra sin pérdida de analitos durante pasos críticos como la evaporación, mejorando la recuperación, sensibilidad y reproducibilidad (Deinl et al, 1999; Drummer, 1999).

Respecto a las columnas, las fases estacionarias de gel de sílice (fase normal), quirales o de exclusión molecular son sistemas que se encuentran patentados. La fase reversa químicamente enlazada sigue siendo la más usada para compuestos de interés en la sistemática toxicológica. La producción de fase reversa de alta pureza, libre de metales y desactivada es quizás el más importante desarrollo en este tipo de columnas en los últimos 15 años. Debido a recientes avances se ha conseguido una distribución homogénea de la acidez de los grupos silanoles, con lo que las columnas son más estables y generan picos reproducibles, agudos y simétricos; sin embargo no llegan a evitar las colas de algunos compuestos básicos que requieren la adición de una base competitiva a bajos pH o la adición de contraiones (par iónico) para compuestos fuertemente ácidos o básicos (Gupta, 1992; Poletini, 1999).

En general se considera preferible trabajar con elusión isocrática, ya que la retención es más reproducible. La contribución al fondo por parte de la fase móvil en el espectro de UV-Vis no cambia durante el cromatograma y el análisis cuantitativo es más eficaz. Sin embargo para cubrir el amplio rango de compuestos se han propuesto eluciones en gradiente o columnas con diferente fase estacionaria acopladas en serie (Drummer, 1999; Kupiec et al, 2004).

A estas mejoras en la separación se ha unido la generalización en el uso del detector de fotodiodos (Diode Array Detector, DAD) que posibilita la obtención de datos del espectro UV durante el tiempo de cromatograma y la detección de impurezas, aplicando el estudio de multicomponentes para análisis cuantitativos válidos independientemente de la resolución o anchura de pico. Es muy versátil y ofrece importantes ventajas, comparado con el detector UV convencional, en el barrido de muestras desconocidas (Lambert et al, 1997). Otros tipos de detectores (fluorescencia, electroquímico) más sensibles y específicos, no se utilizan en

barridos de muestras desconocidas ya que suelen necesitar que se aplique derivatización, además de no permitir eluciones en gradiente (Theodoridis et al, 1995).

El potencial del detector de fotodiodos para picos no resueltos fue un progreso en el análisis de muestras biológicas, de naturaleza muy compleja. Junto con la HPLC ofrece la posibilidad de utilizar la retención cromatográfica como parámetro de identificación, ya sea manejando escalas de índices de retención o tiempos de retención relativos con el consecuente intercambio de bases de datos de HPLC-DAD para posibles cotejos inter-laboratorios, o unidades de tiempo de retención en usos intra-laboratorio (Elliott et al, 1998; Bogusz, 1991, 1999). Esto dió lugar a la publicación de numerosos trabajos en los que se describen aplicaciones de la HPLC a la detección de un gran número de compuestos, principalmente en la sistemática toxicológica (Koves, 1995; Drummer, 1999; Poletini, 1999; Stimpfl et al, 2003; Marquet et al, 2003; Kupiec et al, 2004).

Sin embargo y a pesar de las purificaciones cuidadosas, ciertas interferencias pueden inducir a resultados falsos positivos o impedir la apropiada identificación y posterior cuantificación de los compuestos de interés; además de la limitada especificidad del espectro UV y su variabilidad como función del pH. Por esas razones los toxicólogos han estado esperando el acoplamiento entre HPLC y el espectrómetro de masas. La interfase ha sido siempre el punto débil en dicho acoplamiento ya que tiene que eliminar la fase móvil y transformar las moléculas, disueltas en dicha fase, en iones en fase gaseosa y sin degradación térmica (Marquet y Lachâtre, 1999). Se han usado diferentes tipos de interfases, analizadores de masas y modos de detección. Sin embargo, la bibliografía más reciente en toxicología analítica apunta a las que utilizan ionizaciones a presión atmosférica, electrospray e ionización química en combinación con detector de espectrometría de masas (Bogusz, 2001; Kupiec et al, 2004) o bien tandem masas-masas (Maurer, 1998). Ambas interfases suelen estar instaladas en el mismo instrumental y pueden seleccionarse indistintamente. Respecto a la sensibilidad, como una función de las polaridades de los analitos, son complementarias (Hoja et al, 1997).

3.2.5.2.3 Tendencias futuras

Aunque toda previsión de futuro conlleva un riesgo, se intuye que la cromatografía líquida mantendrá su eminente posición como herramienta en la toxicología analítica, con el consecuente cambio y adaptación.

Seguramente habrán de ser más exigentes con la estabilidad química y el aumento del período de vida de las columnas. En los últimos años no se aprecia una tendencia clara a menor tamaño ni diámetro, a pesar que ello reduciría el uso y costo de disolventes y disminuirían los requerimientos para acoplar el detector de masas (Maurer, 1998).

La combinación de la versatilidad en la separación por HPLC con la selectividad de la detección por espectrometría de masas, con interfases a presión atmosférica, tendrá que salvar los obstáculos que todavía limitan su aplicación, especialmente en lo que respecta a la reproducibilidad de los espectros de masas, condiciones de ionización estandarizadas y estudios sistemáticos, decisivos para constituirse en técnica de identificación en toxicología (Poletini, 1999; Bogusz, 1999; Kupiec et al, 2004). Otro factor limitante es su alto costo de adquisición y mantenimiento aunque con el tiempo indudablemente se harán más bajos y de mejor respuesta ante inconvenientes técnicos (Maurer, 1999; Drummer, 2002).

Sin embargo su introducción en el análisis toxicológico ha abierto nuevas perspectivas de determinación simultánea de grupos de compuestos no derivatizables y metabolitos polares (Bogusz et al, 1998).

En la actualidad ninguna técnica instrumental es autosuficiente para el barrido de todos los compuestos, es por ello que asistiremos a la generalización de acoplamientos, quizás en algunos casos sofisticados, lo que ya supone nuevas estrategias analíticas.

3.3. Rastreo rápido para drogas básicas, ácidas, neutras y sus metabolitos en fluidos biológicos y tejidos por HPLC con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD).

En este método se usa la extracción en fase sólida por medio de rellenos de intercambio catiónico e interacciones hidrofóbicas para aislar las drogas y/o metabolitos del fluido o preparado de tejidos, ya sea con propósitos forenses post-mortem, antidoping, laborales preocupacionales o bien clínicos.

Por esta técnica se pueden extraer con alta eficiencia gran cantidad de drogas en orina, plasma, contenido estomacal, preparado de vísceras, alimentos, medicamentos, etc.

Para la identificación y caracterización en rastreos de drogas mediante métodos cromatográficos, la programación de temperaturas (gradiente) en cromatografía gaseosa capilar es de aplicación frecuente, por que mediante una simple corrida pueden analizarse gran número de compuestos y obtenerse resoluciones altamente satisfactorias. En general la técnica GC/MS es preferida para la identificación estructural.

Sin embargo en GC es dificultoso analizar algunos compuestos polares, termolábiles y no volátiles.

El uso de RP-HPLC para rastreo de drogas no ha recibido la misma atención debido a las limitaciones de los detectores UV a longitud de onda simple (el método más ampliamente usado en los comienzos de la HPLC) y por la naturaleza selectiva de la separación. Usualmente se destina a separar algunos pocos componentes.

El advenimiento del detector UV/Visible por arreglo de diodos (DAD) para HPLC ha perfeccionado la selectividad de la técnica, de tal manera que este puede aportar datos múltiples acerca de cada pico, permitiendo la identificación a través de los tiempos de retención, espectros de absorción y coincidencia espectral, permitiendo inclusive asegurar, dentro de ciertos límites, la integridad de un pico cromatográfico.

Este detector, como es sabido, puede medir la señal no solo a una longitud de onda discreta sino todo el espectro de absorción completo en tiempo real, de modo que a las dimensiones habituales de tiempo y absorción, se agrega una tercera, la longitud de onda, permitiendo apreciar los detalles que escapan a detectores convencionales.

Monitoreamos y almacenamos de esta forma la información relativa a todo el espectro de absorción, y podemos luego manipular y recuperar la información de manera de obtener la mejor señal cromatográfica de un pico cromatográfico de interés.

Podemos así, obtener y apreciar los espectros bidimensionales clásicos $AU = f(t_r)$ y tridimensionales (AU, t_r, λ) .

La identificación se realiza a través de la comparación de los espectros UV y el tiempo de retención relativo (calculados con estándares internos). Existen bibliotecas espectrales de gran cantidad de drogas.

Esta técnica tiene el inconveniente de manifestar una pobre sensibilidad del DAD para drogas con baja absorción.

Con el software correspondiente podemos llevar a cabo un análisis espectroscópico derivado (primera, segunda, tercera y cuarta derivada) y determinaciones de pureza de pico (peak purity).

La combinación de la técnica de extracción en fase sólida (SPE) y la elución en gradiente por HPLC-DAD, mejora el rango de detección y especificidad y provee además una herramienta confiable y poderosa para la aplicación en el rastreo de drogas.

La técnica de HPLC-DAD se ha ensayado para la pesquisa de anabólicos, neurolépticos, diuréticos, drogas básicas, oligopéptidos, drogas ácidas y muchos otros compuestos.

CAPÍTULO 4

TOXICOLOGIA DE ALCOHOLES

4.1. Generalidades

Richardson, Richet y Rabuteau (Stewart y Stollman, 1960), enunciaron características físicas y químicas de los alcoholes en general, con el objeto de predecir su actividad biológica (especialmente su acción sobre el sistema nervioso central). Estas pueden resumirse diciendo: “La toxicidad de los alcoholes se incrementa a medida que aumenta el número de átomos de carbono, el punto de ebullición y disminuye su volatilidad” (la eliminación es más difícil cuanto menos volátil es el alcohol, manifestando una acción convulsiva más que anestésica).

En la labor rutinaria de un laboratorio toxicológico forense, los alcoholes constituyen un grupo objeto de investigación sumamente importante. Un estudio estadístico efectuado en la Asesoría Pericial de los tribunales platenses (Wamba et al, 1997) consigna la presencia frecuente de etanol en casos de suicidios y homicidios, como se desprende del análisis pericial postmortem. Este compuesto inclusive, es objeto de amplios debates en los juicios orales por cuanto debe establecerse el grado de afectación de un individuo según el grado alcohólico en sangre, con implicancias médico legales relevantes.

Respecto del metanol (alcohol de madera o alcohol metílico) sigue siendo una sustancia muy usada para diversos fines industriales e inclusive criminales. Debe recordarse el tristemente célebre caso de intoxicación masiva de vinos “estirados” con metanol que causó en Argentina, en el año 1993, 47 muertos y cientos de intoxicados que sobrevivieron a la intoxicación masiva, mucho de ellos, con secuelas severísimas. (Ferrari et al, 2003).

En cuanto a los glicoles, utilizados con diversos fines en la industria farmacéutica, refrigerantes o anticongelantes, etc., suscitan la atención en las investigaciones toxicológicas ya que periódicamente son objeto de envenenamientos accidentales o suicidas.

En nuestro país, la intoxicación masiva por jarabes de propóleos contaminados con dietilenglicol provocó la muerte de 29 individuos con medio centenar de personas afectadas (Ferrari et al, 1997).

A continuación se describen las características químicas, físicas y fisiopatológicas de alcoholes de importancia toxicológica, que serán abordados en este trabajo.

4.2. Alcohol etílico

El etanol, que puede producir en el hombre formas clínicas del estado de inconsciencia, ha cumplido durante siglos diversas funciones simbólicas, tanto en el orden religioso como social. Es bien conocida la importancia criminógena del alcohol, hallándose abundantes datos estadísticos que prueban la íntima relación que existe entre delincuencia y ebriedad (Coloccia y Argeri, 1969). Asimismo, consígnase el relevante número de accidentes vehiculares que son ocasionados por conductores ebrios (Goldaracena, 2001). Suicidios, lesiones y homicidios en los que se descubre la existencia de alcohol etílico (Wamba et al, 1997) y por último, los riesgos laborales de sujetos que se encuentran alcoholizados y la incidencia del tipo de tarea desarrollada y la manifestación del alcoholismo crónico (Arado y Guatelli, 1998).

Hansch y Leo (1979) habiendo calculado su coeficiente de partición (sistema octanol - agua: 0.70) demostraron su hidrosolubilidad, de donde se sigue que su pasaje a través de las membranas biológicas y difusión hacia la circulación general es rápida. La absorción en el epitelio bucal es pobre y en estómago apenas alcanza el 20%. El mayor porcentaje se absorbe en la primera porción del intestino delgado.

La ingestión anterior o simultánea de alimentos sólidos volverá más lenta la absorción por retardo en el vaciamiento gástrico. El ayuno en cambio acelera el paso de la bebida alcohólica al intestino delgado y por ende a la sangre. Lo mismo sucede con ciertas bebidas alcohólicas que contienen gas.

La impregnación de etanol en los tejidos dependerá de su contenido en agua. Así, la concentración de alcohol en cerebro será menor que en sangre y esta a su vez menor que en humor vítreo (Roine et al, 1989). Durante la etapa de distribución la concentración de alcohol es más alta en la sangre arterial que en la venosa, antes de alcanzar el equilibrio, viéndose favorecida la difusión pasiva y una pronta llegada al cerebro (muy irrigado).

Luego, el etanol se redistribuye desde los compartimientos periféricos al central, aumentando las concentraciones en sangre venosa. Finalmente se establece un equilibrio dinámico entre las concentraciones de alcohol en vena y arteria. El efecto tóxico del etanol dependerá de cuanto este impregnado el sistema nervioso central y éste de la concentración en sangre (Repetto, 1997).

El alcohol etílico como tal se excreta por orina, solo en un 10% del total absorbido y además en saliva, aliento, sudor, etc. Por aliento se elimina la mitad del valor señalado, según la ley de Henry de difusión de los gases, por lo que suele utilizarse en las determinaciones de

“alcohol test en aliento” para evaluar, por ejemplo, el grado de alcoholización en conductores de vehículos.

4.2.1. Metabolismo

Casi el 90 % de alcohol que ingresa al organismo es metabolizado, principalmente en el hígado.

En los últimos años ha comenzado a discutirse el significado toxicológico relativo de varias enzimas capaces de biotransformar el etanol a acetaldehído. La enzima alcohol deshidrogenasa parece ser la más importante. La catalasa es también apta para efectuar dicha biotransformación pero no se halla favorecida su acción, al menos que exista niveles apreciables de peróxidos, lo que no es usual en los hepatocitos. Una tercer enzima, “MEOS” (sistema de oxidasas microsomal hepático) está localizada en la fracción microsomal, con un requerimiento en NADPH y oxígeno para darse la transformación señalada. Sin embargo, el rol del sistema de oxidasas mixtas P-450 dependiente no ha sido aún aclarado totalmente (Casarett y Doulls, 1986). Otras enzimas pueden tener un rol significativo en la oxidación del etanol a acetaldehído y a radicales libres, principalmente en localizaciones extrahepáticas (Castro et al, 2001).

El próximo paso metabólico es la conversión del acetaldehído a ácido acético. Esta biotransformación se lleva a cabo mediante la enzima acetaldehído deshidrogenasa y NAD como cofactor. Mediante el ciclo de Krebs el acetato formado pasa a dióxido de carbono o bien participa en la síntesis de ácidos grasos, esteroides o cuerpos cetónicos. La Fig.6 ilustra el proceso sucesivo de transformación del Alcohol en el organismo.

El mecanismo por el cual el etanol produce daño hepático ha generado mucha discusión.

La cuestión se centra en establecer si la enfermedad hepática alcohólica es resultado de una acción directa del etanol (o los productos de biotransformación, principalmente el acetaldehído) sobre el hígado o el resultado de la deficiencia nutricional que acompaña el consumo de alcohol excesivo.

Es ampliamente admitido no obstante, que el acetaldehído juega un rol importante en los efectos deletéreos.

Químicamente es más reactivo que el alcohol, ya que posee un carbono “carbonílico” con posibilidades de formar una especie química reactiva que interactúa con proteínas de los diversos tejidos, formando además aductos, que conducen, en última instancia a la peroxidación lipídica con lesiones mitocondriales (Masini et al, 1994).

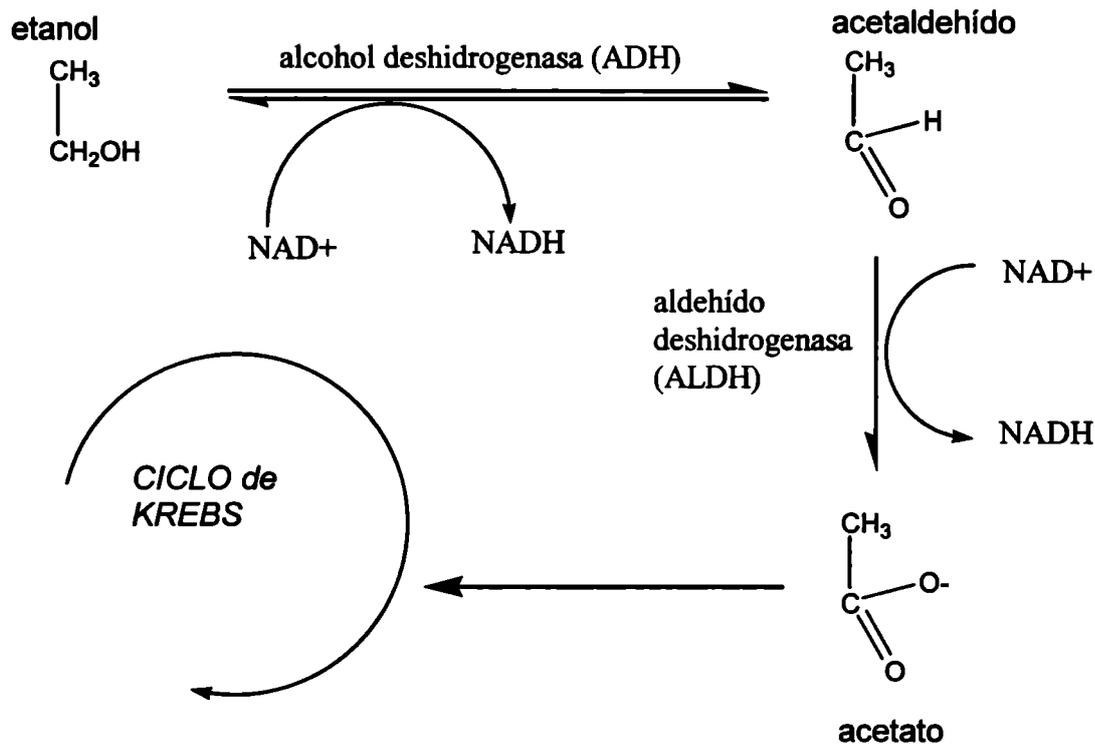


Figura 6. Biotransformaciones más importantes del alcohol etílico en humanos

El acetaldehído contribuye a la degradación de la vitamina B₆, a esto hay que sumar el consumo de la vitamina B₁ en el metabolismo alcohólico y la disminución de la vitamina B₁₂. El déficit de vitamina B₆ reduce el ácido gamma aminobutírico cerebral, lo que favorece temblores y convulsiones. El típico efecto de “resaca” o malestar posterior a las libaciones se observa más con vinos de alto contenido en aldehídos.

La aptitud de un individuo para biotransformar el alcohol depende de la funcionalidad de sus sistemas enzimáticos, así como la disponibilidad del NAD como cofactor.

Las vitaminas no influyen en la alcoholemia, excepto la vitamina C que aumenta la velocidad de oxidación. Las vitaminas del complejo B afectan, como se dijo, al déficit vitamínico y a los síntomas a nivel del sistema nervioso y neuromuscular.

Respecto de la fisiopatología, solo haremos mención a la acción del etanol sobre el sistema endocrino y la formación de sustancias psicoactivas que podría explicar la sintomatología en el delirium tremens.

Las catecolamina, noradrenalina y adrenalina aumentan a nivel sanguíneo luego de dosis moderadas o altas de alcohol lo que probablemente se debe a la secreción de CRF (factor hipotalámico de liberación de corticotrofina) que dará lugar a la segregación de ACTH y ésta a la de catecolamina. Repetto et al, 1997 consideran que este mecanismo puede jugar un rol

importante en el síndrome de abstinencia, ya que observaron durante el síndrome gran excreción urinaria de catecolamina. En cambio los alcohólicos crónicos no han demostrado aumento de excreción de catecolaminas por lo que estaría indicando una tolerancia al mismo. Cabe señalar que pequeñas cantidades de alcohol parecen inhibir la secreción de catecolaminas, probablemente como consecuencia de la relajación y disminución de la ansiedad.

Es importante considerar el papel que juegan diversos metabolitos, que podrían generarse entre el acetaldehído (metabolito del etanol) y las aminas biógenas. Davis y Walsh (citado por Repetto, 1995) obtuvieron la síntesis de tetrahidro-papaverolina (alcaloide) a partir de la dopamina. Cohen y Collins (Repetto, 1995) obtuvieron otras tetrahidro-isoquinolinas a partir de adrenalina y noradrenalina. Repetto y Martínez (Repetto, 1995) prepararon biosintéticamente un alcaloide relacionado con la harmina, partiendo de serotonina y acetaldehído. Teniendo en cuenta que los dos primeros son precursores biológicos de la morfina y la harmina es alucinógeno, no es impropio considerar que en la intoxicación alcohólica, estas sustancias, deben jugar un importante papel.

A continuación en la Fig.7 exponemos una posible interpretación del mecanismo bioquímico a través de la formación de bases de Schiff y posterior ciclización de la base para formar compuestos psicoactivos.

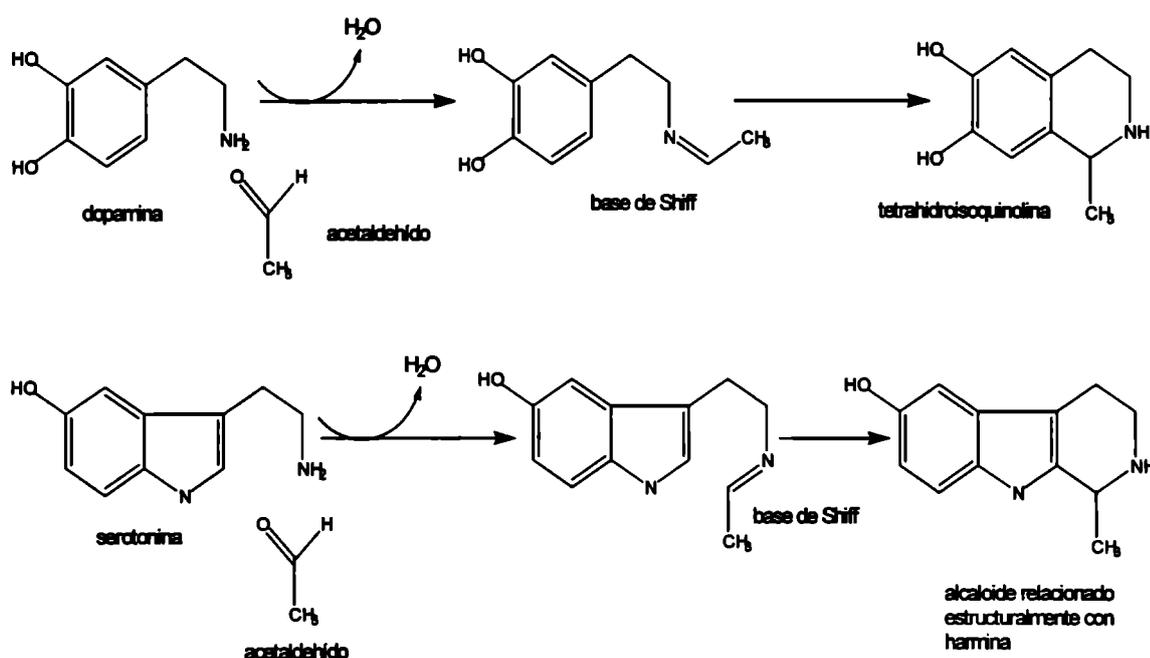


Figura 7 Mecanismo posible de generación de sustancias psicoactivas a través de la interacción entre neurotransmisores y acetaldehído producido en la primera etapa de biotransformación del etanol. (Consideración del autor)

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

Widmark en 1932, había enunciado que el metabolismo del alcohol transcurría orgánicamente a una velocidad constante, pero lentamente; agregando el célebre investigador francés Nicloux, que sucedía independientemente de la concentración. Widmark había además calculado que la velocidad de metabolización era de 0.15 gramos de alcohol por litro de sangre y hora (Abel, 1934).

La desintoxicación bioquímica es progresiva y dura aproximadamente unas 12 a 18 horas, dependiendo de múltiples factores como los genéticos, la habituación, ciertos estados morbosos, etc.

El ritmo de eliminación depende del coeficiente de etiloxidación, que expresa la cantidad de alcohol expresado en gramos, eliminado por minuto y por kilogramo de peso en un sujeto dado, cualquiera sea su concentración. Este coeficiente es llamado “constante \square de Widmark”.

En teoría debería realizarse una curva para cada individuo al que se desea efectuar cálculos retrógrados y con el fin de aumentar la certidumbre, pero debido a los inconvenientes que trae aparejada la experiencia, en la práctica suele utilizarse un valor promedio del coeficiente \square , sin variaciones apreciables debido a errores cometidos en los resultados a causa de diferencias individuales.

El siguiente gráfico ilustra una curva típica de absorción - eliminación, mediante las determinaciones de etanol en sangre (alcoholemia), y el tiempo transcurrido desde el acto de ingesta.

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

Prolongando hacia atrás la línea correspondiente a la eliminación, hasta cortar el eje de ordenadas, obtendremos el valor C_0 , correspondiente a la alcoholemia máxima teórica, suponiendo absorción inmediata y total de todo el alcohol. Este valor debería ser igual a la dosis de alcohol tomada por g de peso del individuo. Pero, experimentalmente se comprobó

que esto no sucede, sino que la relación D/Co es 0.7 para hombres y 0.6 para mujer, debido a la desigual distribución del etanol en los diferentes tejidos corporales.

La importancia del coeficiente β radica en que permite efectuar cálculos retrógrados de alcoholemia y determinar el alcohol ingerido por un individuo. Repetto (1995) considera que para aplicar los cálculos de alcoholemia retrospectiva, conforme al espíritu del Derecho y no perjudicar al acusado se puede tomar el valor mínimo de $\beta = 0.1$ gr. por mil, si esta expresado en horas; o bien 0.002, si esta expresado en minutos.

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

Es importante tener en cuenta que los cálculos en que involucramos β , sólo tienen validez en la etapa de eliminación, es decir, en la rama descendente de la curva absorción - eliminación.

Existe discrepancia entre los autores sobre la exactitud de los cálculos retrospectivos. Algunos (Dubowski et al, 1990; Simpson, 1992) indican que los numerosos factores que influyen en β , no proporcionan datos concretos para aplicarlos matemáticamente con exactitud. En cambio Montgomery y Reasor (1992) apoyan la validez del cálculo pero advierten la necesidad de efectuar dos determinaciones de alcoholemia, sucesivas, para asegurar que se está en la etapa neta de eliminación.

Antes de entrar en las expresiones matemáticas y los procedimientos que se realizan para obtener el resultado de una alcoholemia un tiempo "t" anterior al hecho, diremos que uno de los aportes más importantes que se han efectuado en el tema en los últimos años, es haber establecido que en realidad la eliminación no sigue una cinética lineal de orden "0" sino solo para concentraciones de etanol en sangre superior a 0.5 o 0.7 ml de alcohol etílico por 1000 ml de sangre. En el rango indicado, es decir, para alcoholemias bajas, la cinética es un proceso exponencial o cinética de Michaelis-Menten (Jones, 1991; Repetto, 1995; Jones, 2004).

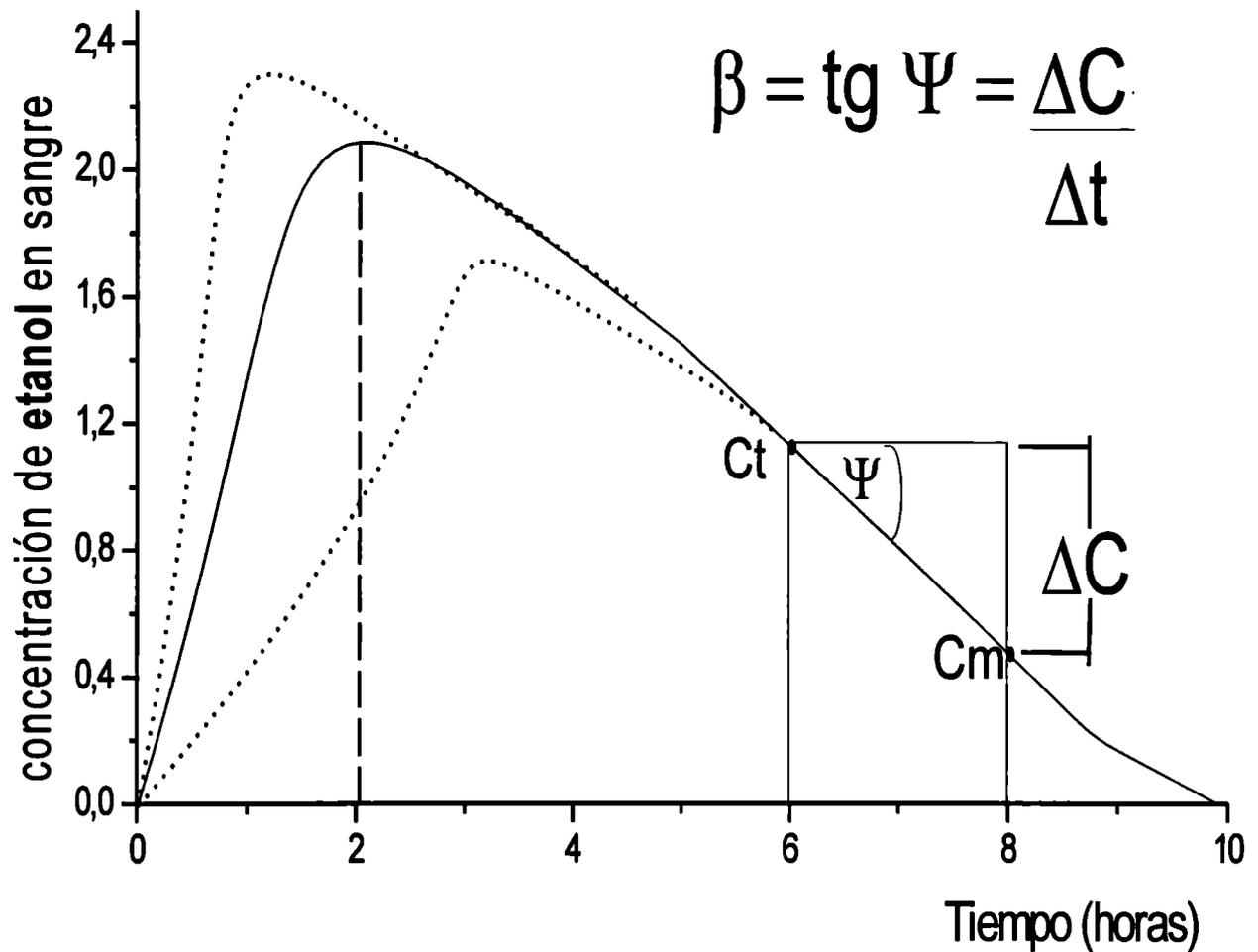


Figura 8 Curva de absorción y eliminación de alcohol etílico en sangre

En el primer caso, por saturación del sistema ADH-NAD, la ecuación viene dada por:

$$C_t = C_m - kt \quad (1)$$

En el segundo,

$$-\delta C / \delta t = V_{\text{máx}} \cdot C \cdot (K_m + C) \quad (2)$$

Siendo:

C_t : alcoholemia al tiempo t , con

C_m : alcoholemia máxima

K_m : Constante de Michaelis, que oscila entre 2 y 2.4 mM.

$\Delta C / \Delta t$: gradiente de concentración

En la Fig.9, en el gráfico extraído del manual de Toxicología Avanzada del Prof. Manuel Repetto (1995), podemos observar el verdadero curso de la cinética seguida por el etanol en el hombre.

En juicios por homicidio, violaciones, lesiones graves, el magistrado y ahora en nuestra provincia también el fiscal (quien dirige la investigación preliminar preparatoria antes de su elevación a juicio) suele requerir del perito interviniente el cálculo de alcoholemia retrospectiva al momento del hecho

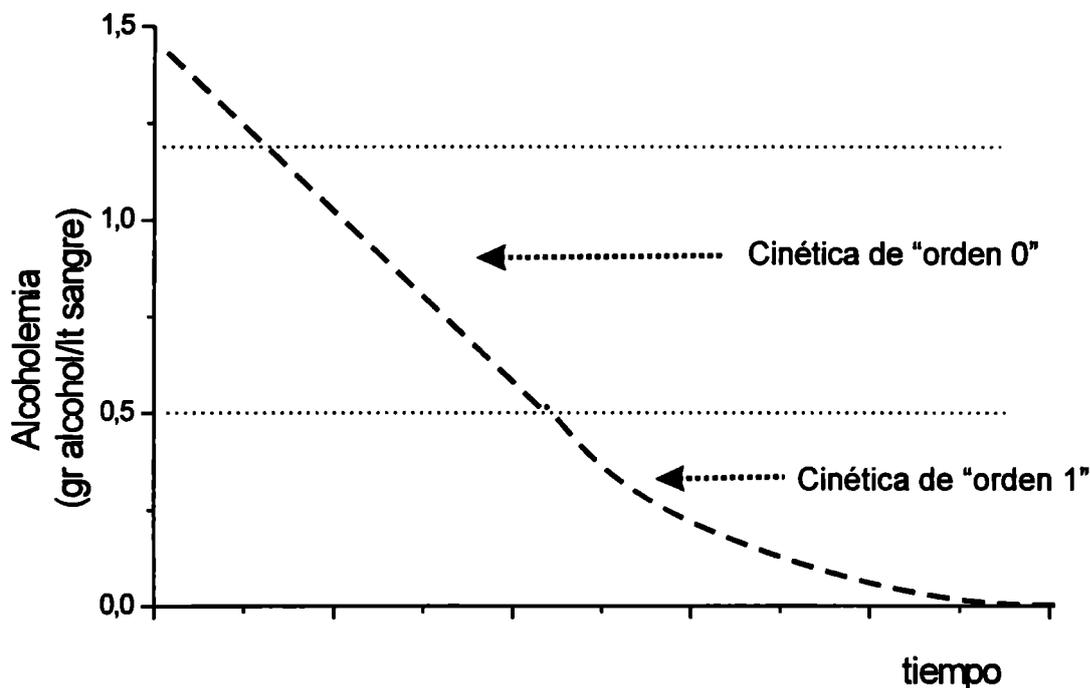


Figura.9 Cinética seguida seguida por el etanol en seres humanos. (Repetto, 1995)

Esto evidentemente por una circunstancia que se da con mucha frecuencia: el imputado es detenido varias horas después del hecho delictivo con lo que sigue que las muestras sanguíneas son obtenidas durante un lapso de tiempo considerable luego del crimen.

Si la alcoholemia supera el valor de 1 por mil, bien puede simplificarse el cálculo aplicando la ecuación correspondiente a una eliminación de orden "0", es decir, lineal.

Si observamos la curva de eliminación podemos aplicar el concepto geométrico de la tangente del ángulo ψ (cateto opuesto / cateto adyacente) es decir:

$$\frac{C_t - C_m}{t_2 - t_1} = \operatorname{tg}\psi = \beta \quad (3)$$

Despejando:

$$C_t = C_m + \beta \cdot t \quad (4)$$

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

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

$$A = C_t \cdot p \cdot r \quad (5)$$

Siendo p : peso del individuo, r : constante que relaciona la concentración de etanol en el cuerpo / concentración en sangre.

Sustituyendo en la ecuación la expresión correspondiente a C_t , hallada más arriba:

$$A = (C_m + \beta \cdot t) \cdot p \cdot r \quad (6)$$

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

Se trata de un caso de "Lesiones graves". El imputado fue detenido y la muestra sanguínea extraída seis horas después del hecho. El informe de Laboratorio arrojó el siguiente valor: 1.2 gr de alcohol etílico por 1000 ml de sangre. Aplicando la fórmula (4) para obtener la alcoholemia en un tiempo t de seis horas:

C_m : en gr.por 1000

β : 0.0025 en gr / min. Kg

t : tiempo en minutos.

$$C_t = 1.20 + 0.0025 \cdot 360$$

$$C_t = 1.20 + 0.90$$

$$C_t = 2.10 \text{ gr. por } 1000 \text{ gr. de sangre}$$

Este valor de 2.10 gr. por 1000 será la alcoholemia teórica en el momento del hecho.

Si ahora aplicamos la ecuación (6) para A (cantidad de alcohol), sabiendo que el imputado pesa 70 Kg y posee una constitución atlética ($r = 0.67$):

$$A_t = 2.10 \cdot 70 \cdot 0.67$$

$A_t = 98.49$ gramos de alcohol etílico absoluto o 123 ml (pasando a ml por la densidad de Etanol=0.8)

Este último dato es interesante cuando queremos referir la cantidad de bebida que supuestamente habría ingerido. Si se tratara de vino (considerando una graduación para vinos de 10 grados) implica que debió haber ingerido 1.230 ml, es decir casi una botella y cuarto de vino común.

4.2.2. Pérdida y producción de etanol durante el resguardo de las muestras

En todas las estimaciones y cálculos de alcoholemia, hay que considerar las pérdidas de etanol que pueden operarse por la indebida preservación de la sangre. La cámara de aire existente en el recipiente es considerada una de las causas más importantes de pérdida (O'Neal y Poklis, 1996; Parsons, 2002). Sin embargo pocos autores han estudiado con profundidad el grado de pérdida y los factores inherentes a ella. Por este motivo hemos encarado en este trabajo de tesis un estudio tendiente a interpretar y/o evaluar un tanto mejor el origen y curso de tales pérdidas en casos postmortem.

La producción de alcohol postmortem o pos toma de muestra es debida a la acción de microorganismos productores de etanol, principalmente por *Escherichia coli*, que se encuentra abundantemente en el tracto intestinal y que tiene la particularidad de migrar hacia otros vasos u órganos periféricos luego de la muerte de un individuo. Además, dicha generación postmortal o post toma de muestra es favorecida por la temperatura de preservación, cuando esta es superior a los 20°C y la inexistencia de inhibidores de microorganismos tal como el NaF.

Asimismo cabe señalar que otras entidades microbiológicas que no son inhibidas por el NaF pueden producir etanol en ambas circunstancias señaladas como por ejemplo con la levadura *Cándida albicans*.

4.3. Metanol

4.3.1. Generalidades

Llamado también alcohol de madera, metilol, hidrato de metilo, hidróxido de metilo y carbinol entre otros, encuentra extensa aplicación en la industria y el laboratorio. Es un líquido móvil, incoloro de olor agradable. Su densidad es 0.79 a 20°C.; miscible en todas proporciones con el agua, etanol, éter. Es inflamable y forma mezcla explosiva con el aire y arde en el aire con llama azul. Su poder disolvente es muy amplio siendo el más parecido al agua

El metanol se origina en la fermentación natural de la uva y su concentración en los vinos puede alcanzar un tenor de 300 miligramos por litro, señalándose un valor superior en bebidas de alta graduación alcohólica. Durante la “ Ley seca” en Estados Unidos se usó como desnaturalizante de bebidas alcohólicas y del mismo etanol usado en la preparación del Whisky y otras bebidas espirituosas, originando no pocos casos de contaminación accidental o dolosa en intentos de realizar “estiramientos” de las bebidas.

En nuestro medio se han reportado intoxicaciones por alcohol metílico de diversa etiología. Guatelli (2000) consigna referencias toxicológicas de variado origen que certifican que el empleo de paños impregnados con metanol o alcohol de quemar colocados en el abdomen de niños muy pequeños provocaron cuadros tóxicos de distinta gravedad, debido a absorción cutánea, e inclusive inhalatoria, mencionando que las Profesoras E. Giménez y N. Vallejo del centro de Intoxicaciones del Hospital de niños alertaron, hace tiempo, sobre el peligro de éste hábito.

En cuanto a la casuística del laboratorio de la Asesoría Pericial del Poder Judicial de la provincia de Buenos Aires, se hallan registros de varios casos de intoxicación mortal por el uso de paños embebidos con este alcohol en niños de muy corta edad, inclusive neonatos. No obstante estadísticas sobre el tema, asignan mayor predominio a las intoxicaciones por vía oral, resultando curioso una práctica consignada por investigadores estadounidenses, consistente en extraer combustible, mediante un tubo de goma o plástico, por aspiración con la boca (siphoning accidents), registrándose alrededor de 35.000 casos anuales de intoxicación. Esto último resulta no poco relevante por cuanto el uso extendido de metanol

como antidetonante de naftas podría constituir un problema serio de aumento de accidentes por este compuesto.

Por otro lado, la ingesta de bebidas alcohólicas contaminadas con alcohol metílico, se constituye en otra fuente de intoxicación. Efectivamente, no ha transcurrido mucho tiempo desde la tristemente célebre intoxicación masiva ocurrida en Argentina en el año 1993 por vinos conteniendo metanol, agregado intencionalmente, comentada en el inicio del capítulo, siendo la más grande tragedia tóxica que se recuerda en el país. Las secuelas, principalmente ceguera, la padecen hasta hoy muchas de las víctimas que sobrevivieron a la epidemia.

Desde el punto de vista de la toxicología analítica y clínica, ésta intoxicación permitió al autor aclarar algunos puntos oscuros en la interpretación de los fenómenos metabólicos y postmortales que son objeto de análisis y discusión como parte de éste trabajo.

4.3.2 Toxicocinética y Manifestaciones Clínicas

La toxicidad del metanol se manifestará, como se esbozó en el párrafo anterior, por: prolongado contacto con la piel, por ingestión de bebidas alcohólicas adulteradas y en personas que presentan deficiencias de ácido fólico.

Este último ítem puede explicarse, teniendo en cuenta que la detoxificación metabólica del metanol es un proceso ácido fólico dependiente; en consecuencia la susceptibilidad frente a este alcohol puede ser mayor en sujetos ácido fólico deficientes. Esto a su vez puede ser debido a una incorporación inadecuada en la dieta, pero también en enfermedades como el síndrome de mala absorción intestinal que impide la absorción normal por el intestino delgado, debido a una reducida actividad de la desconjugasa del poliglutamato intestinal; anemias hemolíticas o bien en pacientes tratados con antibióticos o anticonvulsivantes. Debe tenerse en cuenta que se estima en un 10% la población calificada como ácido fólico deficiente.

Debido a que el ácido fórmico ha sido detectado en la mayoría de los casos de intoxicaciones por metanol, este podría ser constituido en un buen “marcador” de envenenamiento.

Dos caminos han sido sugeridos en la disposición del ácido fórmico:

- a) Oxidación a través del sistema catalasa peroxidativo
- b) A través del one carbon pool.

El sistema catalasa parece actuar pobremente en ratas y monos, probablemente por el bajo nivel de capacidad peroxidativa del hígado. Un camino alternativo para el metabolismo del ácido fórmico es un one carbon pool tetrahidrofólico – dependiente. El ácido fórmico entra en

este pool combinándose con el ácido tetrahidrofólico para formar el 10-formil-tetrahidrofólico. La reacción, ATP dependiente, es catalizada por la 10-formil-tetrahidrofólico sintetasa. Así, estos dos mecanismos podrían explicar, en el hombre, la acumulación de ácido láctico, debido a la lenta oxidación operada, por bajos niveles de ácido tetrahidrofólico y reducida actividad de la 10-formil-tetrahidrofólico deshidrogenasa en el hígado (Makar et al, 1990).

Respecto de la dosis tóxica y mortal para el sujeto adulto, aún no está bien acordada entre los investigadores, Müller (1995) la estima entre 30 – 200 ml, agregando que la ceguera se alcanza con ingestas entre 4 y 15 ml; en tanto la concentración letal en sangre es de 1 mg/g. Para Jacobsen y Mc.Martin (1986) la dosis letal varía entre 30 y 240 ml., manifestando desconocimiento sobre la dosis que causa defectos visuales permanentes. Asimismo expresa que no existe relación entre la concentración de metanol en sangre y el grado de toxicidad. Sin embargo, la Sociedad Japonesa de Farmacia expresa que concentraciones superiores a 4 g/L de sangre resultan letales (Kinoshita et al, 1998). Roe (citado por Jacobsen y McMartin, 1986), considera razonable establecer una dosis letal mínima en el hombre de 1g/kg.

En nuestro medio, Calabrese y Astolfi (1978) mencionan como dosis letal 60 ml o más, anotando su elevada toxicidad respecto del etanol. Por otro lado Donnewald (Guatelli, 2000), expresa que a partir de una tasa hemática del orden de 0.6 g/ Kg existe serio riesgo de muerte. En definitiva, las divergencias que registran las publicaciones son imputables a variaciones individuales como también al desconocimiento que se tiene en general, de la cantidad de alcohol ingerido.

El metanol se absorbe rápidamente por vía gastrointestinal, acorde con su hidrofiliidad, por difusión simple. El ingreso dérmico se ve facilitado por cortes o raspaduras en la piel, aunque puede ingresar luego de un período de latencia, como lo establecen las ecuaciones de Higuchi-Fiks. Por vía inhalatoria es relevante en ambientes laborales donde se está en contacto con vapores del disolvente. Una vez absorbido se distribuye en los tejidos de acuerdo a su contenido en agua, según expresan numerosos autores. No obstante, otros investigadores han consignado datos que contradicen esta postura (Harger et al, 1938; Pla et al, 1991; Ferrari et al, 2003). Por otra parte el metanol parecería no distribuirse en órganos según su contenido acuoso. Estudios futuros más profundos podrán elucidar con mayor claridad los factores involucrados en la distribución de éste alcohol.

El 75-85% del metanol es degradado metabólicamente por medio de un mecanismo oxidativo. Esta es independiente de la concentración hemática, siendo la velocidad de detoxificación 7 a

9 veces inferior a la del etanol, atribuida a la gran afinidad de la enzima aldehidodeshidrogenasa por el etanol respecto del alcohol metílico. Así, la excreción total requiere de varios días

Como puede observarse en la Figura 10 el protón generado a través del NAD^+ contribuye a la aparición de la acidosis, por sus efectos inhibitorios sobre el hierro de los citocromos con el subsiguiente acúmulo de ácido láctico o lactato. En cuanto a la acidosis metabólica cabe señalar que los rangos de pH entre 7.10 y 7.35 configuran una acidosis moderada, mientras que guarismos menores a 7.10 manifiestan efectos severos o graves.

Como señalamos precedentemente, la afinidad de la enzima alcoholdehidrogenasa por el etanol, ésta circunstancia es el fundamento, en parte, de los tratamientos clínicos terapéuticos que se realizan en casos de intoxicación metílica. En efecto, la etilterapia aún sigue siendo utilizada, aunque se prefiere la hemodiálisis, supeditado a la existencia de hemodializadores en los nosocomios respectivos. Además, se complementa el tratamiento con ácido fólico, para favorecer la conversión de del ácido fórmico en dióxido de carbono y agua (Witheley, 1960; Makar et al, 1990; Liesivuori y Savolainen, 1991; Hantson et al, 2000). Las historias clínicas consignan el tratamiento mediante terapia etílica, folato y gluconato de sodio, entre los compuestos de mayor relevancia terapéutica.

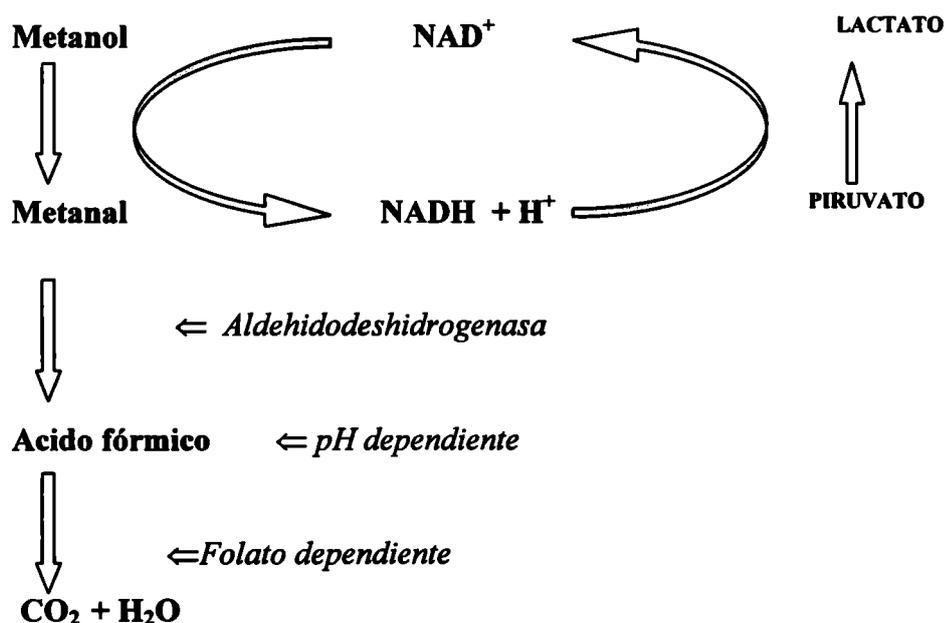


Figura 10 Proceso de biotransformación del metanol en el hombre

Los signos y síntomas de la intoxicación aguda son muy característicos. Inclusive y como sucedió en la intoxicación masiva del año 1993 en nuestro país, aparecen en forma simultánea

como una epidemia, en varios individuos, pudiendo predominar como subraya Guatelli (2000), un síndrome distinto. Así en ocasiones se manifiesta como un cuadro pulmonar severo; otras afecciones como por ejemplo en el nervio óptico producen cegueras irreversibles, debido a la acción directa del ácido fórmico sobre el nervio óptico y la retina (Eells et al, 1996) y otras veces acidosis metabólica (Jacobsen y Mc Martin, 1986).

La rápida diagnosis de la intoxicación es crítica, pues a medida que transcurre el tiempo se diluyen las posibilidades en la efectividad de la terapia convencional. La información veraz aportada por el afectado o un familiar puede ayudar al médico tratante a ubicar el período de latencia entre la ingesta y la aparición de síntomas atribuibles al metanol.

Entre los trastornos consignados, los oculares ofrecen una mejor posibilidad de identificar la intoxicación metílica: visión turbia, pérdida de percepción de colores, zoopsias que conducen a una amaurosis completa. Cuando las pupilas permanecen midriáticas el pronóstico no es alentador, aún cuando los parámetros de medio interno se corrijan.

Por otro lado cabe señalar que otras intoxicaciones que producen lesión ocular, dentro del conjunto de síntomas, se encuentra el botulismo pero ocasiona ptosis palpebral, cosa que no lo hace el envenenamiento metílico, por asentarse la lesión en el nervio óptico. Asimismo, en la intoxicación por belladona, no ocurre ceguera y se fija mas bien en las terminaciones intraintrínsecas de las fibras parasimpáticas que acompañan a las del sistema motor común (Guatelli, 2000).

En cuanto al metabolito responsable de tales anomalías, algunos autores lo atribuyen al formaldehído pero publicaciones más recientes lo adjudican al ácido fórmico (Liesivuori y Savolainen, 1991; Eells et al, 1996). El motivo de esta disparidad de criterios se deba quizá a que el formaldehído, de reconocida reactividad, desaparece muy rápidamente de la sangre en todas las especies estudiadas, estimándose una vida media de 1 a 2 minutos (Mc.Martin et al, 1979) por lo que su acción deletérea no se vería facilitada en este sentido. Esta apreciación se halla en consonancia con las experiencias de Eells et al (1996).

Debe agregarse que el cuadro digestivo, nervioso y respiratorio completan el cuadro sintomatológico.

4.3.3 Analítica toxicológica

Existen distintos procedimientos para aislar e identificar el metanol y su principal metabolito, ácido fórmico. Los antiguos métodos se basaban en la destilación ácida y posterior identificación colorimétrica. Con posterioridad, se impuso el método de microdifusión,

basado en la técnica de Feldstein y Klendshoj (1956), con la ventaja de utilizar mucha menor muestra que los métodos anteriores. El reactivo ácido cromotrópico (1,8- dihidroxinaftalen-3,6-disulfónico) constituye la mejor alternativa entre los agentes cromogénicos para metanol, dado que es prácticamente específico para el analito y de alta sensibilidad ($<50\mu\text{g}\%$).

En la década de los ochenta, Anthony et al (1980) y Ramsey y Flanagan (1982) publicaron interesantes contribuciones, proponiendo el método denominado de espacio-cabeza (Headspace) con el uso conjunto de cromatografía gaseosa, para la resolución analítica de muchos compuestos volátiles, inclusive el metanol.

Actualmente, ésta metodología, con ligeras variantes, se aplica en la mayoría de los laboratorios toxicológicos forenses del mundo debido a su elevada sensibilidad y porque permite distinguir inclusive, compuestos complejos producidos por la putrefacción, en caso de matrices biológicas postmortales (Ferrari et al, 2003).

El primer paso del análisis es la correcta toma de muestra, como fue indicado en la introducción general.

4.4. Glicoles

4.4.1. Generalidades

Los glicoles son alcoholes con dos funciones alcoholes, generalmente en carbonos adyacentes, por lo que también se denominan alcoholes vecinales. Los glicoles son importantes compuestos con múltiples aplicaciones industriales y domésticas. Son buenos disolventes e intermediarios químicos y los primeros elementos de la serie que se emplean abundantemente como anticongelante y líquidos para circuitos hidráulicos.

Al igual que los alcoholes, son depresores del sistema nervioso central así como irritantes para la piel y mucosas. Son menos volátiles que los alcoholes con igual número de carbonos, por lo que resultan menos peligrosos desde el punto de vista industrial. Su biotransformación es idéntica a la de los alcoholes, mediante la oxidación de la función alcohol a aldehído y ulteriormente a ácido carboxílico. La posibilidad de biotransformación de ambas funciones, multiplica por dos los posibles metabolitos, en relación al alcohol correspondiente. La formación de dos funciones ácido, que requiere que se oxiden funciones alcohol primarias, da lugar a compuestos con afinidad por el catión Ca^{+2} , especialmente si las funciones están próximas.

Desde el punto de vista químico son dioles, siendo el más conocido el etilenglicol o 1,2-etanodiol.

4.4.2. Etilenglicol

El etilenglicol (HOCH₂-CH₂OH) o 1-2 etanediol es un líquido (d: 1.1135) incoloro, inodoro, viscoso y muy higroscópico, de sabor dulce y poco volátil.

Es miscible en agua, alcoholes de bajo peso molecular, acetona, etc., pero escasamente soluble en benceno y sus homólogos. Es un producto industrial pesado, que se fabrica en la gama de cientos de toneladas mediante hidratación del óxido de etileno. Entre sus numerosos usos hemos de destacar su empleo como anticongelante de los circuitos de refrigeración de motores de explosión; como líquido de intercambiadores de calor; disolvente de pinturas, tintas, plásticos, espumas de extintores; síntesis de explosivos y plásticos, etc.

4.4.2.1 Toxicocinética

El etilenglicol sólo se absorbe eficazmente a través del tubo digestivo. Su absorción respiratoria se ve dificultada por su acción irritante por esta vía (más de 100 mg/mL resultan intolerables), su volatilidad y absorción dérmica es escasa, actuando también como irritante dérmico y mucoso. El etilenglicol absorbido se oxida mediante los mismos sistemas enzimáticos que el etanol formándose los correspondientes aldehídos y ácidos. La afinidad de la ADH por este glicol se estima que es unas 30-40 veces inferior que por el etanol. Su metabolito oxidado final es el ácido oxálico, que tiene una gran afinidad por el Ca⁺². Por ello, la intoxicación por etilenglicol cursa en dos fases. Durante la primera, actúa el propio etilenglicol como depresor del SNC e irritante local en la zona de absorción. Según va siendo metabolizado, aparece acidosis e hipocalcemia. Aunque algunos autores opinan que tan sólo el 5 % del compuesto absorbido llega a transformarse en ácido oxálico, lo más significativo de esta intoxicación, y lo que la caracteriza es la hipocalcemia, unida a la lesión renal por precipitación de cristales de oxalato cálcico. El metabolito que se considera principal responsable de la acidosis metabólica es el ácido glicólico. Debe tenerse en cuenta la diversidad de metabolitos, que pueden justificar una profunda alteración metabólica en un paciente con bajos niveles de etilenglicol en sangre, pero en el que los niveles de los metabolitos pueden ser altos.

4.4.2.2. Manifestaciones clínicas

La forma más típica de intoxicación por etilenglicol es la ingestión, ya sea con finalidad suicida o meramente accidental. El cuadro cursa en dos fases. Durante la primera, lo característico son las molestias digestivas, con dolor gástrico, náuseas y vómitos, seguida de

un cuadro de embriaguez que al contrario que la etílica, carece de fase eufórica y cursa, fundamentalmente, como depresión del SNC y sin olor característico del aliento. Paulatinamente se va instaurando el trastorno metabólico. Hay manifestaciones de acidosis metabólica, hipocalcemia, a veces sintomática, con episodios convulsivos, trastornos neurológicos y se inicia la lesión renal, con puño percusión positiva y alteraciones en el sedimento de orina y parámetros renales. Los cristales de oxalato cálcico precipitan en los tejidos, siendo responsables de la lesión renal y en menor grado de otros tejidos. Estos cristales aparecen en la orina resultando muy específicos de esta intoxicación, y pueden apreciarse fácilmente en su sedimento. El enfermo está desorientado o en coma, hay taquicardia con hipertensión y edema pulmonar, episodios convulsivos, y marcada hipocalcemia. A partir de las 24-72 horas, se inicia la segunda fase, apareciendo un dolor sordo, posteriormente intenso en ambas fosas renales, haciéndose sintomática la necrosis tubular aguda renal, que cursa inicialmente con oliguria.

Desde el punto de vista fisiopatológico esta intoxicación se caracteriza por hipocalcemia, acidosis metabólica, aumento del gap osmótico y aniónico y por la aparición de los citados cristales de oxalato cálcico en orina. Tanto el oxalato, como etilenglicol pueden cuantificarse sin dificultad en sangre y orina.

4.4.2.3. Tratamiento y pronóstico

La medida inicial ante todo paciente que haya ingerido etilenglicol consiste en administrar suero glucosado más bicarbonato 1/6 M por vía venosa, y vaciar el estómago, bien mediante lavado, o si no es posible, simplemente con una sonda naso gástrica. Después se administrará carbón activo, que tiene una relativa eficacia como absorbente del etilenglicol. Se recogerán muestras de sangre y orina, para confirmar el diagnóstico y compensar los trastornos metabólicos. Es conveniente monitorear la función cardíaca, pues será necesario administrar gluconato o cloruro de calcio. Si se producen convulsiones antes de disponer de los resultados de los análisis, debe administrarse una ampolla de cloruro cálcico lentamente, a través del tubo del goteo, pudiéndose repetir varias veces si las convulsiones no ceden. No debe corregirse totalmente la acidosis, pues empeora la hipocalcemia, si bien la intensa acidosis metabólica requiere grandes cantidades de bicarbonato para su compensación. Cifras de calcio plasmática inferiores a 4.5 mEq/L requieren la administración de calcio. Es necesario hacer un cuidadoso balance de ingresos-pérdidas de líquidos (y sodio) por el riesgo de edema pulmonar. Es frecuente tener que administrar hasta 2000-3000 mL de bicarbonato

por lo que a veces es necesario recurrir a la hemodiálisis, no sólo por los niveles del tóxico, sino también para corregir la hipernatremia resultante de la compensación de la acidosis. Al igual que en la intoxicación por metanol debe administrarse alcohol etílico para evitar la biotransformación y por tanto activación tóxica, del etilenglicol. Para ello puede seguirse el mismo protocolo ya indicado en la intoxicación por metanol.

En toda intoxicación por etilenglicol en que se inicie clínica, debe recurrirse a la hemodiálisis. Las lesiones renales y nerviosas que se producen en cuadros incluso leves, justifica ampliamente la utilización de técnicas de eliminación forzada.

Es conveniente administrar piridoxina, IM 500 mg/6 horas, con el fin de estimular el paso del ácido glioxílico a glicina. Al igual que en la intoxicación por metanol, el 4-metil pirazol resulta eficaz al inhibir la ADH, pero en nuestro país hay poca experiencia en esta terapia.

El pronóstico de esta intoxicación sin tratamiento es malo, produciéndose con frecuencia lesiones renales o nerviosas irreversibles, Las modernas técnicas de eliminación forzada de metabolitos tóxicos, específicamente la hemodiálisis, han mejorado extraordinariamente la evolución de los enfermos. Las secuelas nerviosas, generalmente trastornos motores y cuadros psicopatológicos demenciales, son prácticamente irreversibles. Por el contrario, las lesiones renales siguen la evolución típica de las necrosis tubulares, pudiendo quedar, incluso en casos graves, una función renal residual suficiente para permitir una vida normal.

4.4.2.4. Prevención

El sabor dulzón de las soluciones acuosas de etilenglicol, y la multiplicidad de usos de este compuesto, muy especialmente su empleo en los líquidos anticongelantes de los automóviles, es motivo de frecuentes intoxicaciones accidentales, especialmente en los niños, y de carácter suicida. Es conveniente que los recipientes que lo contengan estén debidamente rotulados, y que sus soluciones de uso doméstico o industrial tengan colores llamativos poco atractivos para los niños.

El TLV es 50 ppm (127 mg/m³), si bien por su escasa volatilidad no supone un riesgo industrial importante.

4.4.2.5. Toxicidad

Una dosis oral de 100 ml de etilenglicol (EG) se considera que puede ser fatal para los adultos. Más de 200 casos han sido informados y se estima que esta sustancia química puede causar la muerte de 40-60 personas anualmente. Quienes han sobrevivido, presentan

depresión del sistema nervioso central con severa acidosis metabólica y desarrollo de falla renal aguda. Es común encontrar depósitos de cristales de oxalato en el túbulo renal en personas que pueden morir después de un periodo de algunos días (Raekallio et al, 1967).

El EG es metabolizado vía alcohol deshidrogenasa (ADH) a varios metabolitos más tóxicos los cuales producen acidosis metabólica, toxicidad en el SNC y cardio pulmonar daño así como injuria renal.

El ácido glicólico se presenta en un 96% como ácido libre y puede ser considerado el principal metabolito tóxico. A pesar que el ácido oxálico ha sido previamente considerado como el principal metabolito tóxico, solo el 1% del EG se encuentra como oxalato y produce cristaluria asociado con la ingestión del EG.

La toxicidad del EG se desarrolla en tres fases:

Durante la fase glicol (1-12hs) los efectos clínicos reflejan su acción en el SNC. La absorción por el tracto gastrointestinal es más lenta que el alcohol, y presenta mayor volumen de distribución y el metabolismo ocurre en forma recta (proporcional al nivel en plasma). La vida media es de 3 horas pero aumenta a 15 hs cuando es ingerido con el alcohol dado que compete por ADH.

Luego ocurre la fase glicolato (4-24 hs). El nivel máximo del ácido glicólico se alcanza entre las 4-8 hs en ausencia de etanol y puede aumentar a 12 o más horas cuando el etanol se encuentra presente. Se cree que el glicolato es el responsable de la profunda acidemia, toxicidad neurológica y daño cardiopulmonar incluyendo edema pulmonar no cardiogénico.

Finalmente se desarrolla injuria renal (generalmente reversible) y define la fase neuropatológica (24 a 72 hs). La relativa contribución de glicolato versus oxalato de calcio y otros metabolitos a este daño es desconocida.

Se detectan anomalías típicas de la intoxicación con EG.

Orina: A pesar que el oxalato es normalmente un metabolito minoritario, se observan cristales de este compuesto

Sangre: puede ocurrir hipocalcemia y se manifiesta por una prolongación de la línea QT en el ECG pudiendo resultar tetania. Puede observarse mialgias, elevada concentración en suero de creatinina e incremento de creatina fosfoquinasa. Acidosis metabólica, Anión Gap indica la producción de ácidos orgánicos. La toxicidad puede ocurrir sin significativo aumento del Gap osmolal. Intoxicaciones severas con EG (50mg/L) produce un aumento en Gap osmolal de 10 mosm. El osmolal y anion gap pueden permanecer elevados aún cuando se detecte bajos niveles de EG en suero debido a la acumulación en sangre de glicolato.

Niveles en suero: Niveles de EG superiores a 50mg/dL en suero, sugieren la necesidad de hemodiálisis. Ha habido datos de pacientes que se han recuperado luego de tratamientos agresivos en presencia de EG en niveles de 145mg/dL y 560 mg/dL. El ácido glicólico y el bicarbonato correlacionan mejor que el EG en suero.

4.4.2.6. Estudios Postmortem

La concentración de etilenglicol en 4 personas que sufrieron intoxicación masiva fue tan alta como: 900-6500mg/L en suero y 1000-9500 mg/L en orina (Underwood y Bernett, 1973; Parry y Wallach, 1974; Stokes y Aureon, 1980; Peterson et al, 1981; Cheng et al, 1987).

La concentración de etilenglicol en suero fue de 500-7750 mg/L medida entre las 6-24 hs después de la ingestión en 4 pacientes que luego murieron por intoxicación (Bowen et al, 1978; Godlphin et al, 1980; Cadnapaphornchai et al, 1981; Gordon y Hunter, 1982).

La Tabla 5 consigna los promedios y rangos de concentración de etilenglicol en órganos y fluidos biológicos de víctimas de envenenamiento con EG.

La concentración de ácido oxálico en hígado fue de 245mg/L en un hombre que murió por envenenamiento de etilenglicol, en valor control de oxálico en hígado es menor a 3 mg/L (Zarembski y Hodgkinson, 1967).

Los siguientes datos corresponden la concentración de etilen glicol en tejido de 9 personas que murieron entre las 6-48 hs luego de la ingestión de una cantidad desconocida de la sustancia (Harper y Forney, 1959; Klendshoj y Rejent, 1966; Winek, 1975).

Tabla 5. Concentración de Etilenglicol en casos fatales (g/L o g/Kg)

	Sangre	Cerebro	hígado	riñón	Orina
Promedio	2.4	2.0	6.7	4.6	5.7
Rango	0.3-4.3	0.3-3.9	0.2-15.1	0.2-11.3	0.6-10.8

4.4.3. Dietilenglicol

4.4.3.1. Generalidades

El dietilenglicol (DEG), (HOCH₂-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂OH) o 2,2'-oxidietanol es un líquido incoloro, inodoro, higroscópico, de sabor quemante dulzón y poco volátil. Es miscible con el agua, éter y acetona y prácticamente insoluble en benceno y tetracloruro de carbono. Se sintetiza industrialmente a partir del óxido de etileno y el glicol. Sus principales usos son como líquido de frenos y circuitos hidráulicos, anticongelante, tratamiento de fibras textiles,

agente higroscópico en pastas, colas, etc. Esterificado con el ácido dodecanoico (ácido láurico) se emplea como emulsificante.

Las características toxicológicas de este compuesto son similares a las del etilenglicol, si bien su toxicidad es menor (DL_{50} en rata es 20.76 g/kg). La clínica y tratamiento de esta intoxicación son iguales a las descritas para el etilenglicol.

Presenta un peso molecular de 62.07; punto de ebullición: 197.4 °C y densidad=1.11 g/L. Se prepara por hidrólisis del óxido de etileno con ácido sulfúrico diluido en agua a 200°C. Se lo separa por destilación siendo los productos dietilenglicol y trietilenglicol de interés debido a su toxicidad.

Este tipo de sustancias son comúnmente utilizadas como solvente a nivel industrial, como líquido anticongelante para radiadores, líquido refrigerante para motores de aviones en adhesivos y en la síntesis de fibras poliéster. Se polimeriza en agua dando poliglicoles utilizados como disolventes en barnices y medicamentos.

A escala mundial se han registrado muy pocos casos de intoxicación con etiología suicida o accidentales domésticos.

4.4.3.2. Metabolismo y Toxicidad

Encontramos escasa información bibliográfica sobre el metabolismo y el mecanismo de toxicidad del DEG. Es un solvente común usado en la industria y es conocido como un aditivo ilícito en vinos dulces. Se ha sugerido que sigue el mismo camino metabólico del EG a pesar de no haber sido demostrado experimentalmente. Durand (1976) informó que la intoxicación aguda en ratas estaba asociada con una excreción considerable de oxalato en orina. Estos autores han informado que la excreción de oxalato decrece significativamente por alcalinización de la orina y/o por inyección de etanol. Herber et al (1978) informaron la formación de cristales de oxalato de calcio en túmulos renales luego de intoxicación aguda con DEG en ratas macho. Morris et al (1942) observó cristales urinarios de oxalato de calcio en ratas macho luego de la ingestión de DEG durante tiempos prolongados y fue considerado la prueba concluyente que el DEG es metabolizado en rata y el producto formado es convertido en ácido oxálico.

Otros autores han informado que el oxalato de calcio no se forma luego de la intoxicación con DEG. Wiley et al (1938), informaron que el DEG no aumenta el ácido oxálico en orina basando su hipótesis en que el éter unido al DEG no se rompe como el EG y subsecuentemente puede formarse ácido glicólico y oxálico. Balazs (1982) informó que la

deposición de cristales de oxalato de calcio, no es indicio de la nefrotoxicidad del DEG en humanos y animales. Winek et al (1978) mostraron que la concentración de oxalato en sangre y riñón de ratas luego de la ingestión de EG es mucho mayor que luego de la ingesta de DEG. Wiener et al (1989) determinaron la vía metabólica del DEG en el mecanismo de toxicidad a fin de resolver la disputa referida a la formación o no de cristales de oxalato de calcio luego de la intoxicación con DEG en ratas Wistar usando DEG radio marcado. En este estudio, cuando se administró (^{14}C) DEG a ratas, no se observó (^{14}C)-oxalato en orina ni radioactividad como EG, glicolaldehído, glicolato y glioxilato, lo que indicaría que estos compuestos no son intermediarios en el metabolismo del DEG.

En los casos en que se observó oxalato en orina, los autores suponen que el DEG administrado por Durand y Herber pueda estar contaminado con EG. Mientras que el DEG es preparado a escala industrial por reacción entre EG con óxido de etileno, la posibilidad de contaminación con EG y la producción metabólica de oxalato puede ser una explicación razonable.

Adicionalmente, se identificó un compuesto marcado en orina excretada, identificado como ácido 2-hidroxi etoxiacético (HEAA). A pesar que el EG y sus metabolitos no son intermediarios en el metabolismo del DEG, las mismas enzimas han sido involucradas en el camino metabólico. El camino metabólico propuesto se presenta en la Figura 11.

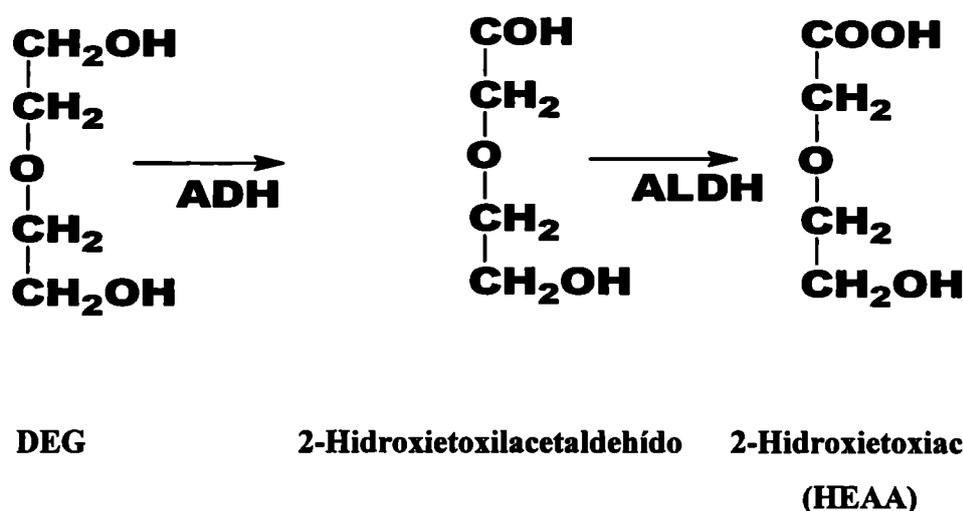


Figura.11 Camino metabólico propuesto para la oxidación del DEG. ADH (Alcohol deshidrogenasa), ALDH (aldehído deshidrogenasa).

El DEG es primero oxidado por la ADH produciendo 2-hidroxietoxi acetaldehído el cual es rápidamente oxidado por ALDH a HEAA en un proceso que intercambia 4 electrones. La formación de HEAA en ratas que recibieron pirazol (un inhibidor de ADH) disminuyó un

91% ($P < 0.01$). El tratamiento con dietilditiocarbamato a dosis necesarias para inhibir la ALDH en un 75%, disminuye la producción de HEAA aproximadamente en un 66% ($P < 0.001$).

No se observó oxidación posterior del HEAA. Bajo condiciones ácidas, HEAA forma un compuesto cíclico 1,4-dioxanona que no es oxidado por ADH ni por ALDH.

La Tabla 6 muestra los resultados encontrados en el análisis de orina de ratas que recibieron DEG marcado (^{14}C). La ruta de administración no altera el metabolismo. En ratas macho que reciben DEG por intubación intragástrica, $43 \pm 7\%$ de la radioactividad administrada se recupera en orina durante las primeras 6 hs. Para ratas que recibieron DEG por vía intravenosa, $35 \pm 5.5\%$ fue recuperada en orina en las primeras 6 hs y un 46.5% después de 12 hs. Luego de 6 hs aproximadamente el 20% de la radioactividad recuperada en orina se detectó como HEAA; este incremento fue de aproximadamente 32% luego de 12 hs. de administración de DEG.

El autor concluye que la toxicidad del EG no es debida al EG per-se sino a sus productos de metabolización específicamente ácido glicólico. La toxicidad del DEG se debió a sus productos de oxidación y entonces puede tratarse empleando inhibidores de la ADH. Se encontró que un pre tratamiento con pirazol fue menos letal, indicando que el HEAA producido del DEG contribuye a la toxicidad.

Tabla 6. Metabolismo de DEG (1.1g/Kg) en ratas Wistar macho (Wiener, 1989)

Grupo	Ruta de administración DEG	Pretratamiento	Radioactividad en orina	
			DEG (%)	HAEE (%)
I	Intragástrica	Ninguno	79.5 ± 0.6	20.5 ± 0.6
II	Intravenosa	Ninguno	80.3 ± 2.8	19.7 ± 2.8
III	Intragástrica	Pirazol	98.1 ± 1.5	1.9 ± 1.5
IV	Intragástrica	Dietilditiocarbamato	93.1 ± 0.6	7.0 ± 0.6

4.4.3.3. Intoxicaciones masivas registradas

En 1937, 76 personas murieron luego de la ingestión de un nuevo medicamento presentado en el mercado como elixir de sulfanilamida (disuelta en alcohol) que contenía 72% de DEG. Los estudios en animales mostraron que el DEG fue el responsable de la toxicidad en el Desastre Massingale (Geilling y Cannon, 1939). Este desastre impulsó a la Food, Drug and

Cosmetic Act de 1937 (en desarrollo de 1930 a 1935) a exigir a los fabricantes a demostrar la seguridad de sus productos previo a la venta.

Una similar y desafortunada sustitución de DEG por propilenglicol en un preparado sedativo pediátrico resultó en una intoxicación fatal de 7 niños en Cape Town, en Sud África, en 1967 (Bowie y McKenzie, 1972).

Entre 1990 y 1992 fueron estudiados 339 casos de niños ingresados a hospitales de Bangladesh con diagnóstico de falla renal de etiología incierta, encontrándose más de 60 casos en los que se asociaba la patología hallada a la posible ingesta de glicoles. Estudios más profundos de índole estadística permitieron concluir a los autores de la investigación que varios preparados de elixir de paracetamol (19 de 69 recipientes de jarabe antifebril que habrían ingerido una parte de los pacientes analizados), contenían dietilenglicol en un promedio de 20% del excipiente normalmente utilizado, polietilenglicol.

Los autores observaron que al intervenir la autoridad sanitaria en el control de las marcas y/o partidas oficinales preparadas en los centros de salud, la identificación de aquellas marcas con contenido de DEG y su posterior sustracción de circulación, las fallas renales de origen incierto disminuían en un 84% (Hanif et al, 1995). Lamentablemente en este reporte existen pocos datos concretos que permitan la comparación con los obtenidos en nuestro episodio, donde el agente causal fue identificado rápidamente en el inicio de la intoxicación masiva y por lo tanto pudo efectuarse un seguimiento constante médico-clínico y en laboratorio. Solo han sido tomados, en el episodio Bangladesh, los parámetros de estado nutricional, síntomas y signos clínicos como hepatomegalia, edema e hipertensión asociado al cuadro renal agudo y la investigación en el laboratorio de creatinina, sodio, potasio, bicarbonato, hemoglobina y recuento de glóbulos blancos. Todos estos parámetros excepto la creatinina, arrojaron muy bajas cifras de incidencia.

En un contexto parecido fueron asociadas las muertes de un centenar de niños con una rara falla renal aguda en Haití. Más de cien menores se afectaron severamente, asociando posteriormente la etiología de la epidemia a la ingesta de jarabes de acetaminofeno, cuyo excipiente se hallaba contaminado con dietilenglicol en una concentración promedio de 14,4% (Scalzo, 1996, Malebranche et al, 1996; Wolf, 1998; O'Brien et al, 1998).

De los 109 casos, 87 entraron dentro de los parámetros preestablecidos para asociarlo al episodio tóxico. De estos casos el 80% fueron niños menores de 5 años.

Los signos y síntomas de todos los afectados no pudieron establecerse en el señalado estudio. No obstante se consigna la falla renal aguda como el predominante. Anuria, edema y dolor

abdominal tuvieron cifras de incidencia relevantes. La primera se manifestó, en un grupo de 54 niños, a los 6 días promedio de la primer ingesta de jarabe contaminado. Se estimó que 32 de ellos ingirieron dosis máximas y la dosis consumo fue de 0.22 – 4.42 ml/Kg o 0.35 – 5.40 mg/Kg de peso corporal (promedio: 1.34 ml/Kg o 1.63 mg/Kg).

No obstante lo consignado, los investigadores reconocen que la posible acción hepatotóxica del acetoaminofeno podría sumarse a la del dietilenglicol y que entonces gastroenteritis previas podrían contribuir a la absorción del DEG o aumentar sus efectos tóxicos. En los dos últimos casos, más o menos contemporáneos a la intoxicación masiva señalada en el presente trabajo, si bien fueron aportados datos concretos sobre el tenor de DEG en los jarabes, se informaron pocos detalles de laboratorio y otros parámetros clínicos importantes, principalmente de medio interno.

Creemos, entonces muy importantes los estudios ofrecidos en este episodio, pues aportan datos nuevos en base a precisiones invalorable que no pueden ser señaladas en los informes antedichos; bien porque los más antiguos no fueron estudiados con las tecnologías y conocimientos avanzados de nuestros tiempos o porque los contemporáneos o posteriores solo se analizaron mediante asociación estadística de casos con patología renal de origen dudoso y durante un lapso de tiempo relativamente largo y en forma retrospectiva.

La presentación del cuadro clínico de los pacientes que ingieren DEG parece presentar algunas diferencias respecto de las que se observan con EG. Así, el apropiado manejo de la intoxicación con DEG, que posee similar esquema terapéutico que el EG, permite monitorear la acidosis metabólica, como mejor complemento que la falla renal aguda, que es el signo sobresaliente en las intoxicaciones masivas informadas a lo largo de la historia.

En Argentina, a mediados de 1992, se registró una epidemia que afectó alrededor de 50 personas con 29 casos fatales, caracterizada por la falla a nivel renal con oliguria seguida de anuria cuya manifestación se produjo entre 24 y 48 hs más tarde desde la ingesta, por consumo de jarabe de propóleos. La investigación llevó a identificar al DEG como causante de la toxicidad observada en la población. Otros síntomas registrados consistían en náuseas, vómitos, cefaleas con daño a nivel hepático con altos niveles en sus enzimas (GPT, GOT, gamma-GT y LDH) y acidosis metabólica. A continuación procederemos a comentar el presente suceso luctuoso, previo considerar la naturaleza y características del propóleos como agente natural, al que se le atribuye propiedades terapéuticas.

4.4.3.4. Propóleos: su contaminación

4.4.3.4.1. Generalidades

Etimológicamente la palabra propóleos proviene del griego pro: antes, Polis: ciudad, indicando en que lugar de la colmena es posible encontrarlo: dentro de la misma, entre los cuadros, en la piquera y en las paredes. Se han intentado varias definiciones: Unos la definen como una gomorresina recolectada por las abejas de los brotes y yemas de las plantas. Otros, como una amalgama de sustancias cerosas y balsámicas recolectadas por las abejas a partir del álamo (origen principal), abedul, aliso, pino, sauce, roble, fresno, etc. Otros aún agregan que estas sustancias son empleadas para cementar. El origen del propóleos provendría de un enriquecimiento o digestión, dentro de la abeja y mediante fermentación láctica de las sustancias recolectadas de las yemas de árboles del tipo descrito.

La finalidad de la recolección es: tapar quebraduras o fisuras del lugar que alberga a las abejas, reducir la piquera en zonas frías, combinarlo con cera para embalsamar y aislar un animal o insecto muerto dentro de la colmena.

La recolección se realiza durante el verano y se calcula un rendimiento de alrededor de 100 - 300 g por colmena.

En cuanto a su apariencia y caracteres: Es una sustancia resinosa de color verde grisácea claro, con tonalidades que van del anaranjado rojizo al pardo claro, según la procedencia. Por debajo de 100°C es una masa dura y brillante, por encima de esa temperatura se ablanda y se transforma en una masa pegajosa y maleable. Su aroma es agradable, dulce y recuerda a una mezcla de yemas, álamo, miel, cera y vainilla.

En su contenido encontramos: 55% oleoresinas balsámicas, 30% Ceras y 5% Polen.

También es rico en vitaminas y microelementos.

La composición química aproximada es:

Alcohol Cinámico 10%

Acido cafeico 3%

Flavonoides 59%

Cera de abejas 18 -30

Es interesante el trabajo de Sala y Mandrile (1993) de la cátedra de Farmacognosia de la Universidad Nacional de La Plata que emprendieron una búsqueda de trabajos científicos además de investigaciones efectuadas en los últimos veinte años sobre las propiedades biológicas y farmacológicas que se le atribuyen al propóleos en muchos países del mundo y que podemos resumirlos como sigue:

- Actividad mitótica y metabólica sobre células de mamíferos in vitro.
- Acción antimicrobiana sobre gérmenes Gram positivos y Gram negativos levaduras y hongos.
- Actividad fitocida, fitoinhibidora y antiviral.
- Propiedades cicatrizantes, verdadera acción eutrófica y estimulante cutáneo.
- Vasoconstrictor, descongestionante y tónico circulatorio.
- Propiedades antioxidantes.
- Estimulador de los factores específicos e inespecíficos de los anticuerpos en los órganos linfáticos regionales y periféricos.

Sin embargo libera localmente histamina y tiramina provocando reacciones alérgicas.

Según ésta descripción concluimos que sus propiedades son mayoritariamente beneficiosas. Entonces, ¿Por qué ha sido implicado en una de las intoxicaciones masiva más importante que se recuerden en nuestro país?

¿Fue realmente el propóleos el verdadero agente responsable del desgraciado acontecimiento?

En nuestro episodio se analizaron también 20 casos post-mortem, estudio este no consignado por los autores de publicaciones de los otros episodios de intoxicación masiva comentados en esta tesis (Geiling y Cannon, 1938; Bowie y Mc Kenzie, 1972; Okuonghae et al, 1992; Hanif et al, 1995; Malebranche et al, 1996; O'Brien et al, 1998).

4.4.4. Otros glicoles

El propilenglicol o 1,2-propanediol es un importante glicol que se emplea tanto en medicinas como en alimentos y polímeros y no es tóxico salvo en niños de corta edad.

Igual sucede con los polietilenglicoles, muy empleados en la fabricación de fibras y como disolventes, en alimentos y medicinas. Algunos de estos compuestos pueden ser levemente irritantes. El butilenglicol y otros miembros de la serie se emplean como humectantes cosméticos y aditivos alimentarios sin que actúen como irritantes o resulten tóxicos. El polietilenglicol (PEG) es muy utilizado en la industria farmacéutica como vehículo o disolvente de principios activos, especialmente en jarabes.

Este glicol es inocuo y se cree que su sustitución por otros glicoles ha sido la causa de los episodios de intoxicación masiva registrados en el mundo, tal como hemos consignado en éste capítulo.

CAPÍTULO 5

COMPUESTOS TÓXICOS VOLÁTILES GENERADOS EN INCENDIOS DE MATERIALES PLÁSTICOS NITROGENADOS.

5.1. Acido cianhídrico y cianuros alcalinos

5.1.1. Generalidades

Conocido también como cianuro de hidrógeno, nitrilo fórmico, ácido prúsico entre otros, es un líquido límpido e incoloro a temperatura de 20°C, que entra en ebullición a los 26°C; soluble en agua y alcohol. Posee un olor semejante a almendras amargas u olor sui generis, percibido por algunos individuos y no por otros. Se expresa que puede ser detectado en forma olfativa a partir de las 5 ppm en aire y 0.17 ppm en agua (ATSDR, 1989). Dado que posee una alta presión de vapor, es altamente difusible, por lo que se lo ha usado en fumigación como raticida, principalmente y en especial en puertos o grandes galpones de almacenaje. Mezclado con aire forma mezclas explosivas.

Químicamente es uno de los ácidos más débiles. En forma pura es estable pero en solución acuosa es inestable y con el tiempo se convierte en ácido fórmico y amoníaco.

Presenta la característica de fatigar fácilmente el nervio olfativo, con lo que el individuo puede perder la capacidad, en breve tiempo de exposición, para percibir su presencia.

El informe de ASTDR (1989) consigna el uso de HCN para obtención de acrilato y metacrilato de metilo utilizados en la fabricación de nylon y acryloid entre otros plásticos. La melamina produce como productos de descomposición térmica el CO, HCN y amoníaco.

5.1.2. Origen, propiedades y usos del HCN y los cianuros alcalinos.

El ácido cianhídrico del entorno responde a variados orígenes: puede provenir de efluentes industriales o bien de procesos tales como la cianuración de metales preciosos, que liberan HCN al medio ambiente. Este agente tóxico puede a su vez moverse a distancia y permanecer hasta cuatro años en la troposfera (ATSDR, 1989).

A bajas concentraciones, una parte del HCN puede desaparecer por degradación aeróbica o anaeróbica.

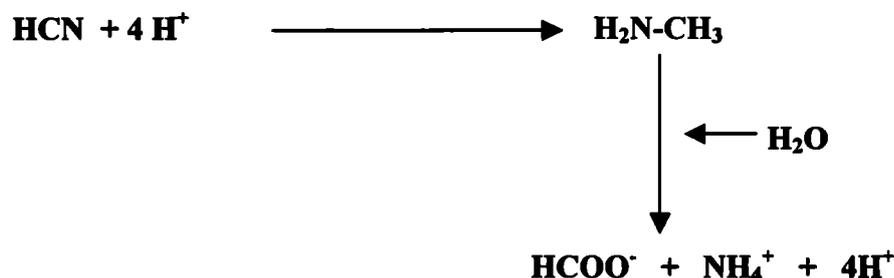
En el agua el ácido cianhídrico se halla en estado libre y se elimina por simple volatilización.

En cuanto a las concentraciones máximas permitidas en ambientes laborales se menciona un valor de 10 ppm. Si las concentraciones superan los 270 ppm el efecto es inmediatamente fatal para el hombre expuesto.

El HCN se comporta químicamente como el nitrilo del ácido fórmico:



Por reducción a temperatura normal se origina la metilamina, con posterior formación de formiato y amonio por hidrólisis:



Otros grupos funcionales orgánicos reaccionan con esta entidad para formar compuestos de interés, tales como los alfa hidroxiaácidos, utilizado por Kiliani para la obtención de osas (glucosa, fructuosa, etc.).

En cuanto a su uso, ha sido utilizado como arma química por Alemania en la Primera Guerra Mundial, como también en el holocausto del pueblo hebreo en las cámaras de gas utilizadas por los nazis en la Segunda Guerra Mundial.

La industria por otro lado lo utiliza para la producción de acrilato y metacrilato y adiponitrilo para la síntesis de nylon. Asimismo se lo utiliza en la producción de complejantes, como por ejemplo EDTA, muy utilizado en el laboratorio y en los procesos industriales que involucran metales. También se lo utiliza como agente fumigante en bodegas, barcos de transporte o en lugares muy amplios, dada su alta difusibilidad, aunque su manipulación requiere mucha precaución.

5.1.3 Biotransformación en el hombre

La principal vía de detoxificación de los cianuros es la conversión enzimática a tiocianato, relativamente poco tóxico. Dos enzimas intervienen en este proceso: Rodanasa y Beta mercaptopiruvatocianurotransulfurasa (Sorbo, 1962; Ballantyne, 1974).

La Rodanasa se encuentra principalmente en hígado y riñón y cataliza la siguiente reacción:



La segunda, presente en hígado, riñón y sangre cataliza reacciones de tipo:



En casos de envenenamiento agudo pueden encontrarse altos niveles de tiocianato en sangre. Han sido informados otros mecanismos de biotransformación, por ejemplo, la reacción con cisteína para producir ácido 2-iminotiazolidin-4-carboxílico y la combinación con hidroxicobalamina para formar cianocobalamina (Ballantyne, 1974).

3.1.4. Toxicidad y Manifestaciones clínicas

La estimación de la dosis letal de cianuro en el hombre no es sencilla de determinar.

En las incorporaciones por vía gastrointestinal se ha estimado que cantidades entre 150 a 200 mg son suficientes para producir el óbito, mientras que para el ácido cianhídrico se han informado guarismos entre 50 a 100 mg (Guatelli, 1964; Ballantyne, 1974; Baselt, 2000).

Ballantyne (1974), ha referido que a elevadas concentraciones de HCN en la atmósfera de un espacio confinado existiría una sobrecarga en el mecanismo de desintoxicación endógena, pero cuando el nivel de concentración es bajo, los niveles de acumulación en el organismo se reducirían. En otras palabras, el autor condiciona el funcionamiento óptimo de los mecanismos de desintoxicación a la medida de concentración en la atmósfera donde se generaría el veneno y no tanto a la cantidad incorporada, haciendo mayor hincapié en la relación de concentración por intervalos de tiempo.

Cuando las cantidades de ácido cianhídrico ingresadas al organismo son altas la manifestación de los síntomas es prácticamente instantánea. El individuo pierde inmediatamente la conciencia, pudiendo a veces manifestarse una convulsión tónico-clónica. Se observa además: midriasis, arreflexia pupilar, pulso lento e hipotensión.

Si las concentraciones atmosféricas no son extremas pueden presentarse signos y síntomas más inespecíficos tales como dolor de cabeza, palpitaciones, náuseas, confusión e incontinencia vesical y fecal.

En estadios tempranos de envenenamiento puede observarse una estimulación respiratoria. La taquipnea e hiperapnea están relacionadas obviamente a la inhibición de la citocromooxidasa en los quimiorreceptores. Como resultado de ello se produce acumulación de metabolitos ácidos que estimulan a los señalados quimiorreceptores.

El efecto en el sistema cardiovascular es mucho más complejo de evaluar. El arresto cardíaco es a menudo rápido en el inicio de la intoxicación pero en la fase comatosa se instala una bradicardia de origen sinusal. El electrocardiograma muestra un incremento en la amplitud de la onda T y acortamiento del segmento ST.

Generalmente, las convulsiones preceden a la muerte. Esto último ha sido atribuido a una anoxia de las neuronas cerebrocorticales, aunque también se ha consignado una inhibición de la glutamatodecarboxilasa cerebral por parte del cianuro.

3.1.5. Aspectos médicos forenses

Las observaciones experimentales en varias especies han demostrado que no existen características histológicas o macroscópicas propias del HCN o los cianuros que permitan el diagnóstico de muerte por envenenamiento agudo. Esto es aplicable a casos de envenenamiento en humanos.

Han sido descritas las observaciones más comunes en autopsias: congestión visceral generalizada con un notable edema cerebral y pulmonar, petequias hemorrágicas en cerebro, meninges y pleura.

Algunos autores han expresado que el tipo de olor (almendras amargas) que se desprende del individuo eviscerado es un indicador importante de la intoxicación cianhídrica, estimándose la cantidad mínima detectable en 1 ppm (Guatelli, 1964; Ballantyne, 1974).

Sin embargo debe ejercerse cierta prudencia a la hora de interpretar esto último, especialmente en casos de cuerpos en avanzado estado de putrefacción o con mezclas de otros compuestos químicos ingresados al organismo por las víctimas, ya que pueden confundir el olor típico del HCN. Asimismo debe tenerse en cuenta que el HCN produce una especie de parálisis olfativa, tal como ocurre con el ácido sulfhídrico, bloqueando así la percepción luego de un breve lapso de tiempo. Cabe señalar que algunos individuos poseen una total incapacidad para percibir el olor característico a almendras amargas del HCN.

Por último, las lesiones corrosivas en la mucosa orofaríngea y gástrica son bastante comunes en los episodios de ingestión de cianuros alcalinos.

3.1.6. Analítica Toxicológica

Una variedad de métodos volumétricos, espectrofotométricos y electrométricos han sido descritos para el análisis cuantitativo de cianuros en fluidos y tejidos humanos. Muchos de ellos han sido revisados en detalle (Guatelli, 1964; Ballantyne, 1974; Baselt, 2000).

En la actualidad estos métodos tradicionales están siendo sustituidos por métodos instrumentales de alta performance como lo es la cromatografía gaseosa con distintos detectores entre los que sobresale el detector de Nitrógeno-Fosforo (NP). Otras

modificaciones que permiten un incremento considerable de la selectividad y sensibilidad han sido publicadas (Ishii et al, 1998; Baselt, 2000; Moffat et al, 2004).

5.1.7. Acido cianhídrico en incendio de materiales sintéticos nitrogenados

A los fines de la presente contribución es importante destacar el rol del ácido cianhídrico (HCN) en la combustión de materiales plásticos, que contienen nitrógeno en su estructura.

Guatelli (1992), de autoridad reconocida en el tema, comenta detalladamente ensayos experimentales y accidentes provocados por incendios en los que se genera el HCN, refiriendo intoxicaciones agudas por la liberación masiva del gas.

Si bien existe un considerable número de trabajos sobre producción de HCN en incendios de plásticos nitrogenados, poco en cambio se ha informado sobre este veneno como agente letal más importante en combustiones de plásticos o espumas, como las de poliuretano.

Inclusive diversos especialistas alrededor del mundo, mantienen posturas enfrentadas respecto al rol del HCN en los incendios de materiales plásticos nitrogenados. Algunos opinan que no tiene una incidencia directa en el óbito, otros en cambio sugieren que este veneno es el responsable directo de las muertes (Repetto y Martinez, 1974; Anderson et al, 1979; Lundquist et al, 1989; Ferrari et al, 2001; Alarie, 2002; Walsh et al, 2004).

Cabe señalar que en la fase final de preparación de este trabajo de tesis, en la ciudad de Buenos Aires, el 30 de Diciembre de 2004, sucedió un trágico incendio de un local bailable que costara la vida a 193 personas y resultaran afectadas más de dos mil.

Por otro lado, distintos centros hospitalarios alertaron sobre casos de afectados severamente y que poseían tenores de monóxido de carbono en sangre muy por debajo de los que se espera para intoxicaciones oxicarbonadas por incendios en espacios confinados, tal como sucedió en la tragedia denominada “de Once”.

Los informes iniciales mostraron que los cobertores acústicos del local estaban formados por poliurteano, señalándose asimismo el breve lapso en el que se desencadenó el incendio y el rápido desarrollo de síntomas mostrado por las víctimas. También se hizo mención de una “media sombra” de material plástico que aparentemente habría iniciado el foco ígneo a partir del cual se propagó hacia el resto del ambiente.

Seguramente quedará para el futuro analizar, a la luz de lo que se expone en esta tesis, el rol que tuvo el HCN en la génesis de las muertes en el luctuoso episodio.

5.2. Monóxido de carbono

El monóxido de carbono es un gas incoloro, inodoro e insípido. La densidad relativa es de 0.967. Es soluble en agua (3.54 ml /100 ml de agua). La combustión, que se traduce en una llama de color azul, origina dióxido de carbono. Químicamente se comporta como un compuesto reductor con variadas aplicaciones analíticas.

5.2.1. Propiedades físicas del monóxido de carbono

Punto de ebullición: -191°C

Punto de fusión: -205°C

Densidad relativa (agua = 1): 0.8

Solubilidad en agua, ml/100 ml a 20°C: 2.3

Densidad relativa de vapor (aire = 1): 0.97

Punto de inflamación: Gas inflamable.

Temperatura de autoignición: 605°C

Límites de explosividad, % en volumen en el aire: 12.5 -74.2

Si bien sus efectos eran conocidos desde la antigüedad, a partir de la aparición del fuego en la humanidad, el mecanismo de intoxicación recién comenzó a estudiarse con profundidad desde los inicios del siglo pasado. En 1925, Nicloux había podido determinar que si dos tercios de la sangre se hallaban como carboxihemoglobina el individuo fallecía como consecuencia de una anoxia de tipo anémica (Fabre y Truhaut, 1976).

Una década después Haldane y Graham (Guatelli, 1992) establecieron el equilibrio relativo y las constantes de afinidad de la hemoglobina con el oxígeno y el monóxido de carbono. La formación de oxihemoglobina y carboxihemoglobina son reacciones reversibles y dependen de la presión parcial de los gases y del pH sanguíneo. La presión parcial de oxígeno (PO₂) y de monóxido de carbono (PCO) se halla relacionada con las concentraciones de oxihemoglobina y carboxihemoglobina según la ecuación:

$$\frac{\text{Hb.Fe.CO}}{\text{Hb.Fe.O}_2} = \frac{\text{M.PCO}}{\text{PO}_2} \quad (7)$$

Siendo M la constante de afinidad relativa, estimada por numerosos autores entre 200 y 300 (Guatelli, 1970).

5.2.2. Toxicocinética y mecanismo de acción del monóxido de carbono

El monóxido de carbono se absorbe a través de los pulmones y la concentración de carboxihemoglobina en la sangre dependerá en todo momento de varios factores. Cuando hay un equilibrio con el aire ambiente, el contenido de carboxihemoglobina de la sangre dependerá fundamentalmente de las concentraciones de monóxido de carbono y de oxígeno inspirados. Sin embargo, si no se ha alcanzado el equilibrio, la concentración dependerá también de la duración de la exposición, de la ventilación pulmonar y de la concentración de carboxihemoglobina originalmente presente antes de la inhalación del aire contaminado. Además de su reacción con la hemoglobina, el monóxido de carbono se combina con la mioglobina, los citocromos y las enzimas metálicas, como la citocromo c oxidasa y el citocromo P-450. No se conoce completamente la influencia de estas reacciones en la salud, aunque probablemente sean menos importantes los niveles de exposición del medio ambiente que con la hemoglobina.

El intercambio de monóxido de carbono entre el aire que respiramos y el organismo humano está controlado por procesos tanto físicos (por ejemplo, transporte y difusión masivos) como fisiológicos (ventilación alveolar y rendimiento cardíaco). El monóxido de carbono pasa fácilmente de los pulmones a la corriente sanguínea. La fase final en este proceso consiste en la unión competitiva del monóxido de carbono y el oxígeno a la hemoglobina en los glóbulos rojos, formando carboxihemoglobina y oxihemoglobina (O_2Hb), respectivamente. La unión del monóxido de carbono a la hemoglobina, que produce carboxihemoglobina y reduce la capacidad de transporte de oxígeno de la sangre, parece ser el principal mecanismo de acción que desencadena la inducción de los efectos tóxicos de la exposición a concentraciones bajas de monóxido de carbono. No se conocen totalmente los mecanismos precisos de inducción de los efectos tóxicos mediante la formación de carboxihemoglobina, pero probablemente se deban a la inducción de un estado hipóxico en muchos tejidos de distintos órganos. Se han propuesto como hipótesis mecanismos alternativos o secundarios de toxicidad inducida por el monóxido de carbono (además de la carboxihemoglobina), pero no se ha demostrado en ninguno de ellos que funcionen con niveles de exposición al monóxido de carbono relativamente bajos (casi ambientales). Así actualmente se acepta que la concentración de carboxihemoglobina en la sangre representa un marcador fisiológico útil para estimar la carga interna de monóxido de carbono debida a la contribución combinada del monóxido de carbono de origen endógeno y el monóxido de carbono de origen exógeno procedente de la exposición a fuentes externas.

La concentración de carboxihemoglobina procedente de exposición externa al gas letal se puede calcular razonablemente bien utilizando la ecuación de Coburn-Foster-Kane (CFK).

Por consiguiente, una característica única de la exposición al monóxido de carbono es que el nivel de carboxihemoglobina en la sangre representa un marcador biológico fundamental en la determinación de la dosis que ha recibido la persona.

La cantidad de carboxihemoglobina que se forma depende de la concentración y duración de la exposición al monóxido de carbono, del ejercicio (que aumenta la cantidad de aire inhalado por unidad de tiempo), de la temperatura ambiente, del estado de salud y del metabolismo específico de la persona expuesta.

La formación de carboxihemoglobina es un proceso reversible; sin embargo, debido a la fuerte unión del monóxido de carbono a la hemoglobina, el período de semi-eliminación es bastante largo, oscilando entre 2 y 6,5 horas, en función de la concentración inicial de carboxihemoglobina y de la tasa de ventilación de las personas. Esto podría llevar a la acumulación de carboxihemoglobina, y bastarían concentraciones relativamente bajas de monóxido de carbono para producir niveles considerables de carboxihemoglobina en la sangre.

La concentración de carboxihemoglobina en la sangre se puede determinar de manera directa mediante el análisis de la sangre o de modo indirecto midiendo la concentración de monóxido de carbono en el aire expirado. La medición del aire expirado tiene la ventaja de facilidad, rapidez y precisión con una mayor aceptación que la medición de la carboxihemoglobina en la sangre. Sin embargo, la exactitud del procedimiento en aire expirado y la validez de la relación de Haldane entre la respiración y la sangre siguen sin estar claras para la exposición a concentraciones bajas de monóxido de carbono en el medio ambiente.

Considerando que no se disponen fácilmente de mediciones de carboxihemoglobina en la población expuesta, se han elaborado modelos matemáticos para pronosticar las concentraciones de esta a partir de exposiciones conocidas al monóxido de carbono en diversas circunstancias. El modelo mejor conocido para el pronóstico de la carboxihemoglobina sigue siendo la ecuación de Coburn, Forster y Kane. La solución lineal es útil para examinar los datos de contaminación del aire que producen niveles relativamente bajos de carboxihemoglobina, mientras que la solución no lineal ofrece una buena capacidad de pronóstico incluso para la exposición a concentraciones elevadas de monóxido de carbono. Los modelos de regresión podría ser útiles sólo cuando las condiciones de aplicación son muy próximas a las reinantes al calcular los parámetros.

Aunque se considera que la causa principal de la toxicidad del monóxido de carbono a niveles de exposición bajos es la hipoxia de los tejidos, ciertos aspectos fisiológicos de la exposición al monóxido de carbono no se pueden explicar bien por la disminución de la presión parcial de oxígeno intracelular dada la presencia de carboxihemoglobina. Por consiguiente, muchas investigaciones se han concentrado en los mecanismos secundarios de la toxicidad del monóxido de carbono relacionada con su absorción intracelular. La unión del monóxido de carbono a muchos compuestos intracelulares está bien documentada tanto *in vitro* como *in vivo*; sin embargo, no se sabe todavía si la absorción intracelular de monóxido de carbono en presencia de hemoglobina es suficiente o no para provocar una disfunción aguda del órgano o efectos en la salud a largo plazo. La práctica inexistencia de técnicas sensibles capaces de evaluar la fijación del monóxido de carbono intracelular en condiciones fisiológicas ha dado lugar a una serie de enfoques indirectos del problema, así como a numerosos estudios con resultados negativos.

Los conocimientos actuales sobre la fijación del monóxido de carbono intracelular apuntan a la mioglobina, que se encuentra fundamentalmente en el corazón y en el músculo esquelético y a la citocromo oxidasa, proteína cuya función queda inhibida por la presencia de concentraciones elevadas de carboxihemoglobina. No se conoce en este momento la importancia fisiológica de la absorción de monóxido de carbono por la mioglobina, pero una concentración suficiente de carboximioglobina podría limitar potencialmente la absorción máxima de oxígeno por el músculo en ejercicio. Aunque hay pruebas que parecen indicar la existencia de una unión considerable de monóxido de carbono a la citocromo oxidasa en los tejidos del corazón y del cerebro, es poco probable que se produzca la unión de una cantidad significativa de monóxido de carbono en presencia de concentraciones bajas de carboxihemoglobina.

5.2.3. Efectos en la salud de la exposición al monóxido de carbono

La importancia para la salud del monóxido de carbono presente en el aire ambiente se debe fundamentalmente a la unión mediante un enlace fuerte a la molécula de la hemoglobina para formar carboxihemoglobina, que limita la capacidad de transporte de oxígeno en la sangre. La presencia de la carboxihemoglobina altera también la disociación de la oxihemoglobina, de manera que la distribución del oxígeno a los tejidos se reduce luego. La afinidad de la hemoglobina humana por el monóxido de carbono es alrededor de 240 veces superior a la del oxígeno y las proporciones de carboxihemoglobina y oxihemoglobina que se forman en la

sangre dependen en gran medida de la presión parcial del monóxido de carbono y del oxígeno.

La preocupación acerca de los posibles efectos de la exposición al monóxido de carbono para la salud se ha expuesto en amplios estudios en seres humanos y con diversas especies de animales. Mediante una serie de protocolos experimentales se ha obtenido abundante información sobre la toxicidad del monóxido de carbono, sus efectos directos en la sangre y en otros tejidos y las manifestaciones de estos efectos en forma de cambios en el funcionamiento de los órganos. Sin embargo, muchos de los estudios animales se han realizado con concentraciones de monóxido de carbono extremadamente altas (es decir, niveles que no se encuentran en el aire ambiente). Aunque los efectos graves de la exposición a estas concentraciones elevadas de monóxido de carbono no están directamente relacionados con los problemas que se derivan de la exposición a los niveles normales de monóxido de carbono en el medio ambiente, han proporcionado una información valiosa acerca de los posibles efectos de la exposición accidental al monóxido de carbono, en particular de las exposiciones que se producen en espacios cerrados.

5.2.3.1 Efectos cardiovasculares

En adultos jóvenes sanos se ha observado claramente una menor absorción de oxígeno y la consiguiente disminución de la capacidad de trabajo en condiciones de ejercicio máximo a partir de una concentración de carboxihemoglobina del 5.0%, y en varios estudios se ha detectado una pequeña disminución en la capacidad de trabajo con concentraciones de carboxihemoglobina de sólo 2.3%-4.3%. Estos efectos pueden tener repercusiones en la salud de la población general, en cuanto a la limitación potencial de ciertas actividades profesionales o recreativas que requieren un esfuerzo físico grande en circunstancias de exposición a concentraciones de monóxido de carbono suficientemente altas.

Con los niveles de exposición al monóxido de carbono más comunes en el ambiente el motivo de mayor preocupación son: determinados efectos cardiovasculares que tienen probabilidad de presentarse en un segmento de la población general más pequeño, pero representativo. Este grupo formado por los enfermos con angina crónica, está considerado actualmente el de mayor riesgo sensible a los efectos de la exposición al monóxido de carbono, basándose en las pruebas de agravamiento de la angina que se produce en estos enfermos cuando se exponen a concentraciones de carboxihemoglobina del 2.9%-4.5%. La relación dosis-respuesta para los efectos cardiovasculares en pacientes con cardiopatía coronaria todavía no se ha definido de

manera concluyente y no se puede descartar por el momento la posibilidad de que puedan producirse tales efectos con concentraciones de carboxihemoglobina inferiores al 2.9 %. Por consiguiente, en el presente documento se examinan nuevos estudios publicados para determinar los efectos del monóxido de carbono en el agravamiento de la angina con niveles de carboxihemoglobina del 2.0%-6.0%.

En cinco estudios básicos se ha investigado la posibilidad que la exposición al monóxido de carbono favorezca la aparición de isquemia miocárdica durante el ejercicio en pacientes con cardiopatía coronaria. En un estudio inicial se comprobó que la duración del ejercicio disminuía considerablemente por la aparición del dolor de pecho (angina) en pacientes con angina de pecho después de la exposición a concentraciones de carboxihemoglobina de apenas un 2.9%, lo que representa un aumento de la concentración de la misma del 1.6% sobre el valor de referencia. Los resultados de un amplio estudio multicéntrico demostraron la aparición de efectos en pacientes con angina inducida por el ejercicio reproducible después de la exposición a concentraciones de carboxihemoglobina del 3.2%, correspondiente a un aumento de la concentración del 2.0% sobre el valor de referencia. En otros estudios se observaron efectos semejantes en pacientes con cardiopatía coronaria obstructiva y pruebas de isquemia inducida por el ejercicio después de la exposición a concentraciones de carboxihemoglobina del 4.1% y 5.9%, respectivamente, lo que representa un aumento del 2.2% y del 4.2% sobre el valor de referencia. En un estudio con enfermos de angina se observaron efectos con concentraciones del 3%, lo que representa un aumento del 1.5% con respecto al valor de referencia. Así pues, la concentración más baja con efectos adversos observados en pacientes con isquemia inducida por el ejercicio se sitúa entre el 3.0% y el 4.0%, equivalente a un aumento del 1.5% -2.2% con respecto al valor de referencia. No se han estudiado los efectos en los episodios de isquemia silenciosa, que son la mayoría en este tipo de pacientes.

Las consecuencias adversas para la salud de la exposición a concentraciones bajas de monóxido de carbono en pacientes con cardiopatía isquémica son muy difíciles de pronosticar en la población de personas con riesgo a causa de enfermedades cardíacas. Se ha observado que la exposición a concentraciones de monóxido de carbono suficientes para alcanzar un 6.0% de carboxihemoglobina, pero no para valores inferiores de ésta, aumenta considerablemente el número y la complejidad de las arritmias inducidas por el ejercicio en pacientes con cardiopatía coronaria y ectopia básica. Este resultado, junto con los estudios de series cronológicas de morbilidad y mortalidad relacionadas con el monóxido de carbono y

los estudios epidemiológicos con trabajadores de túneles, que normalmente están expuestos a los gases de escape de los automóviles, parece indicar que la exposición al monóxido de carbono puede crear un mayor riesgo de muerte repentina por arritmia en pacientes con cardiopatía coronaria, pero no es una prueba concluyente.

En evaluaciones anteriores de los efectos cardiovasculares del monóxido de carbono se ha indicado que parece haber una relación lineal entre la concentración de carboxihemoglobina en la sangre y la disminución del rendimiento humano con el ejercicio máximo, medido como absorción máxima de oxígeno. El rendimiento durante el ejercicio de las personas jóvenes, sanas, no fumadoras disminuye sistemáticamente con una concentración en sangre de alrededor del 5.0%. En algunos estudios se ha observado incluso una disminución a corto plazo de la duración del ejercicio máximo con niveles de sólo un 2.3%-4.3% de carboxihemoglobina; sin embargo, esa disminución es tan pequeña que sólo suscita preocupación en el caso de los atletas de competición, más que en las personas comunes que realizan las actividades cotidianas.

También hay pruebas basadas tanto en consideraciones teóricas como en estudios experimentales con animales de laboratorio en los cuales el monóxido de carbono puede afectar negativamente al sistema cardiovascular, en función de las condiciones de exposición utilizadas en esos estudios. Aunque se han observado alteraciones en el ritmo y la conducción cardíacos en animales sanos y en otros con insuficiencia cardíaca, los resultados de esos estudios no son concluyentes. El nivel más bajo en el cual se han observado efectos varía en función del régimen de exposición utilizado y de las especies sometidas a prueba. Los resultados obtenidos en estudios animales indican que el monóxido de carbono inhalado puede aumentar la concentración de hemoglobina y la razón de hematocrito, como probable reacción para compensar el efecto de la reducción de la capacidad de transporte de oxígeno debida al monóxido de carbono. Con concentraciones altas de monóxido de carbono, el aumento excesivo de la hemoglobina y el valor hematocrito puede imponer una carga adicional al corazón y comprometer el flujo sanguíneo de los tejidos.

Hay pruebas contradictorias en las cuales la exposición al monóxido de carbono favorece la aparición de aterosclerosis en animales de laboratorio. Igualmente, la posibilidad que el monóxido de carbono fomente cambios significativos en el metabolismo de los lípidos que puedan acelerar la aterosclerosis solamente se indica en un pequeño número de estudios. Cualquier efecto de este tipo será como máximo poco perceptible. Por último, es probable que el monóxido de carbono inhiba la agregación de las plaquetas más que fomentarla. En general

se dispone de pocos datos que indiquen que probablemente se produciría un efecto aterogénico por la exposición en poblaciones humanas con las concentraciones de monóxido de carbono que normalmente se encuentra en el medio ambiente.

5.2.3.2. Efectos pulmonares agudos

No es probable que el monóxido de carbono tenga ningún efecto directo en el tejido pulmonar, excepto en concentraciones extremadamente altas asociadas con la intoxicación por monóxido de carbono. Los estudios de los efectos del monóxido de carbono en la función pulmonar realizados con personas se complican por la falta de una información adecuada sobre la exposición, el pequeño número de personas estudiadas y la brevedad de las exposiciones investigadas. La exposición ocupacional o accidental a los productos de combustión y la pirólisis, particularmente en espacios cerrados, pueden producir una disminución aguda de la función pulmonar si las concentraciones de carboxihemoglobina son altas. Sin embargo, es difícil separar los efectos potenciales del monóxido de carbono de los respectivos a otras sustancias del humo y los gases de escape que son irritantes del aparato respiratorio. En estudios de poblaciones comunitarias sobre el monóxido de carbono en el aire ambiente no se ha encontrado una relación significativa con la función, la sintomatología y las enfermedades pulmonares.

5.2.3.3. Efectos cerebrovasculares y neurocompartimental

No se han notificado pruebas fidedignas demostrativas de una reducción de la función del neurocomportamiento en adultos jóvenes sanos con concentraciones de carboxihemoglobina inferiores al 5%. Los resultados de los estudios realizados con una concentración del 5% o superior son equívocos. En gran parte de las investigaciones realizadas con un 5% no se observó ningún efecto, incluso cuando había comportamientos similares a los afectados en estudios con concentraciones más altas de carboxihemoglobina. Sin embargo, los investigadores no pudieron encontrar una disminución del neurocomportamiento relacionada con el monóxido de carbono en concentraciones del 5% o superiores, tal vez debido a que utilizaron pruebas que no eran suficientemente sensibles para detectar de manera fidedigna pequeños efectos del monóxido de carbono. Así pues, teniendo en cuenta las pruebas empíricas, se puede decir que las concentraciones de carboxihemoglobina superiores al 5% pueden producir una disminución de la función del neurocomportamiento. Sin embargo, no se puede afirmar con seguridad que los niveles inferiores al 5% no tengan ningún efecto. Sin

embargo, solamente se han estudiado adultos jóvenes sanos utilizando pruebas cuya sensibilidad se puede demostrar y a concentraciones consignadas. Por consiguiente, no se ha investigado el problema de los grupos con riesgo especial de efectos del monóxido de carbono en el comportamiento.

Un caso especial es el de las personas que están tomando medicamentos con efectos depresores primarios o secundarios, en las que cabría esperar que se agravara la disminución del comportamiento neurológico relacionada con el monóxido de carbono. Otros grupos posiblemente con más riesgo en cuanto a este último efecto, inducidos por el monóxido de carbono son los ancianos y los enfermos, pero en estos grupos no se ha evaluado tal riesgo.

En circunstancias normales, el cerebro puede aumentar el flujo sanguíneo o la extracción de oxígeno de los tejidos para compensar la hipoxia provocada por la exposición al monóxido de carbono. La respuesta general del sistema cerebro vascular es semejante en el feto, en el recién nacido y en el animal adulto; sin embargo, todavía se sabe poco acerca del mecanismo que determina el aumento del flujo sanguíneo en el cerebro. En realidad, parece probable que el aumento del flujo sanguíneo se deba a varios mecanismos que actúan simultáneamente, en ellos podrían intervenir aspectos metabólicos y neurales, así como la curva de disociación de la oxihemoglobina, los niveles de oxígeno en los tejidos e incluso un efecto histotóxico del monóxido de carbono. Tampoco se sabe si estos mecanismos compensatorios seguirían funcionando con éxito en una serie de condiciones en las que el cerebro y su sistema vascular se ven comprometidos (es decir, apoplejía, traumatismos craneoencefálicos, arterioesclerosis e hipertensión). El envejecimiento aumenta la probabilidad de estas lesiones y enfermedades. También es posible que existan diferencias individuales respecto a la sensibilidad a la carboxihemoglobina y los mecanismos compensatorios.

Los comportamientos que requieren atención constante o un rendimiento duradero son los más sensibles a las alteraciones debidas a la carboxihemoglobina. El grupo de estudios humanos sobre la coordinación entre las manos y los ojos (seguimiento compensatorio), la detección de conductas no frecuentes (vigilancia) y el rendimiento continuado ofrece las pruebas más convincentes y defendibles de los efectos de la carboxihemoglobina en el comportamiento a concentraciones de apenas un 5%. Sin embargo, estos efectos con concentraciones bajas de exposición al monóxido de carbono han sido muy pequeños y algo controvertidos.

5.2.4. Monóxido de carbono en el humo de tabaco

Además de ser una fuente de monóxido de carbono tanto para los fumadores como para los no fumadores, el humo del tabaco es también una fuente de otras sustancias químicas que pueden tener una interacción con el monóxido de carbono del medio ambiente. Los datos disponibles parecen demostrar de manera convincente que la exposición aguda y crónica al monóxido de carbono atribuida al humo del tabaco puede afectar al sistema cardiopulmonar, pero la posible interacción del monóxido de carbono con otros productos del humo del tabaco crea confusión en los resultados. Además, no está claro si el aumento adicional de la carboxihemoglobina debido a la exposición en el medio ambiente sería en realidad aditivo con las concentraciones de la misma, elevadas crónicamente debido al humo del tabaco, puesto que puede haber cierta adaptación fisiológica.

La mayor parte de la información sobre los efectos del monóxido de carbono sobre la salud se refieren a dos grupos de población cuidadosamente definidos: adultos sanos jóvenes y pacientes con cardiopatía coronaria diagnosticada. De acuerdo con los efectos conocidos descritos, los pacientes con isquemia inducida por el ejercicio parecen ser los mejor definidos como grupo sensible dentro de la población general que corre un riesgo mayor de experimentar efectos preocupantes en la salud (es decir, menor duración del ejercicio debido al agravamiento de síntomas cardiovasculares) con las concentraciones de exposición al monóxido de carbono del medio ambiente o próximas a ellas que dan lugar a un descenso de los niveles de carboxihemoglobina al 3%.

5.2.5. Intoxicación por monóxido de carbono

En este ítem nos ocuparemos de las concentraciones relativamente bajas de monóxido de carbono que inducen efectos en el ser humano en el margen inferior de la detección de la carboxihemoglobina mediante la tecnología actual y los casos de incendio que generan concentraciones muy peligrosas del gas, más aún cuando los espacios son confinados y poco ventilados.

Ahora bien, los efectos asociados con la exposición a este contaminante van desde los cardiovasculares y de neurocomportamiento más leves a concentraciones bajas en el medio ambiente hasta la inconsciencia y la muerte tras una exposición aguda a concentraciones elevadas de monóxido de carbono. La morbilidad y la mortalidad debidas a estas últimas exposiciones pueden ser motivo de preocupación importante para la salud pública.

Al monóxido de carbono se debe un porcentaje elevado de las intoxicaciones y muertes accidentales notificadas en todo el mundo cada año. Se dan ciertas condiciones tanto del medio ambiente interior como del exterior que provocan la exposición de un pequeño porcentaje de la población a concentraciones peligrosas de monóxido de carbono. En el exterior, las mayores concentraciones de monóxido de carbono se registran cerca de los cruces de calles, con un tráfico intenso, cerca de los gases de escape de los motores de combustión interna y de fuentes industriales y en zonas poco ventiladas, como los lugares cerrados y los túneles. En espacios interiores, las concentraciones de monóxido de carbono alcanzan un nivel máximo en los sitios de trabajo o los hogares que tienen aparatos de combustión defectuosos o mal ventilados o bien con corrientes descendentes o contracorrientes. En este punto vemos una continuada afluencia de casos al laboratorio forense de familias enteras que fallecen a consecuencia de la intoxicación con CO que se hace imperceptible para los habitantes de un hogar en la fase de incorporación del tóxico.

Resulta llamativo, por ejemplo, que una pequeña llama procedente del piloto de un calefón ocasione el óbito de las personas que permanecen en ese recinto. Aquí debemos recordar el principio de que cuanto mayor consumo de oxígeno hay en un ambiente (condiciones reductoras) y temperatura elevada (alrededor de la llama) el monóxido de carbono se produce con mayor facilidad y en concentraciones que aumentan en forma geométrica según la temperatura del foco ígneo.

Este razonamiento es válido para los casos de incendio, donde la temperatura se incrementa a tenores muy altos, con la consecuente formación masiva del gas letal.

Es escasa la correlación entre los síntomas y los signos de la intoxicación aguda por monóxido de carbono y el nivel de carboxihemoglobina medido en el momento de la llegada al hospital. Niveles inferiores al 10% no se suelen asociar con síntomas. A concentraciones mayores del 10%-30%, pueden producirse síntomas neurológicos debidos a la intoxicación por monóxido de carbono, por ejemplo dolor de cabeza, mareos, debilidad, náuseas, confusión, desorientación y alteraciones visuales. Con una exposición continua, que produce niveles de carboxihemoglobina del 30% al 50%, se observa disnea por esfuerzo, aumento del ritmo del pulso y la respiración y síncope. Cuando las concentraciones son superiores al 50%, puede producirse coma, convulsiones y paro cardiopulmonar.

En la intoxicación por monóxido de carbono se producen con frecuencia complicaciones (muerte inmediata, trastornos del miocardio, hipotensión, arritmias, edema pulmonar). Tal vez el efecto más insidioso de la intoxicación por monóxido de carbono sea la aparición retardada

de trastornos neuropsiquiátricos en un plazo de una a tres semanas, junto con consecuencias para el neurocomportamiento, especialmente en los niños. La intoxicación por monóxido de carbono durante el embarazo representa un riesgo elevado para la madre, aumentando la tasa de complicaciones a corto plazo, y también para el feto, provocando la muerte fetal, trastornos del desarrollo y lesiones anóxicas cerebrales. Además, la gravedad de la intoxicación fatal no se puede evaluar por la tasa materna.

La intoxicación por monóxido de carbono habitualmente tiene consecuencias graves, incluso la muerte inmediata, lleva consigo complicaciones y secuelas tardías y con frecuencia se la pasa por alto. Hay que fomentar los esfuerzos de prevención y de educación pública y médica. La Figura 12 ilustra mediante gráficos de torta las estadísticas sobre el origen de las emanaciones de monóxido de carbono (gráfico superior) y las situaciones que originan accidentes graves o fatales (gráfico inferior).

La Figura 13 esquematiza el procedimiento terapéutico aplicado a los intoxicados por el letal veneno.

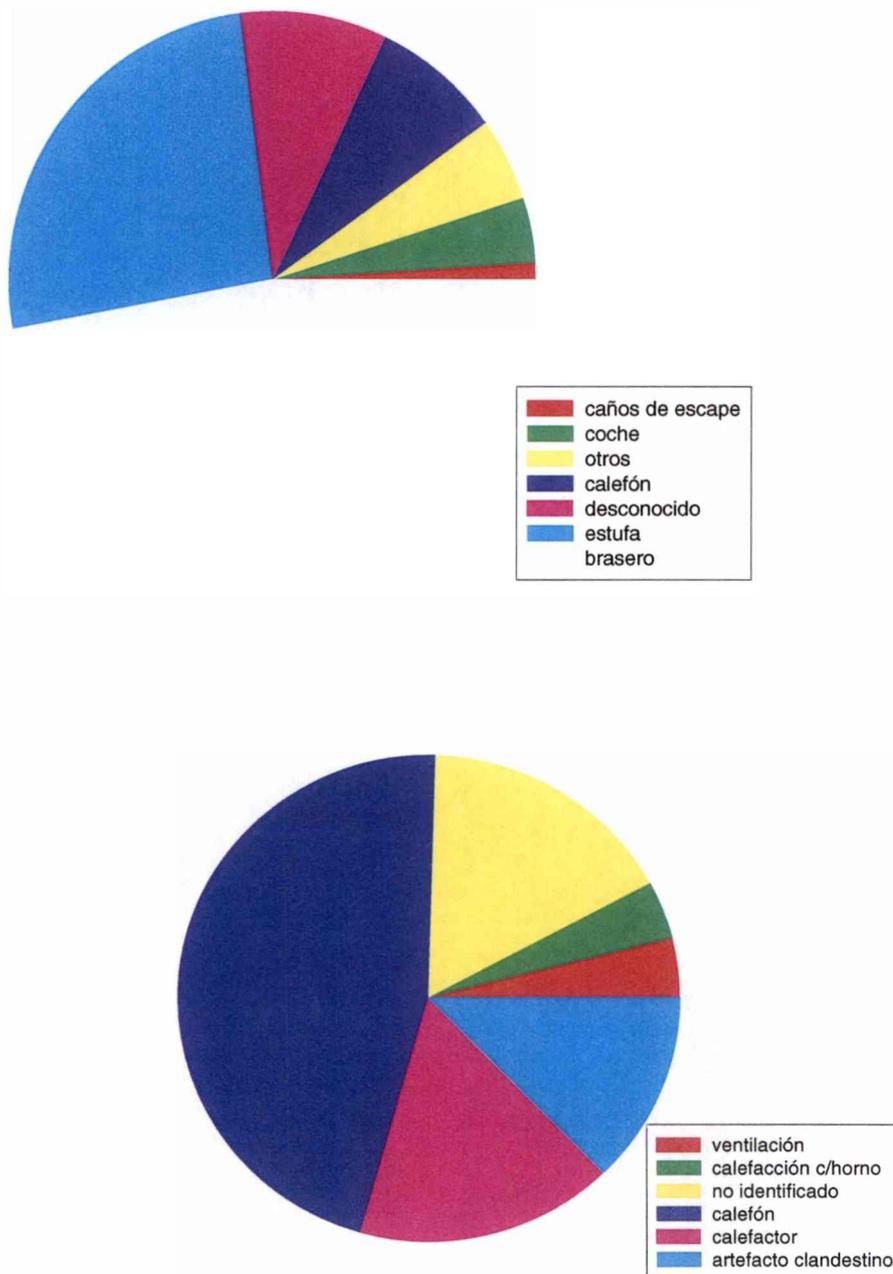


Figura 12 Estadística sobre incidentes reportados con sospecha de intoxicación oxicarbonada (fuente: Enargas).

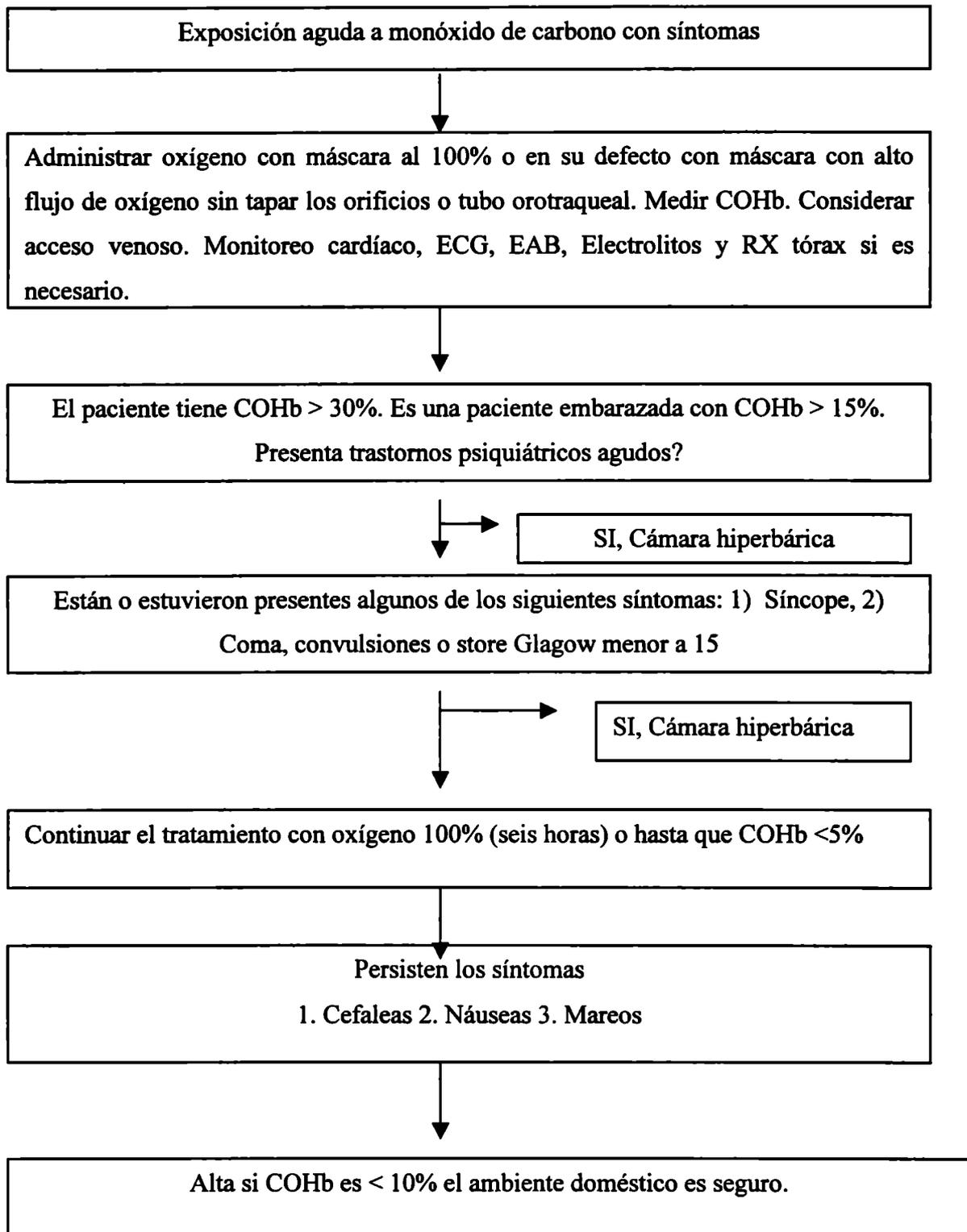


Figura 13 Esquema de tratamiento terapéutico para intoxicaciones oxicarbonadas (Fuente: Maldonado et al, 2004- cit. ENARGAS)

CAPITULO 6

DROGAS DE USO INDEBIDO

6.1. Introducción

En los últimos años se ha registrado un considerable aumento en el consumo de drogas de abuso. La convergencia de una serie de estructuras colectivas ha potenciado dicho consumo, llegando a constituir un fenómeno epidemiológico común tanto a jóvenes conflictivos, simplemente ansiosos de experimentar nuevas sensaciones o influenciados por el grupo de amigos con el que se relacionan, como a los adultos con una fuerte dependencia del tabaco, alcohol ó cafeína, ejecutivos que recurren a la cocaína para mantener el ritmo frenético de su actividad o personas que han hecho del poder anoréxico de las anfetaminas un elemento indispensable para el mantenimiento de la línea, o de los somníferos, la panacea para conciliar el sueño (Saint Feliu, 1978). Asimismo, mencionamos las benzodiazepinas, psicotrópicos a los que erróneamente se les atribuyen propiedades de desactivar estados nerviosos, agresivos o sicótico, desconociéndose efectos colaterales tales como ataques de agresividad en paciente con una historia de bajo nivel de tolerancia a la frustración e impulsos autodestructivos (Moizeczowicz, 1998).

El problema de la droga hunde sus raíces en las características de todo un modelo de convivencia.

Por otro lado, organismos nacionales e internacionales de fiscalización, medios periodísticas y revistas especializadas, nos informan sobre el aumento alarmante y sin precedentes del volumen de drogas incautadas, planteando un problema difícil no solo a los servicios nacionales de represión, sino también al personal técnico y científico de laboratorios forenses. La aparición de nuevas drogas ó combinaciones de drogas, resultado del ingenio de productores y traficantes ilícitos obliga a los analistas utilizar métodos de identificación y análisis más rápidos, más exactos y más específicos (United Nations- Narcotics Drugs, 1995). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el nombre *droga* resulta aplicable a toda sustancia, terapéutica o no, que introducida en el cuerpo por cualquiera de los mecanismos clásicos mediatos (inhalación de vapores o humos, ingestión, fricciones, etc.) o inmediatos (administración parenteral, endovenosa, subcutánea, intramuscular) es capaz de actuar sobre el sistema nervioso central del individuo hasta provocar en él una alteración física o intelectual, la experimentación de nuevas sensaciones o la modificación de su estado psíquico. Esa modificación condicionada por los efectos inmediatos (psicoactivos) o persistentes (crónicos), predispone a una reiteración continuada en el uso del producto.

Las características físicas y químicas de la droga como también el conocimiento de las diversas vías de administración, incidencia y formas de uso, el estudio integral de la biotransformación en individuos vivos y en casos post-mortem, es de gran utilidad para efectuar la correcta elección de las diversas matrices biológicas.

Asimismo, el empleo de un buen método de aislamiento, una correcta elección del instrumental analítico y una interpretación de los resultados con criterio, constituyen una contribución más que necesaria en el estudio serio de las drogas.

En el presente esquema de trabajo se procederá a describir detalles botánicos de la hoja de coca, las características físicas y químicas de la cocaína, droga objeto de uso indebido de mayor empleo en nuestro medio, aspectos del uso y abuso, estudio analítico en materiales biológicos (orina, sangre, vísceras y matrices alternativas, como el pelo) y por último una descripción tendiente a interpretar los resultados analíticos obtenidos en los estudios de biotransformación in vivo y los de post toma de muestra.

6.2. La hoja de coca y la cocaína

6.2.1. Consideraciones Botánicas y socio-culturales sobre la hoja de coca

Alcaloide extraído de "*Erythroxylon coca*" de la que existen variedades, siendo una de las principales la *E.coca* var. coca, o coca boliviana y la *E. novogranatense* var. Truxillense ó coca de Trujillo (Garnica López, 1988). A continuación se describen los aspectos sobresalientes de las variedades más utilizadas ya sea para el consumo como masticatorio de los indígenas en la zona del altiplano, como las procuradas por los narcotraficantes para la obtención de la cocaína en estado puro con fines ilegales.

Existen cuatro variedades de hojas de coca en diferentes regiones de América del sur, las que fueron utilizadas como aculli o sus variantes, práctica milenaria que a la luz de los conocimientos actuales demuestra que dicha forma de uso de la hoja de coca radica en sus propiedades estimulantes. Sin embargo algunos autores atribuyen a la hoja de coca propiedades alimenticias o nutrientes, atento haberse determinado la existencia de vitaminas, minerales, grasas, y aún proteínas (Garnica López, 1988; Plowman, 1984).

Por hoja de coca se entiende a la hoja del arbusto de coca, salvo las hojas de las que se halla extraído toda la ecgonina, la cocaína o cualquier otro alcaloide de la ecgonina.

En el siglo XIX, se desarrollaron los métodos de análisis de los compuestos químicos. Gracias a la optimización de estos métodos se pudo extraer el alcaloide puro y otras sustancias.

Joseph de Jussien, en 1750 importó por primera vez a Francia plantas de coca de Bolivia, después de haber comprobado que sus habitantes hacían uso de ellas como “alimento”. En 1855, el químico alemán Friedrich Gädcke fue probablemente quien aisló por primera vez el alcaloide cocaína de la hoja de coca. Albert Niemann, de la Universidad de Göttingen, caracterizó químicamente a esta sustancia en el año 1859.

Luego de lograda la síntesis del clorhidrato de cocaína, las empresas farmacéuticas norteamericanas y europeas recomendaron la aplicación de dicho alcaloide para paliar varias dolencias y enfermedades. Las investigaciones científicas revelaron inconsistencia en la mayor parte de las indicaciones que se instituían con el fin de mitigar dolencias. Sin embargo, algunos médicos de la época, entre ellos Sigmund Freud, contribuyeron aunque sin intención, a precipitar la primera epidemia de cocainomanía, al recomendarla para el tratamiento de adicción a la morfina; hoy vivimos la segunda epidemia de abuso de la cocaína, la cual es más extensa y más grave que la primera.

Si bien las diferencias geográficas, ecológicas y morfológicas en las variedades de coca estaban consignadas inicialmente en el siglo XVI, su significado no fue reconocido hasta 1970.

El arbusto de coca pertenece al género *Erythroxylum*, familia *Erythroxylaceas*. Las especies *Erythroxylum* se originan en América tropical con alrededor de 200 especies; también existen en África, Madagascar, India y Oceanía. En Europa muchas especies silvestres son empleadas en medicina folklórica.

Toda la coca cultivada es derivada de dos especies relacionadas: *E.coca Lam.* y *E. novogranatense*, que como otras especies silvestres geotrópicas de *Erythroxylum* pueden ser empleadas como medicamento.

Las cuatro cocas cultivadas en Sud América son: *E. coca* var. *coca*, *E. coca* var. *Ipadú*, *E. novogranatense* var. *novogranatense* y *E. novogranatense* var. *truxillense*. Todas las variedades de coca cultivadas han sido domesticadas independientemente en los tiempos precolombinos y son muy utilizadas por los nativos coqueadores en Sud América. En aquel tiempo eran conocidas por su nombre nativo diferente antes de la popularización de la genérica coca.

Si bien las variedades difieren en el contenido de alcaloides y otros constituyentes químicos, todas las cocas cultivadas contienen el alcaloide cocaína en mayor proporción que en las silvestres.

Las cuatro variedades de coca cultivadas están íntimamente relacionadas una con otra, respecto de alguna otra especie de *Erythroxylum*.

Esta clasificación fue sustentada por un programa de investigación multidisciplinario que incluyó estudios sobre la anatomía de la hoja y del tallo, los flavonoides de las hojas y experimentos de hidratación; sistemas de producción, alcaloides, como así también estudios tradicionales de morfología, ecología, relaciones y distribución geográfica de la coca.

6.2.2. Tratamiento de la hoja de coca con fines ilícitos

Es sabido que grandes plantaciones de hoja de coca son utilizadas por agrupaciones narcotraficantes para la obtención del clorhidrato de cocaína, por extracción del alcaloide de los innumerables componentes orgánicos con estructura química relacionada que posee el vegetal.

Amplias piletas sirven de receptáculo de las hojas que son tratadas con agua acidulada y posteriormente alcalinizada y extraída con querosenos de diversos cortes. La hoja agotada es retirada y la fracción orgánica sometida a una extracción, previo tratamiento con solución de permanganato de potasio, utilizado con el fin de destruir la cinamoilcocaína (alcaloide muy tóxico extraído conjuntamente con la cocaína). En esta etapa se obtiene lo que se denomina “pasta de coca”, que es una masa muy impura que contiene sulfatos, alcaloides que acompañan a la cocaína y otras impurezas no deseadas.

Los pasos posteriores son muy importantes para obtener un producto de alta pureza y consiste en precipitar la cocaína como cocaína base y luego extraerla (generalmente con éter etílico) y redisolverla con solución clorhídrica, para obtener la cocaína en estado de clorhidrato.

Las Naciones Unidas y las agencias de control de drogas de los países más avanzados han puesto mucho énfasis en el control de las materias primas necesarias para la consecución de los procedimientos descriptos. Así, es controlada la venta de éter etílico, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, querosenos, etc.

6.2.3. Cocaína

Obtenido como clorhidrato resulta muy soluble en agua destilada e insoluble en éter etílico, acetona y benceno, y su punto de fusión no debe ser inferior a 197°C (Clarke, 1986). En cambio, la cocaína base, es poco soluble en agua destilada pero muy soluble en éter etílico, alcohol y éter de petróleo fundiendo a 96 – 98°C.

La Fig.14 muestra las estructuras químicas más relevantes relacionadas a la cocaína y su nombre de acuerdo a diversas nomenclaturas.

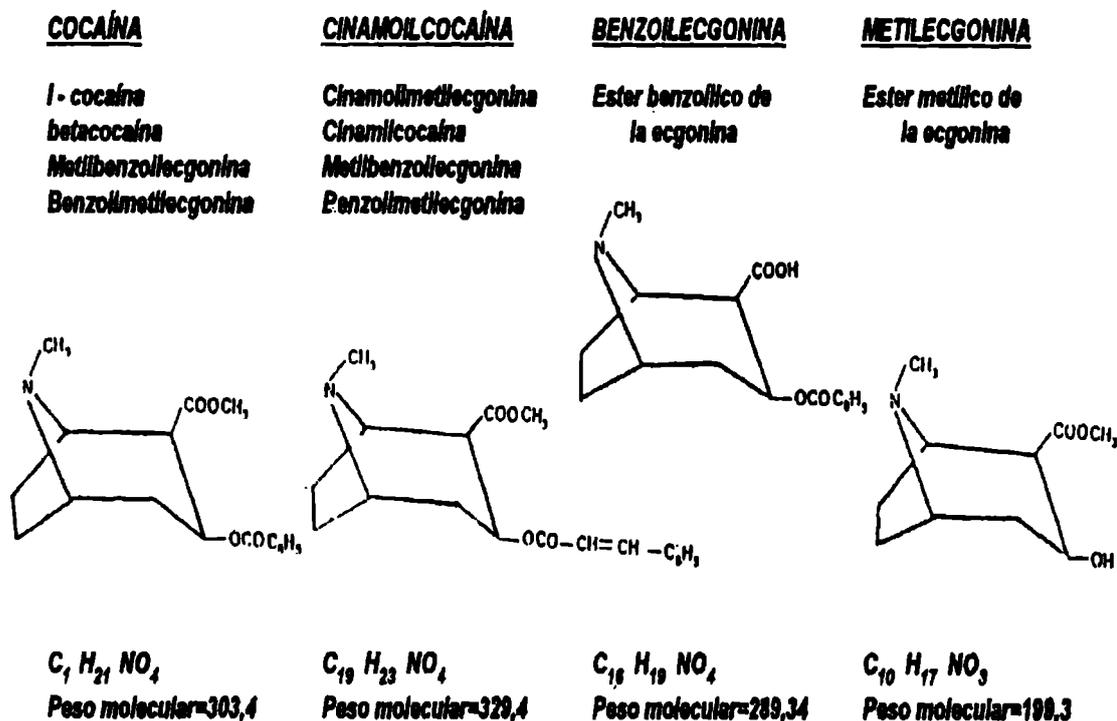


Figura. 14 Estructuras químicas de la cocaína y compuestos relacionados de interés.

6.2.3.1 Vías de administración, incidencia y formas de uso.

La cocaína puede administrarse por vía subcutánea, intravenosa, mucosa nasal (aspiración) y pulmonar o inhalatoria (crack fumado). Estas son las vías más usadas. Cuando se inyecta en forma rápida los efectos psíquicos y fisiológicos aparecen en segundos para disminuir su intensidad hacia los 20 o 30 minutos. Expresase que la rapidez de la inyección resulta tan importante en la manifestación de sus efectos como los niveles absolutos en sangre. Aunque la muerte puede producirse luego de la administración por cualquier vía si la dosis es suficientemente alta, esa posibilidad se acentúa luego de una inyección endovenosa.

Algunos individuos acusan reacciones muy intensas a débiles cantidades de cocaína y la hipersensibilidad al alcaloide provendría de una incapacidad genética de las esterasas hemáticas y hepáticas.

En los últimos cinco años han aparecido numerosos trabajos en los que se consigna que los cocainómanos afectados de una anomalía cardíaca pueden experimentar una muerte súbita, mencionando casos en los que el sujeto no ha tenido tiempo de retirar la aguja de su vena.

La inyección intravenosa de cocaína provoca, de inmediato, una sensación de “flash” ó “rush” intensamente placentera no obtenida por vía intranasal. Con el tiempo se desarrolla complacencia a los efectos euforígenos por los cuales se usan mayores dosis, más frecuentes apareciendo así signos y síntomas tóxicos. Pueden ocurrir alteraciones de la percepción y pseudoalucinaciones táctiles (bichos en la piel) y visuales (copo de nieve luminoso). Para combatir estos efectos los adictos recurren, de preferencia, a un opiáceo (esta mezcla se denomina “speed ball”).

Respecto al “crack” (base libre que es incorporada por fumando), se volatiliza a temperatura menor (96°C) que el clorhidrato de cocaína, por lo que es rápidamente absorbida por vía pulmonar y transportada al cerebro en pocos segundos. El usuario es afectado por un intenso estado eufórico que desaparece entre dos a veinte minutos. Esta forma de uso constituye un problema físico y psiquiátrico mucho más serio que la inhalación por vía nasal de clorhidrato de cocaína, aumentando la probabilidad de desarrollar marcada dependencia en breve término.

6.2.3.2. Metabolización de Cocaína y Excreción

La cocaína es metabolizada en el hombre por dos caminos diferentes. El primero estima que el 90% de la biotransformación se da a través de reacciones hidrolíticas en el hígado. No obstante, la degradación se opera también por las esterasas plasmáticas. Se acepta que la degradación metabólica en tejido hepático conduce en primer lugar, a benzoilecgonina y luego ecgonina y ácido benzoico. En el sujeto humano se considera que entre el 1% y el 12% de una dosis inyectada permanece inalterada dentro de las 24 hs, siendo la excreción más rápida en las primeras 5-6 horas. No se ha revelado su excreta en heces. La segunda ruta es un proceso oxidativo centrado alrededor del nitrógeno del tropano (Kloss, 1984). Esta ruta secundaria oxidativa parece ser responsable de la hepatotoxicidad de la cocaína. Clínicamente, la primera observación que la cocaína podría producir daño hepático fue notada por Marks y Chapple (Kloss, 1984). Poco años atrás se había sugerido que la biotransformación de la cocaína a un metabolito hepatotóxico era llevada a cabo por el sistema de oxidasas mixtas P-450 dependientes y se confirmaron datos atribuyendo a la

norcoocaína-nitroxido, metabolito de norcoocaína, como la especie química reactiva responsable de dicha hepatotoxicidad.

6.2.3.2.1 Pirólisis

La administración de cocaína por fumado produce marcadores químicos específicos como ecgonidina metil éster, siendo éste el mejor producto de pirólisis por fumado de cocaína. Comparando varias rutas de administración se determinó que sujetos usuarios de cocaína por vía inhalatoria excretaban ecgonidina metil éster en orina y en concentraciones equivalentes a la mitad de cocaína excretada en este emunctorio.

Aquellos individuos que reciben cocaína por vía intravenosa o intranasal exhiben niveles muy bajos de ecgonina metil éster con relación a la cocaína (Jacob et al, 1990).

En orina humana se encuentra ecgonidina como producto de hidrólisis de ecgonidina metil éster in vivo.

Asimismo, como producto de una N-demetilación pirolítica de éste compuesto se hallan la norecgonidina metiléster y la norecgonidina, detectado en orina.

Los métodos de extracción en fase sólida se hallan optimizados para aislar ecgonina, ecgonina metil éster, benzoilecgonina y cocaína en orina. Asimismo, para aquellos metabolitos farmacológicamente activos como la norcoocaína y sus subproductos de metabolización: hidroxibenzoilecgonina y sus metabolitos, como la ecgonina etil éster y su producto de biotransformación ecgonidina. Además, estos métodos son aplicados a los alcaloides congéneres de cocaína: cis y trans cinnamoilcocaína y sus productos de degradación: cis y trans cinnamoilecgonina (Peterson, 1995).

Por otro lado, es interesante consignar la orientación que proporciona el hallazgo de metabolitos en cuanto a la vía de ingreso seleccionada por el consumidor de droga. Estos hallazgos están relacionados a la capacidad que posee cada órgano o fluido para biotransformar las sustancias incorporadas; por tanto la detección de productos polares de degradación de cocaína como los citados precedentemente, serán hallados en orina (Isenschmid, 2004).

Órganos como el cerebro ofrecen menos posibilidades de encontrar subproductos polares pero se aumenta la chance de hallar cocaína intacta, es decir droga madre, por probable atrapamiento y protección lipídica (Spiehler y Reed, 1989).

En situaciones post-mortem, mediando óptimas condiciones de conservación, el cerebro sería el órgano de elección para la cuantificación de la cocaína antes que la sangre. Este fluido

rápida de la droga por vía de las esterasas sanguíneas a benzoilecgonina y ecgonina metil éster, en corto plazo.

Otro órgano de interés es el hígado rico en esterasas motivo por el cual el hallazgo de metabolitos de la cocaína será mayor que el de droga madre.

6.2.3.3. Estudio de la estabilidad de la cocaína en muestras de sangre en diversas condiciones de preservación

El estudio de la estabilidad de la cocaína en muestras de sangre entera es sumamente importante teniendo en cuenta los objetivos propuestos en esta tesis. Es necesario poseer los mayores conocimientos no solo respecto de las transformaciones de la cocaína en personas vivas y fallecidas, sino también de aquellas producidas con posterioridad a la toma de muestra de las matrices biológicas a analizar.

Esta última consideración permitió reinterpretar el hallazgo de estructuras químicas relacionada a la cocaína y que se producen durante la etapa de resguardo, posterior a la toma de muestra. Esta circunstancia es relevante a la hora de evaluar posibles contaminaciones accidentales o dolosas del material objeto de estudio.

En la Figura 15 podemos apreciar el comportamiento de las concentraciones de cocaína en muestras hemáticas y en función del tiempo, conservadas a temperatura ambiente, a pH fisiológico y sin preservación química alguna.

Obsérvese que la cocaína en estas condiciones solo es detectada hasta los 5 o 6 días y que la ecgoninametiléster (EME) se forma rápidamente permaneciendo más de 40 días. Además, es menester recalcar la ausencia de benzoilecgonina (BE) denotando que en estas condiciones no se forma.

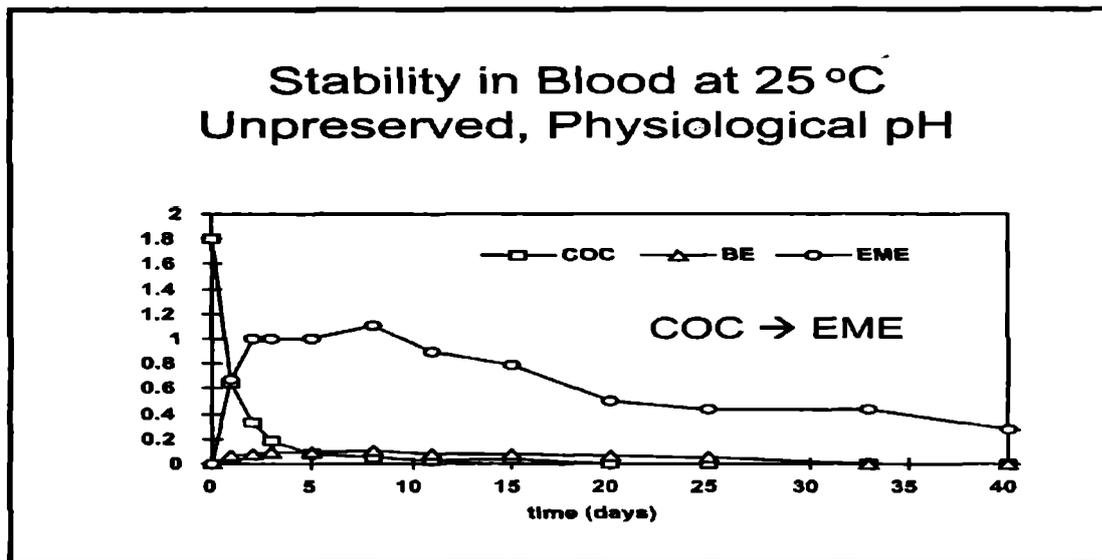


Figura 15 Comportamiento de las concentraciones de cocaína y EME en muestras sin preservantes químicos, temperatura ambiente y pH fisiológico. (Inseschmid, 2004. Con permiso del Dr. Lebeau del FBI, como editor).

En la Figura 16 puede apreciarse el comportamiento de la cocaína en una muestra de sangre entera preservada en frío a 4°C (temperatura de heladera), sin preservantes químicos y a pH fisiológico.

Puede apreciarse aquí que la EME permanece luego de su formación, en el recipiente de la muestra, por más de 200 días y que la cocaína decrece a valores prácticamente indetectables hasta los 100 a 120 días. Nótese que la BE prácticamente no se forma.

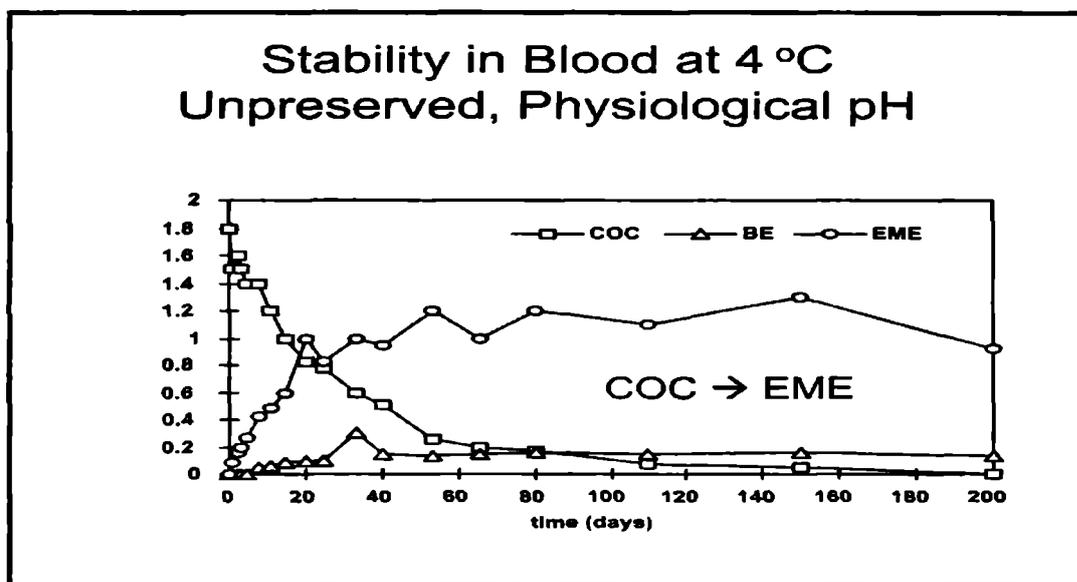


Figura 16 Comportamiento de las concentraciones de cocaína y el producto de transformación formado in situ, en muestras de sangre entera preservadas solo con frío y a pH fisiológico (Isenschmid, 2004 con permiso del Dr. Lebeau, editor por parte del FBI).

En la Figura 17 observamos que la cocaína en soluciones buffer, a pH fisiológico disminuye su concentración hasta desaparecer a los veinte días en tanto que la BE aumenta su concentración permaneciendo con guarismos elevados en relación a la droga madre hasta el mes. A pH 5 y en esas condiciones de temperatura la BE no se forma y la cocaína permanece en valores elevados hasta por lo menos 28 días desde su incorporación a la muestra. Por otro lado el aumento de pH a valores netamente alcalino provoca la desaparición de la droga madre en poco más de una semana mientras que la BE no es formada.

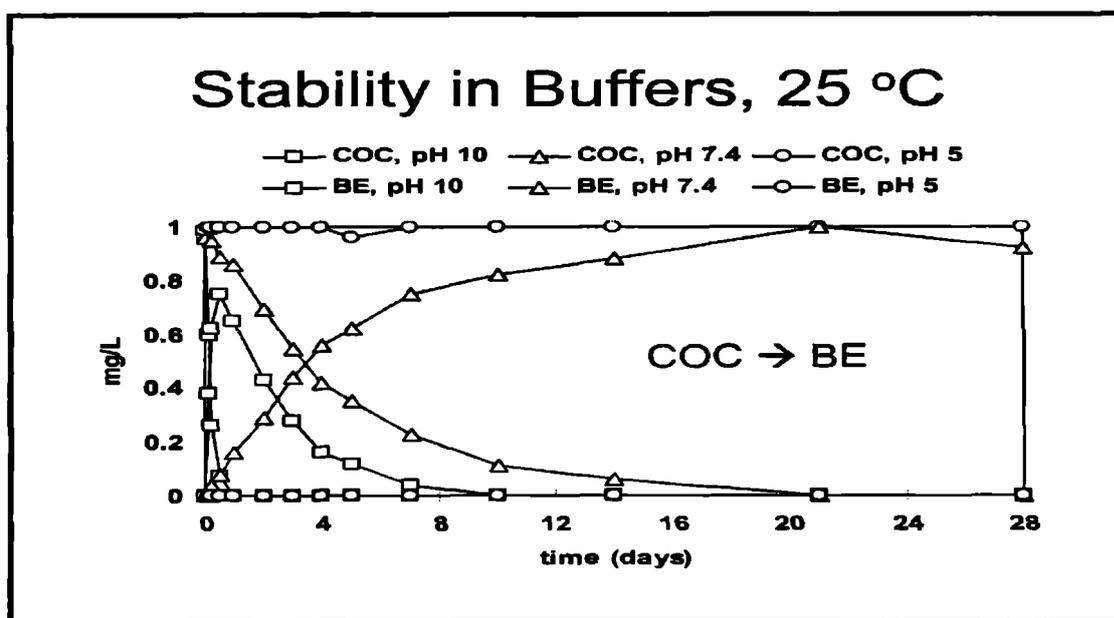


Figura 17 Comportamiento y transformación de la cocaína en soluciones buffers a 25°C, con formación de BE, como principal producto de biotransformación. (Isenschmid, 2004- con permiso del Dr. Lebeau, editor FBI)

En la Figura 18 se muestra el comportamiento de la cocaína en muestras sanguíneas conteniendo gotas de solución de fluoruro de sodio al 2% y a temperatura de 4°C.

Puede apreciarse en estas condiciones que que la EME no se forma sino a partir de los 120 días y en concentraciones muy bajas, en tanto que la BE aumenta su concentración en forma progresiva mientras que al mismo tiempo la cocaína disminuye paulatinamente su concentración permaneciendo en concentraciones apreciables más allá de 200 días.

Atento las experiencias consignadas precedentemente puede deducirse que el pH del medio ejerce un rol fundamental en el tipo de sustancia de transformación generada en las muestras biológicas analizadas, además de la temperatura y la existencia o no de preservante (NaF).

En la Figura 19 se aprecia las mejores condiciones de estabilidad de la cocaína en muestras preservadas químicamente con solución de fluoruro de sodio al 2% a pH ácido y a temperaturas bajas. Nótese la extraordinaria estabilidad de la droga madre, que permanece por

más de 200 días sin variaciones apreciables de concentración. Por otro lado, obsérvese que no es formado ni BE ni EME.

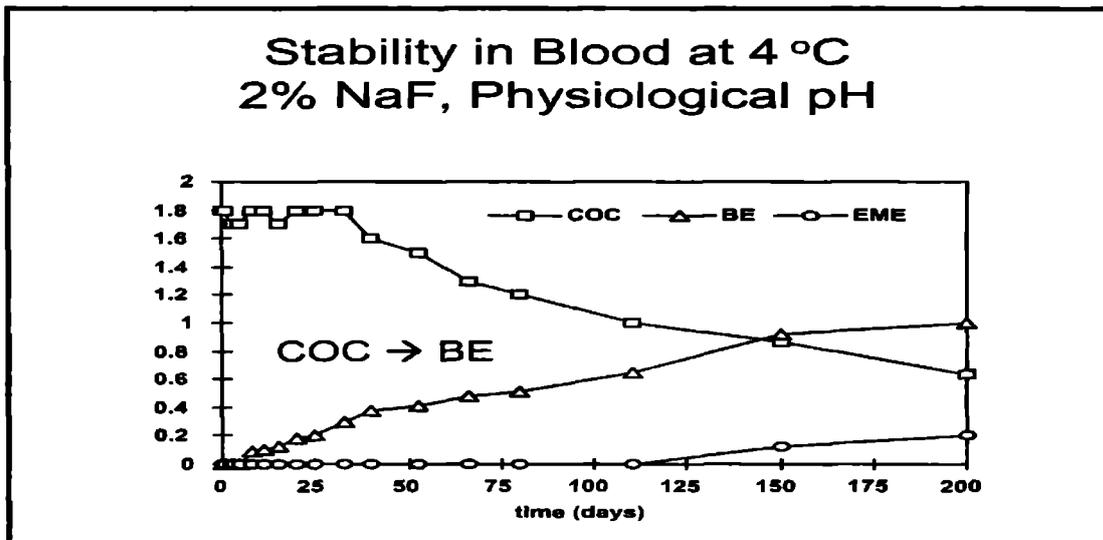


Figura 18 Estabilidad de la cocaína en sangre preservada con NaF a 4°C y pH fisiológico. (Isenschmid, 2004- con permiso del Dr. Lebeau, editor FBI)

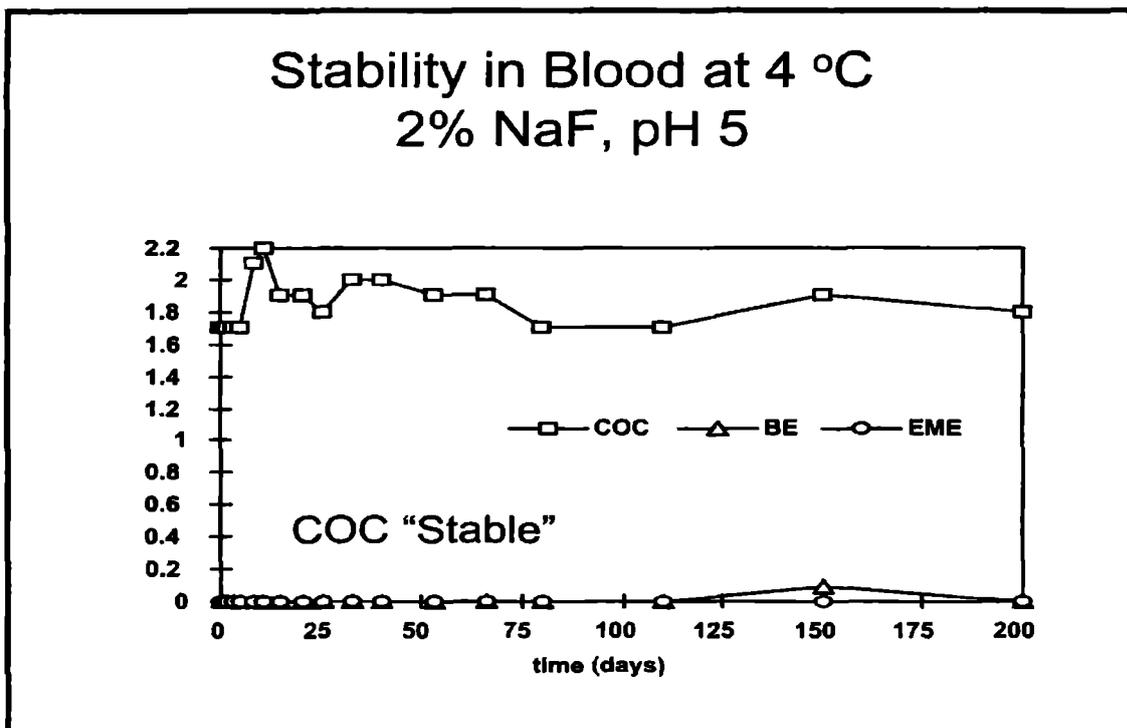


Figura 19 Comportamiento de la cocaína en condiciones de preservación más estrictas. Frío, preservante químico y pH ácido. Puede observarse la conspicua estabilidad de la droga madre, cocaína y la carencia de transformaciones intramuestra. (Isenschmid, 2004. Con permiso de Le Beau- FBI editor)

6.2.4. Aislamiento, purificación e identificación de cocaína y estructuras relacionadas proveniente de materiales biológicos. (Sangre, orina y vísceras)

El aislamiento de tejidos humanos puede efectuarse con los métodos tradicionales, por ejemplo el de Fassi (basado en la desecación de las vísceras con sulfato de sodio anhidro, previo desmenuzado y posterior extracción etérea y clorofórmica), tal como fuera descrito en el capítulo correspondiente; o bien mediante el método de Daubney y Nikcolls. Debe tenerse especial cuidado con el calor empleado en la consecución de la técnica, ya que la cocaína a temperatura mayor de 45°C se descompone.

Actualmente, esos métodos artesanales de aislamiento, están siendo reemplazados por la extracción en fase sólida (SPE), que consiste en la retención del analito de interés en un sorbente contenido en un cartucho plástico. El soporte está formado por pequeñas partículas de sílica a las que se les une un compuesto no polar o medianamente polar (Bonded Phase). Son muy utilizadas las de C-2, C-8, ó C-18 ó mezclas de rellenos no polares, medianamente polares ó polares. La ventaja en el uso de esta metodología radica en los altos porcentajes de recuperación, obtención de eluatos puros, disminución del tiempo de trabajo y ahorro de reactivos.

En la Figura 20 se ilustra mediante un esquema los pasos consecutivos de preparación de la columna y la extracción propiamente dicha mediante eluciones con disolventes orgánicos.

En el esquema, A⁺, B⁻, C y M, son respectivamente drogas de naturaleza básica, ácidas, neutras y matriz (parte de las impurezas retenidas por la sílica unida).

La muestra sanguínea previamente hemolizada o bien el extracto acuoso proveniente del centrifugado de los órganos desmenuzados, se colocan en la columna SPE previo filtrado; mediante una bomba de vacío se facilita el pasaje de la muestra a través de las partículas de relleno muy comprimidas. Luego se lava con soluciones tampones y disolventes no polares; a continuación se extraen las drogas neutras (C) mediante el uso de cloruro de metileno (MeCl₂).

La elución siguiente con metanol extraerá las drogas de naturaleza ácida (B⁻).

Por último se extrae con metanol en medio básico, a través del uso de solución de amoníaco.

Sangre, orina y saliva pueden ser procesadas por los métodos SPE de fase unida o bien columnas con rellenos hidrofílicos, como los del tipo EXTRELUT[®] (Merck). La técnica es sumamente sencilla y los resultados satisfactorios.

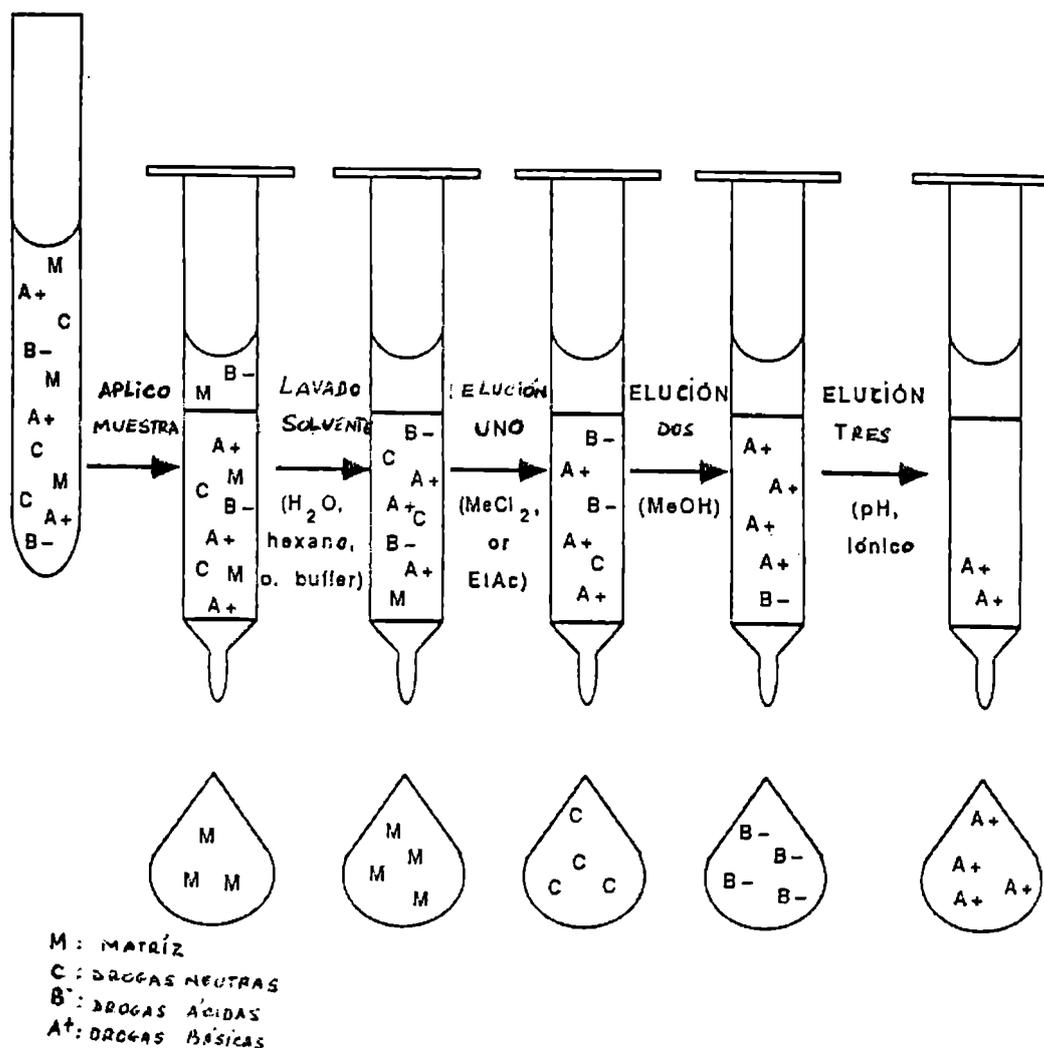


Figura 20 Esquema: procedimiento para el aislamiento de una droga de abuso por SPE (Tomado de Clean Screen – Word Wide Monitoring®).

Los métodos de identificación cualitativa llevados a cabo por nuestros laboratorios consisten principalmente en el uso de TLC, HPTLC como métodos de rastreo para identificación de grupos generales de compuestos tal como se explicó en el capítulo 3 y CGL y HPLC en forma complementaria. Laboratorios de alta complejidad utilizan, además de los métodos cromatográficos, métodos inmunológicos por ejemplo: FPIA (Inmuno ensayo polarización fluorescente); espectrometría de masas; espectrometría infrarroja (IR) y resonancia magnética nuclear (RMN); aunque esta última técnica puede aplicarse si la concentración de analito es suficientemente alta como para poder resolverse (generalmente se requiere sustancias en el orden del miligramo).

6.2.5. Matrices alternativas: estudios postmortem de cocaína y productos de biotransformación en pelo

Entendemos por matrices alternativas aquellas muestras biológicas que actualmente se utilizan en el laboratorio toxicológico en forma asidua, pero no rutinaria. Estas son en la actualidad herramientas importantísimas, aportando resultados sobre droga madre y metabolitos en individuos que han venido incorporando sistemáticamente drogas de abuso en forma activa y mediata. Las matrices más estudiadas hasta hoy son: el pelo, la saliva y las uñas.

La Tabla 7 nos ilustra sobre los intervalos de tiempo en la detección de drogas en distintas matrices, señalándose además el estado en que es hallado el analito.

Tabla 7 Ventana de detección y tipo de drogas que se investigan.

Espécimen	Ventana de Detección	¿Qué se detecta?
Sangre	3 hs.-2 d	
Concentración de droga madre, intoxicación aguda		
Orina	6 hs.3 d	Solo metabolitos
Humor Vítreo	3 hs.2d (30 d)	Droga madre Cationes
Cerebro		Droga madre lipof.
Pulmón		Solo metabolitos
Hígado		Drog.madre o metabolitos
Riñón		Solo metabolitos
Estómago y contenido		Droga madre, metabolitos
Putrúlago		Rara vez se hallan metab.
Saliva	1 h -24 hs	Droga madre
Pelo	>3 días-meses-años	Drog.madre
Uñas (se incorpora en escasos días quedando concentrada la droga madre hasta el análisis entre los 5 a 6 meses)		

Cabe señalar que dependiendo del tiempo transcurrido desde que se administró la droga, se elegirán las matrices más apropiadas para evaluar consumos inmediatos o mediatos. Es decir, para drogas que se detectan a los pocos minutos o hasta escasas horas se utilizará, en forma simultánea o alternativa, saliva, sangre u orina. La comunidad científica internacional aconseja utilizar saliva conjuntamente con la sangre para consumos inmediatos ya que la concentración de drogas en la saliva es a menudo directamente proporcional a la concentración en plasma (Cone, 1993).

Para estudios mediatos (consumos previos a los 15 días o más) se aconseja utilizar pelo pericraneal, vello pubiano, vello axilar y uñas.

Las sustancias de mayor relevancia Toxicológica a investigar en estas matrices son:

- **Cocaína y sus Metabolitos**
- **Opiáceos**
- **Cannabis**
- **Anfetaminas**
- **Benzodiazepinas**

6.2.5.1 Esferas judiciales que emplean el estudio de sustancias de uso indebido en pelo

Tribunal de Familia:

- Tenencia de Hijos
 - Exclusión de hogar y Violencia Familiar
 - Reconocimiento de hijos
 - Reintegro de hijos
 - Alimentos y Régimen de Visitas

Tribunal de Menores:

- Averiguación Causales de Muerte
- Homicidios
- Secuestros extorsivos
- Tenencia de Armas

Juzgado de Ejecución Penal

- Seguimientos de los detenidos en:
- Salidas transitorias
- Libertad condicional

Otros:

- Previo agotar la pena
- Monitoreo de consumo de drogas
- Casos declarados insanos
- Tratamientos psiquiátrico intra-hospitalarios

En los últimos años el análisis de drogas de uso indebido y metabolitos en pelo ha recibido considerable atención debido a las ventajas que ofrece ésta matriz con respecto a otras más asiduamente utilizadas, como vísceras, sangre u orina.

Las drogas incorporadas al pelo permanecen “secuestradas” por largas semanas, meses y aún años. Lo que indica que ésta matriz es uno de los mejores reservorios de sustancias en el cuerpo, ya que posee escasa actividad metabólica. En cambio, en suero y orina los niveles de droga decrecen rápidamente en un período corto (horas ó días).

El pelo es uno de los componentes del cuerpo más resistente a la putrefacción constituyendo, en el ámbito forense, un material de elección para peritaciones toxicológicas en casos de exhumaciones. Asimismo, resulta muy útil para la determinación cronológica de consumos. Originalmente, los estudios en pelo tendientes a detectar compuestos orgánicos de interés toxicológico, fueron encarados por diversos grupos científicos entre los que se destacan investigadores de Estados Unidos, Alemania e Italia como pioneros en la temática. No debemos olvidar que justamente los primeros compuestos orgánicos detectados en pelo han sido las drogas de abuso principalmente morfina, cocaína y estructuras relacionadas.

Surge el interrogante del porque no se ha estudiado y/o detectado drogas y fármacos antes de 1979, fecha en que Baumgartner en Estados Unidos, dió a conocer a la comunidad científica la primer identificación de morfina en pelo mediante la técnica de radioinmunoensayo.

Hay una respuesta que parece evidente: los niveles detectados fueron bajísimos, del orden del ng/mg de pelo (vale también para uñas). Nótese que en esa época resultaba dificultoso alcanzar niveles de detección del orden citado, más aún la cuantificación se tornaba engorrosa, ya que los estándares internos deuterados eran prácticamente inasequibles y de muy alto costo.

Inicialmente hubo una euforia generalizada entre los toxicólogos norteamericanos y europeos que muy pronto hubo de llamarse a la prudencia ya que en Alemania se informaron drogas de abuso positivas en individuos que no habían consumido activamente, pero sí habían estado en contacto con ellas. Es decir, aparece el concepto de contaminación externa y “sistémica”. Este último término se refiere al ingreso pasivo de la droga y su distribución en el organismo y posterior depósito en el espécimen de estudio (pelos o uñas).

A partir de esta contrariedad comenzó a discutirse la necesidad de establecer valores de corte ajustados que pudieran dar sustento firme a los guarismos encontrados en pelo de personas supuestamente consumidoras de drogas.

La discusión dió lugar al planteo de la elección de un sistema de lavado óptimo que removiera la droga contaminante y los procedimientos de extracción.

Cabe destacar que esto último fue lo que más cambios han sufrido en los últimos 4 o 5 años, con el fin de una mejor recuperación del analito. Resulta propicio expresar en éste sentido que

desde la introducción del sistema de extracción en fase sólida (SPE) hacia mediados de la década del 90, nos hallamos hoy frente al uso más frecuente de la SPME y de la SFE (extracción por fluido súper crítico).

Es decir, existe en la actualidad una tendencia al uso de técnicas que requieren menor cantidad de matriz con la ventaja de acceder a muy altos rendimientos. Está en plena discusión la reproducibilidad de los valores cuantitativos para éstos dos últimos métodos de extracción.

En nuestro país existen registros que indican que a principios de la década del 90 comenzó a utilizarse pelo con el objeto de detectar drogas de abuso.

Nuestro laboratorio forense comenzó sistemáticamente en el año 1994 a efectuar aislamientos utilizando extracción en fase sólida en casos postmortem y en individuos vivos consumidores consuetudinarios bajo tratamiento psiquiátrico.

Los estudios efectuados han proporcionado hallazgos sorprendentes e inclusive ha permitido plantear el posible uso de otros tipos de pelo distintos al pelo peri craneal tales como el vello púbico, axilar y actualmente barba. Estas matrices emergen como posible fuente de obtención de datos relevantes para la resolución de casos forenses.

6.2.5.2. Aspecto Anatómico y fisiológico

Para poder comprender como una droga ingresa al pelo y porque está menos expuesta al metabolismo general es necesario entender que el pelo es solo una parte de un órgano bastante complejo, incluido y diferenciado a partir de otro órgano, la piel. Este órgano es llamado complejo pilo sebáceo.

a) Órgano pilo sebáceo:

Este sistema estructural funcional puede ser dividido en dos compartimientos metabólicos diferentes aunque interdependientes y dependientes funcionalmente del órgano madre que lo contiene, la piel.

A uno de los compartimientos podríamos llamarlo “productor”, metabólicamente activo que posee todas las células generadoras de queratina y la secreción sebácea formadora de otro compartimiento que podríamos llamar “producto”, que es metabólicamente menos activo que el pelo propiamente dicho y la secreción sebácea que recubre al mismo.

b) Morfología del pelo

El pelo, apéndice de la piel que crece a partir del folículo piloso, se extiende desde el bulbo empotrado en el folículo a través de un eje hasta la punta o extremo distal.

En el eje se distinguen tres planos desde afuera hacia adentro en forma concéntrica: la cutícula, corteza y médula.

La corteza rica en queratina fibrilar forma entrecruzamientos con otras proteínas mediante puentes bisulfuros que hace al pelo una estructura altamente estable, aún en la etapa de apoptosis (del griego: *apo*: hoja y *ptosis*: caída. Metáfora que compara la eliminación de células cuando éstas completan su ciclo vital como la caída de hojas en otoño). La apoptosis es considerada hoy como un acontecimiento fisiológico de destrucción programada de células durante la queratinopoyesis. En éste proceso las membranas celulares pierden adhesión y las células comienzan a descamarse. Sin embargo, en el pelo la estructura permanece junta, debido a la producción de otras proteínas que mantienen unidas a las células entre sí.

La médula se halla formada por material proteico y lipídico de degradación celular, con mayor abundancia de agua que la capa cortical, totalmente deshidratada y prácticamente impermeable.

El órgano pilo sebáceo presenta una glándula anexa, la sebácea, que brota como una yema en la porción ístmica del folículo. La secreción proveniente de ésta glándula contiene ácidos grasos alifáticos y otros complejos divididos generalmente en tres grupos: escualenos y esteroides (aproximadamente 12% del total de la secreción), ésteres de ácidos grasos con alcoholes grasos (25%), triglicéridos y ácidos grasos libres (57%).

La secreción sebácea, variable por diferentes factores, es eliminada por el mismo poro por el que emerge el pelo, bañando el tallo piloso.

c) Coloración del Pelo

En la corteza se hallan gránulos de pigmentos cuyo principal componente es la melanina, sintetizada en pequeños cuerpos que se hallan en el bulbo (melanocitos). La cantidad y calidad de melanina varía según el tipo de pelo (negro, castaño, rubio, pelirrojo). Además de la melanina existen otros pigmentos en menor cantidad que dan al pelo diferencias de matices, como: carotenoides flavonoides y otros pigmentos denominados genéricamente tricocromos.

De todas maneras, es la melanina el pigmento más importante concentrándose mayormente en la corteza del pelo, siendo la médula habitualmente hipocrómica aunque no siempre.

La melanina se sintetiza a partir de la tirosina, que por efecto de la enzima tirosinasa pasa a dopa y luego a dopaquinona. Ésta última puede ciclarse a dopacromo y conformar oligómeros que van a formar la eumelanina o melanina verdadera (de color castaño oscuro o negro con escasos sulfhidrilos) o unirse a glutatión y/o cisteína para dar lugar a glutatión dopa o cisdopa,

que a través de diferentes modificaciones forma benzotiozinilanilinas, originando oligómeros feomelanina o melanina falsa (de color pardo rojizo rica en aminoácidos azufrados como la cisteína) o bien tricocromos monoméricos.

d) Tipos de Pelo

De acuerdo a su conformación y longitud, el pelo puede ser dividido en: lanugo, vello y pelo de cuero cabelludo (cabello)

El lanugo es un pelo fino y suave que existe en el feto, cayendo a los pocos días del nacimiento.

El vello es un pelo generalmente más grueso que el cabello, con médula completa a menudo de diámetro irregular y con tendencia a curvarse. El vello no posee el mismo ciclo biológico ni la misma velocidad de crecimiento que el cabello pero si una hormono-dependencia similar.

e) Crecimiento

El pelo humano tiene tres fases de crecimiento:

I) Anagénica: es una fase de crecimiento activo. Dura entre 2 y 3 años.

II) Categénica: es una fase de transición entre el crecimiento activo y la etapa final.

III) Telogénica: dura entre 2 y 3 meses y constituye la fase final, donde el pelo se desprende fácilmente.

6.2.5.3. Incorporación de Drogas al Organismo

Habiendo analizado la anatomía y fisiología del complejo pilosebáceo, surge una serie de posibilidades de mecanismos de incorporación y permanencia de drogas en el tallo piloso.

a) Difusión Pasiva: La hipótesis más simple de elaborar es la de difusión pasiva de la droga a la zona de síntesis del folículo piloso a partir de la concentración de droga en plasma. No es ilógico pensar que el folículo piloso se “embebe” de la droga por un simple mecanismo de biodisponibilidad, con una distribución uniforme hacia células metabólicamente activas.

Esta idea presenta varios datos que le quitan sustento: por un lado, estudios analíticos muestran que en el pelo la concentración de droga íntegra (madre) es mayor que sus metabolitos.

Por otro lado, la concentración de drogas en pelo es seis veces mayor que en sangre, lo que indica que, de alguna manera, la droga no difunde solo pasivamente.

También se conoce que la droga se ubica en el tallo piloso, por lo que debe existir un rápido paso de droga inalterada, hacia compartimientos metabólicamente inactivos.

Es lógico pensar que la droga incorporada a la zona de síntesis del folículo piloso es directamente proporcional a la droga circulante, por lo que al metabolizarse ésta, la concentración plasmática cae, invirtiéndose el proceso. El folículo piloso vuelca droga a la circulación, tanto para drogas libres en plasma como para las unidas a la fracción proteica. Por lo tanto debe existir un mecanismo de atrapamiento y protección de moléculas que impidan que éstas entren al sitio de metabolización y biodisponibilidad general del organismo (Henderson, 1993; Pöstch, 1994; Cone, 1996; Laguens et al, 1999; Wennig, 2000).

b) Modelo multicompartimental: Se postulan diversas hipótesis.

b₁) Incorporación de droga a la zona queratogena.

Quienes apoyan ésta idea sostienen que la droga es incorporada a la zona queratogena del pelo, metabólicamente menos activa, a partir de la difusión desde la sangre. El poseer menor actividad metabólica justifica la falta de degradación de las moléculas. Sin embargo no explica la mayor concentración, ya que tendría que existir una extremada avidez de la queratina inmadura para fijar la droga y protegerla, hecho que no ha sido demostrado fehacientemente. Tampoco se conoce la capacidad de saturación de la queratina, factor limitante relevante para alcanzar concentraciones elevadas en el pelo.

b₂) Transferencia de droga a partir de la secreción sebácea.

Quienes apoyan ésta hipótesis argumentan que las células de la glándula sebácea atrapan moléculas lipofílicas, desde la sangre y luego son volcadas a la secreción para ser incorporadas a través de la cutícula del tallo piloso. Esta idea encuentra varios obstáculos: en primer lugar, las células sebáceas son metabólicamente activas, por lo que la droga tendría que estar parcialmente metabolizada. Además el pelo es prácticamente impermeable a la incorporación de elementos desde el exterior, por su cutícula por la marcada disminución del agua intrapilosa y por su pH interno (6 o menos). Por otro lado, porque la secreción sebácea es una suerte de ecosistema en el cual coexisten microorganismos que metabolizan activamente lípidos y otras sustancias.

b₃) Transferencia de drogas a partir de la secreción sudorípara.

Aquí, valen los mismos detalles para transferencia a partir de secreción sebácea, con el agravante que la secreción sudorípara es acuosa y rica en electrolitos.

b₄) Transferencia por contaminación externa.

Quienes sostienen ésta hipótesis argumentan que la droga es eliminada a través de la superficie cutánea y luego penetra al tallo piloso. Esto encuentra los mismos obstáculos ya

citados. De ellos, tal vez el más importante es la impermeabilidad del pelo. Por otro lado, debemos considerar la adsorción de droga al pelo en ambientes donde se consume, principalmente fumada. Exprésase que en estas circunstancias la adherencia al pelo es débil, por lo que como veremos más adelante, los sistemas de lavado removerán fácilmente la sustancia del sector externo.

b₅) Incorporación sistémica.

Es muy importante tenerla en cuenta ya que en casos donde hubo contactos con la droga, aún accidentalmente, puede ingresar al organismo por ejemplo mediante las vías respiratorias, absorberse y entrar a la circulación general, fenómeno este que preferimos denominar contaminación sistémica.

6.2.5.4. Permanencia de droga en el pelo

Nuestras propias observaciones indican que esta matriz otorga protección extrema a las drogas incorporadas. Así, hemos logrado aislar drogas alucinógenas existentes en la especie *Anadenanthera Colubrina* (Cebil) en pelo de momias andinas provenientes de la zona denominada San Pedro de Atacama (Chile), de más de mil años de antigüedad (A.D. 700).

Por lo tanto, nos inclinamos a pensar en un mecanismo de difusión, desde la sangre hacia la zona de síntesis de pelo y en la existencia de mecanismos de atrapamiento de moléculas que permitan a las drogas escapar de la metabolización (Laguens et al, 1999).

Existen varias opciones de protección:

a) Retención en la Queratina

Habiendo disponible varios tipos de queratina (fibrilares, enrolladas, helicoidales, etc.) puede existir protección de las moléculas al quedar atrapadas dentro de la estructura, la que podría rechazar electrostáticamente a las enzimas degradadoras o modificar el reconocimiento de los sitios alostéricos de las enzimas por parte de la droga.

b) Quelación de la droga

Existen sustancias que poseen actividad quelante, tales como aminoácidos, flavonoides, carotenoides, tricocromos, etc., que pueden ejercer un mecanismo de atrapado, protección y transporte de droga hacia porciones superiores de pelo.

c) Incorporación a médula en estructuras lipídicas sin actividad metabólica

La droga en la zona queratogénica podría encontrarse libre o unida a las sustancias mencionadas precedentemente. La droga libre puede unirse, en caso de ser lipofílica, a membranas celulares lipídicas que en el proceso de apoptosis serían degradadas formando

cuerpos apoptóticos que tienden a ser eliminados a la médula del pelo, sitio este metabólicamente inactivo donde tenderían a acumularse.

d) Retención de la droga en otros componentes

Se ha afirmado que la melanina, con su estructura cuaternaria, puede atrapar droga en forma similar a lo que hace la queratina. Esto es cierto, ya que la melanina es un polímero de aminoácidos modificados a partir de la fenilalanina; con agregados de otros aminoácidos azufrados. En este sentido, Pöstch (1994) consigna que la melanina juega un rol muy importante y propone que las moléculas de drogas se acumulan en la superficie de la misma, ya que es conocido que los polímeros de la melanina actúan como adsorbentes. No obstante, recordemos que la melanina se encuentra dentro de los melanosomas y estos se incorporarían al queratinocito en la zona queratinógena. Esta no existe en la porción de síntesis del pelo. Ello induce a pensar que la droga que ingresa al sitio de síntesis no es atrapada y transportada por la melanina, sufriendo entonces procesos metabólicos antes de llegar a la zona quertaogénica en la que la melanina cumpliría su función adsorbente.

6.2.5.5. Estudios sobre dosis - concentración en pelo

Baumgartner et al (1989) han reportado correlación positiva entre sujetos adictos y las concentraciones de heroína, cocaína y marihuana en pelo. Nakahara et al (1997) encontraron una buena correlación entre la dosis de metoxianfetamina y la concentración de droga en el pelo de 5 personas.

Nuestra experiencia en el estudio de pelo pericraneal, vello axilar y púbico en una amplia población de personas adictas, nos sugiere que en general la concentración de cocaína en pelo es mayor cuando se incrementa la dosis. Sin embargo la variabilidad entre sujetos es tan grande que resultaría dificultoso estimar la cantidad de droga administrada basada en la concentración de droga hallada en el pelo.

6.2.5.6. Relación Droga – Metabolito.

Quizás el desafío más grande para el modelo de transferencia pasivo sea el hallazgo de altas relaciones droga / metabolitos.

La cocaína fue identificada como analito primario en el cabello de todos los cocainómanos, encontrándose en concentraciones 6 veces mayores que su metabolito primario benzoilecgonina y aproximadamente 10 veces más que ecgonina metil éster.

En casos post-mortem hemos podido aislar sustancias de corte como anestésicos arilamínicos, cuya concentración respecto de sus metabolitos también ha sido mayor.

En el caso de las benzodiazepinas la relación esta a favor de sus 7-amino metabolitos: nitrazepam, 7-aminonitrazepam, flunitrazepam, 7-aminoflunitrazepam, clonazepam, 7-aminoclonazepam. El alprazolam y el 7-hidroxi derivado no fueron detectados en ninguna muestra.

En estudios post-mortem es necesario contar con un informe de autopsia minucioso indicando los mínimos detalles sobre la observación macroscópica. Si el médico autopsiante estima, aunque sea con mínima posibilidad, la existencia de alguna sustancia tóxica debería consignarlo en su informe. También resulta de utilidad la historia clínica o referencia de familiares respecto del consumo de medicamentos previo a la muerte.

6.2.5.7. Cadena de custodia

Este documento debe acompañar a los especímenes en todo momento dejando constancia en el mismo de las personas involucradas en la toma de muestra y traslado hasta el laboratorio. La identidad de la muestra quedaría así certificada.

6.2.5.8. Procedimientos analíticos para pelo

a) Decontaminación ó lavado:

Según refiere la comunidad científica internacional a través de la Society of Hair Testing, creada en 1995 y las últimas revisiones de Wennig (2000), es necesario proceder a una decontaminación del pelo mediante lavado químico por tratamiento con disolventes orgánicos y agua. Ello se sustenta en la necesidad de remover la posible droga que pudiera estar adherida a la cutícula o capa externa del pelo. Este paso que debe ser efectuado antes del estudio interno de la matriz, es de suma importancia ya que establece la diferencia entre la droga proveniente de una contaminación externa respecto de la incorporada en forma endógena, es decir, aquella ingresada al organismo.

b) Extracción propiamente dicha:

Se efectúa una extracción siguiendo los lineamientos sugeridos por la Society of Hair Testing procediendo a la digestión (previo agregado de un estándar interno de cocaína deuterada, Coc-d₃) mediante hidrólisis ácida lenta a temperatura ambiente, utilizando una solución de HCL 0.1 M durante 24 hs. Previo acondicionamiento de pH. La extracción se realiza mediante la técnica S.P.E (Extracción en Fase Sólida) utilizando columnas especiales de fases co-

poliméricas, por ejemplo del tipo World Wide Monitoring (Clean Screen Dau 303) recomendada para el aislamiento de compuestos morfeólicos, cocaína y relacionados y psicotrópicos.

Los extractos obtenidos se analizan mediante cromatografía gaseosa- espectrometría de masas (GC-MS) utilizando columna capilar de última generación y programa de temperaturas habitualmente aplicable en estos casos.

Los espectros obtenidos son cotejados computacionalmente mediante biblioteca, siendo una de las más utilizadas para este tipo de estudios la de Pflieger, Maurer y Weber.

OBJETIVOS

Objetivo general

Durante el desarrollo de la tesis se propone analizar la influencia de factores físicos, químicos y biológicos sobre la estabilidad y/o detección de las drogas durante el período postmortem tomando como modelo aquellos alcoholes que en nuestro medio estuvieron implicados en intoxicaciones masivas (Vg.: metanol y dietilenglicol) y al alcohol etílico, por ser una de las sustancias más relevantes en las investigaciones forenses.

Por otro lado resulta de interés abordar el aspecto postmortem de las drogas de abuso en un contexto forense de investigación que permitiera formular interpretaciones más precisas para el caso de análisis de cocaína y sus metabolitos.

También se pretende estudiar el controvertido tema de la generación de ácido cianhídrico y monóxido de carbono en incendios de materiales plásticos conteniendo nitrógeno en su estructura intentando arribar a una expresión matemática predictiva que permitiera inferir la composición de atmósferas tóxicas en estos episodios.

Asimismo, se propone comprender la distribución postmortem de drogas a través de la investigación de estos alcoholes de relevancia toxicológica y de la cocaína, durante diversos períodos postmortem.

Se prevé además estudiar la influencia de factores involucrados en los procesos de separación o aislamiento (fase pre-analítica) que pueden incidir en la identificación y cuantificación del analito.

Por otro lado se prevé analizar los datos de dosis letales publicados y obtener parámetros químicos y biológicos que permitan una mejor interpretación del grado de severidad del cuadro tóxico a que dan lugar alguno de los compuestos tratados en la tesis. A partir de estos estudios se propone comprender en forma más profunda los eventos que se llevan a cabo durante la etapa postmortem.

Por último, se pretende estudiar diversos procedimientos analíticos con el objeto de generar metodologías recomendables para el análisis de estos compuestos en matrices biológicas complejas y no tradicionales como lo es el pelo.

Objetivos específicos

1. Evaluar la causa de óbito en víctimas de incendios, mediante índices específicos a partir de las concentraciones de tóxicos en sangre, generados por polímeros combustionados.
2. Inferir la composición de la atmósfera generada en incendios de materiales plásticos, especialmente goma espuma de poliuretano, a través del conocimiento de la concentración de los gases letales en sangre y la determinación de expresiones matemáticas y gráficas.
3. Estudiar la evolución del contenido de etanol en muestras de sangre entera post mortem en función del tiempo y como consecuencia de fenómenos físicos inherentes a los recipientes donde ellas son contenidas (cámara de aire) y la temperatura de conservación.
4. Analizar la influencia de compuestos originados en la descomposición de sustancias orgánicas complejas de la sangre sobre la concentración de alcohol durante el almacenamiento de las muestras sanguíneas.
5. Proponer parámetros sanguíneos apropiados para justipreciar las intoxicaciones con metanol, especialmente cuando han transcurrido más de 36 horas desde su ingesta.
6. Estudiar la distribución del alcohol metílico en órganos humanos y efectuar comparaciones con el etanol. Asimismo evaluar la distribución postmortem del ácido fórmico y establecer relaciones de concentración entre órganos con el objeto de mejorar la interpretación postmortem de intoxicaciones agudas por metanol.
7. Arribar a una expresión matemática que permita poner de manifiesto la severidad de la intoxicación metílica, a través del conocimiento de los niveles de ácido fórmico en individuos sometidos a terapia etílica previo al óbito.
8. Estudiar los fenómenos fisico-químicos que pueden operarse en los tejidos durante la fase pre-analítica de los alcoholes, especialmente dietilenglicol, por co-disolución o co-adsorción y que producirían falsos negativos en la determinación analítica.
9. Estimar dosis letales de dietilenglicol para el episodio estudiado y compararlas con otras intoxicaciones masivas informadas en la bibliografía universal.
10. Analizar diferentes correlaciones entre los parámetros de medio interno con las dosis letales estimadas para el dietilenglicol.
11. Estudiar la estabilidad de la cocaína y sus metabolitos más importantes en diversos órganos durante el proceso postmortem.

12. Interpretar los resultados de cocaína y metabolitos hallados en diversas matrices, convencionales y alternativas, fijando los criterios para su uso y discusión en el análisis postmortem.

MATERIALES Y METODOS

CAPITULO 7

MATERIALES, TÉCNICAS Y METODOLOGÍAS APLICADAS EN LOS ENSAYOS

A continuación se describen las técnicas analíticas para la determinación de ácido cianhídrico, monóxido de carbono, etanol, metanol, ácido fórmico, dietilenglicol, cocaína y metabolitos más importantes tal como la benzoilecgonina.

En cada una de ellas se ha intentado ofrecer los mayores detalles inclusive algunas modificaciones que nos permitieron alguna ventaja en ahorro de tiempo, reactivos o una mejor resolución analítica.

7.1. Determinación de ácido cianhídrico: Método de Gettler-Goldbaum adaptado

Se efectuó con un dispositivo, tal como se ilustra a continuación:

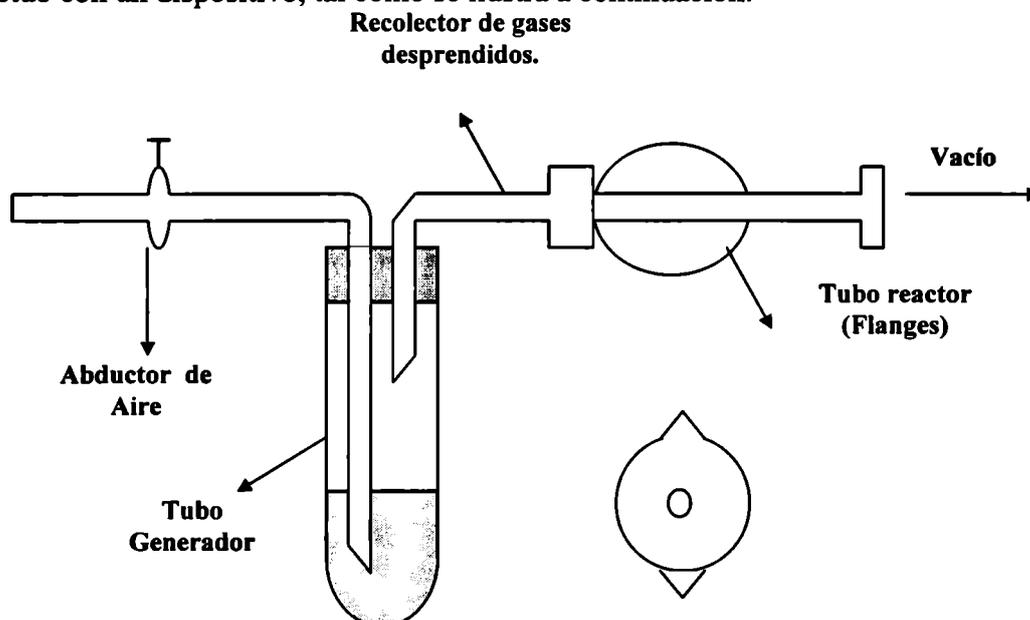


Figura 21 Dispositivo para el análisis de ácido cianhídrico mediante el método de Gettler y Goldbaum

Consiste en un tubo generador del gas provisto de un tubo abductor de aire y otro de desprendimiento de gases. Sigue a éste último el tubo reactor, compuesto de dos partes adosables herméticamente (flanges esmerilados) por medio de la aplicación de dos banditas de goma tirantes en las dos pestañas de cada mitad del tubo reactor, tal como se muestra en la Fig.21.

Entre las dos partes de este tubo se colocan discos de papel de filtro Whatman N° 50, o similar, impregnado de las sustancias reactivas.

Primero se hizo una dilución del líquido con HCN, titulado previamente. Se calcularon los volúmenes exactamente de esta dilución para tener los tipos de 30, 25, 20, 15, 10, 5 y 1 μ gr. de HCN. Se tomó en cada caso el volumen calculado, que se colocó en el tubo generador.

Se prepararon los discos de papel de filtro, cortándolos en la medida exacta del círculo de adaptación del flange, dejándoles una pequeña tira, de donde se tomó con pinzas de plástico, para sumergirlos en la solución reactiva de sulfato ferroso al 10% p/v, contenida en un vidrio de reloj.

Se retiraron, dejándolos escurrir un poco en el vidrio y se sumergieron en NaOH al 20%; se retiró de esta última y se secó enseguida entre dos papeles de filtro. Luego de esto se colocó inmediatamente entre las dos mitades del tubo reactor, asegurando con las banditas de goma. Este tubo debe quedar bien nivelado horizontalmente durante la operación.

Se hizo pasar aire, abriendo la trompa a razón de 30-40 burbujas por minuto.

Por el extremo del tubo de entrada de aire, se hizo ingresar al tubo generador 1 ml de ácido tricloroacético al 15%, agitando suavemente.

Se continuó haciendo pasar aire por 10-15 minutos. Luego de este tiempo se retiró el círculo de papel con la pinza y se sumergió en HCl al 30% contenido en un vidrio de reloj, dejándolo 15 minutos. Luego se lavó con agua destilada. Obtuvimos así, una escala de testigos, desde 1 μ g a 30 μ g.

Para las muestras hemáticas se procedió midiendo dos mililitros que fueron colocados en el fondo del tubo generador. Se aseguró que quede sumergido el tubo abductor de aire. Por lo demás se realizó como se ha indicado precedentemente para la escala de patrones.

Por comparación de los discos problemas, se determinaron los μ g. de HCN/ 100 ml de sangre o bien en mg/kg.

Expresión de los resultados en: μ g % ó mg/kg.

7.2 Determinación de monóxido de carbono

7.2.1. Método de microdifusión (Técnica de Feldstein-Klendshoj).

En una cámara de Conway N° 1, se colocaron:

1 ml. de sangre en el compartimiento externo.

2 ml. de la sol. de cloruro de paladio al 0.01N en HCl, en el compartimiento central.

Luego, se agregó en el compartimiento externo 1 ml. de ácido sulfúrico al 10%, y se tapó asegurando hermeticidad (puede utilizarse grasa siliconada en los bordes de la cápsula).

Tiempo de difusión: 1 hora a temperatura ambiente o a 37°C en estufa.

Con una pipeta capilar se extrajo la solución del compartimiento interno (paladio metálico y exceso de sal de paladio), que se colocó en un tubo de centrifuga. Una vez centrifugada y con una pipeta de 0.1 ml. se transfirió este volumen de solución sobrenadante a un matraz aforado de 10 ml. En otro se colocó 0,1 ml de solución de goma arábica al 0.1% y 1 ml. de yoduro de potasio al 15%; se mezcló bien y se llevó a volumen.

Se leyó en espectrofotómetro a 500 nm.

El exceso de sal de paladio origina, con el ion yoduro, el complejo que sigue:



Cálculos:

$$X = \frac{D_t - D_d}{D_t} \times 0.05335 \times 520 = \text{mgCO}\% \quad (8)$$

D_t : es la densidad óptica del testigo, D_d : representa la densidad óptica del desconocido.

7.2.2. Método de Gettler y Freimuth.

Los reactivos utilizados fueron los siguientes:

Pd Cl_2 en 0,5 ml de HCl concentrado y diluido a 50 ml con agua destilada.

Solución de ferricianuro: 3.2 gr. de ferricianuro de potasio y 0.8 gr. de saponina disueltos en agua destilada, diluidos a 100 ml.

Solución de ácido láctico: 0.8 gr. ácido láctico en agua destilada y diluido a 100 ml.

Cloruro cuproso amoniacal: al 10%(P/V) en solución acuosa amoniacal al 5%.

Acetato de plomo: 10 gr. de acetato de plomo disuelto en agua destilada y diluido a 100 ml. con alcohol caprílico.

En la Fig. 22 se muestra el dispositivo empleado en la determinación del monóxido de carbono en las muestras de sangre de 35 víctimas fatales estudiadas en esta tesis.

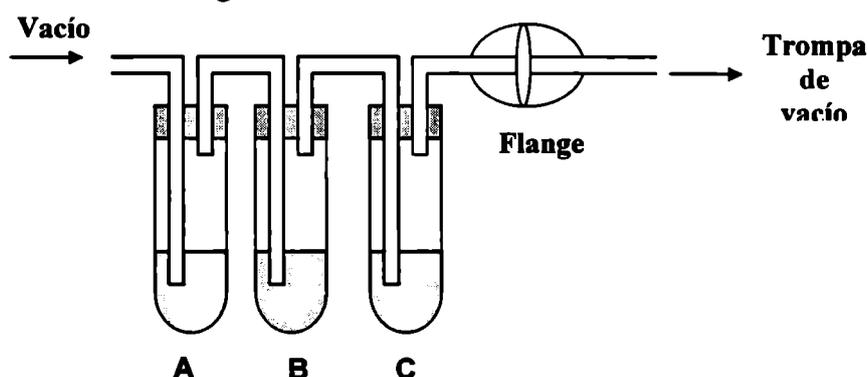


Figura 22 Dispositivo para la determinación de monóxido de carbono mediante el método de Gettler Freimuth

El procedimiento se efectuó según el esquema de trabajo siguiente:

Tubo A: 5 ml de solución de cloruro cuproso amoniacal.

Tubo B: 2 ml exactamente medidos de la sangre a analizar. Se agregó 4 ml de solución de ferricianuro de potasio y 2 gotas de alcohol caprílico. A continuación 1 ml de ácido láctico.

Tubo C: 5 ml de solución de acetato de plomo.

Se colocó entre los dos flanges de vidrio un disco húmedo de papel de paladio preparados como sigue:

Se cortó un trozo de papel Whatman N° 3 en forma de circunferencia de diámetro ligeramente inferior a la del flange. Se humedeció con gotas de solución de cloruro de paladio y se eliminó el exceso de solución comprimiéndolo entre trozos de papel de filtro.

Se colocó el disco entre los flanges y se presionó por medio de bandas de goma.

A continuación se procedió a la aireación, abriendo la canilla donde se encuentra la trompa de vacío, en forma regular, de modo que el burbujeo sea lento.

La interpretación de la técnica aplicada sería la siguiente:

Primero el aire atraviesa el cloruro cuproso amoniacal quien extrae el CO que pudiera contener. Luego sigue su paso a través de la sangre arrastrando el CO contenida en ésta. La corriente de aire que contiene el CO pasa finalmente por la solución de acetato de plomo eliminándose el SH₂ que eventualmente tuviera como consecuencia de la putrefacción. La corriente de aire que contiene el CO pasa a través del papel impregnado en Pd Cl₂ el cual se reduce a Pd metálico produciendo una mancha circular oscura cuya intensidad es proporcional a la cantidad de CO presente. Luego de interrumpir la aireación a los 20 minutos, se retira el disco y se lava con agua destilada para eliminar exceso de la solución de paladio y se compara con la solución estándar de manchas.

Para mayor exactitud del método se efectúa una corrección determinando el % de Hemoglobina (%Hb) en sangre y se aplica la fórmula:

$$\frac{100}{\text{Hb}\%} \cdot \text{saturacionCOHb} = \text{saturacionCO} \quad (9)$$

7.3. Reseña del caso de intoxicación masiva con gases tóxicos (CO y HCN)

A mediados de 1990 se produjo en cierto instituto penitenciario estatal, un incendio de colchones fabricados a base de espuma de poliuretano. El luctuoso episodio se inició en unos de los pabellones principales de la unidad carcelaria, dejando como saldo 35 muertes.

En las investigaciones realizadas por la instrucción judicial, llamó poderosamente la atención el breve tiempo transcurrido entre el inicio del fuego y los óbitos: entre 3 a 5 minutos.

El proceso legal requería, en orden a establecer responsabilidades y/o negligencias por partes del personal penitenciario, si el tiempo necesario para evacuar el sector en llamas fue demorado innecesariamente. Los agentes criminalistas ponían énfasis en el esclarecimiento de los hechos en los breves minutos en que se produjo el desenlace fatal.

El objeto de nuestro trabajo fue establecer cual o cuales agentes tóxicos (CO y/o HCN) habían sido responsables de los 35 decesos.

7.4. Metodología para la determinación de metanol y ácido fórmico

Para la determinación de metanol 1 ml de sangre o 1 g de víscera se homogeneizaron con solución saturada de carbonato de potasio y 1 ml de alcohol isopropílico como estándar interno. Se incubaron en viales de vidrio perfectamente sellados durante 30 a 45 minutos a 60°C, para luego inyectar una alícuota tomada del espacio de aire, en el cromatógrafo gaseoso. El equipo usado fue un cromatógrafo gaseoso Shimadzu GC-14 conectado a un integrador CR4A, columna de acero inoxidable (2 m de longitud, 3 mm de diámetro interno) empacada con 0.3% Carbowax 1500-graphapack 60/80 (EMQ-ALL TECH), isotérmica 100°C, detector de ionización de llama (FID) conectado a un integrador Shimadzu C-R4A. Se realizó una curva de calibración de metanol con soluciones standard en el rango 0 a 4 g‰.

La determinación de ácido fórmico (metabolito del metanol) se realizó por metodología de espacio-cabeza (head space) mediante cromatografía gaseosa y detector FID previa transformación en metilformiato. (Ramsey y Flanagan, 1982; Abolin, 1980).

Así, 0.5 ml o 0.5 g de sangre y tejidos humanos fueron tratados con 250 µl de ácido sulfúrico concentrado en viales de vidrio sellados. Se agitó con suma precaución evitando que los reactivos se adhieran en la pared de vidrio e incubó por 20 min. con posterior enfriamiento a temperatura ambiente. Se agregó 15 µl acetonitrilo como standard interno y 15 µl de metanol para convertir el ácido fórmico en formiato de metilo. Se incubó por 20 minutos a 60° y luego se enfrió. Finalmente se inyectó 0,4 a 0,6 ml. de aire confinado en el recipiente de reacción en un Cromatógrafo Gaseoso conectado a un integrador CR4A, columna Megabore DBWax de J&W, 30 m long. 0.53 mm de diámetro interno. Temperatura inicial 35°C, 1 minuto y 10°C/min de gradiente hasta 100°C temperatura final; siendo la temperatura de inyección y detector de 150 °C.

7.5. Reseña del caso de intoxicación masiva con metanol.

En Argentina, en febrero y setiembre del año 1993, ocurrió una intoxicación masiva debido a la ingesta de bebidas alcohólicas (vinos en damajuanas) contaminadas con alcohol metílico, agregado intencionalmente. El saldo luctuoso de esta intoxicación masiva (la más grande que se recuerda en el país) fueron 47 víctimas fatales y cientos de personas afectadas. En el presente trabajo se estudiaron 15 víctimas fatales debido a falta de disponibilidad de datos para el resto. La intoxicación se manifestó en forma rápida y los síntomas presentados por los pacientes fueron: oliguria que se evidenció en breve lapso (2 a 12 horas posteriores a la ingestión) llegando a la anuria completa en 24 a 48 horas. Todos los casos mostraron acidosis metabólica. Entre las secuelas de los pacientes se destaca la ceguera, que algunos padecen hasta hoy.

7.5.1 Muestras

Se estudiaron quince víctimas fatales. En todas las autopsias se analizaron: sangre (S) y los principales órganos (cerebro (C), riñón (R), pulmón (P)) junto con la historia clínica de las víctimas. Las muestras de sangre fueron tomadas de las venas femorales y ubicadas en tubos sin preservador a 4°C. Las vísceras se almacenaron congeladas hasta el momento del análisis.

7.5.2 Clasificación de las víctimas en grupos de acuerdo a la intoxicación por metanol

Grupo 1: individuos con tratamiento y sobrevivida de hasta 10 días (5 casos).

Grupo 2: recibieron tratamiento y sobrevivieron hasta 3 días (4 casos).

Grupo 3: no recibieron tratamiento y murieron en pocas horas (6 casos).

7.6. Metodología para la determinación de dietilenglicol (DEG)

La determinación de dietilenglicol se realizó mediante una correcta preparación de las muestras según fueran muestras de jarabe de propóleos o muestras biológicas provenientes de las autopsias (sangre o vísceras).

7.6.1. Condiciones de ensayo para el análisis de jarabe de propóleos

Las muestras de jarabe perteneciente a cada una de las víctimas de la intoxicación fueron diluidas en metanol (1:10) de grado cromatográfico (Merck®). El análisis cuali – cuantitativo se realizó mediante un cromatógrafo gaseoso Shimadzu GC-14 A e integrador Shimadzu CR 4 A. La columna utilizada semicapilar DB-WAX de J&W (0.53 mm de diámetro interno y 30

m de longitud con un film de 1.5 micrones). El detector de ionización de llama (FID) se operó a 250°C. El inyector a 250°C. La temperatura del horno se programó con una temperatura inicial de 120°C durante un minuto con un gradiente de 15°C/min hasta 200°C de temperatura final. El gas transportador utilizado fue nitrógeno a 12 cm³/min.

La identificación de compuestos fue efectuada por comparación del tiempo de retención en las muestras sometidas a la cromatografía respecto de los estándares de propilenglicol (PG), dietilenglicol (DEG) y etilenglicol (EG), disueltos en metanol purísimo. Las drogas referidas fueron provistas por la Cátedra de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata.

En todas las muestras analizadas se utilizó etilenglicol como estándar interno.

Como estudio complementario, se tomaron tres muestras de propóleos de diferentes partidas involucradas en el episodio de intoxicación masiva, procesándose por RMN en un equipo Bruker ACE 200 del Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad de Buenos Aires. Para ello, alícuotas de 0.3 ml de cada muestra fueron diluidas en igual volumen de agua deuterada midiendo el espectro de resonancia magnética nuclear-C₁₃ (RMN-C₁₃) mediante un equipo Bruker ACE 200 a un campo magnético de 50.3 Mhz, completamente desacoplado del hidrógeno.

7.6.2. Aislamiento y condiciones cromatográficas para el análisis de DEG en sangre y vísceras.

Previo a seleccionar el método de aislamiento más óptimo se ensayaron tres procedimientos diferentes:

b1. Alícuotas de sangre y/o tejidos bien desmenuzados mediante mixer se trataron con ácido perclórico 1.2 M, agitando por tres minutos y centrifugando a continuación a 3.000 rpm, durante diez minutos. El sobrenadante fue neutralizado con carbonato de potasio, controlado mediante papel de pH marca Merck® Este sobrenadante límpido se utilizó para el ensayo cuali – cuantitativo.

b2. Porciones de tejido homogenizado y bien desmenuzado mediante un mixer de cuchillas finas se trataron con agua destilada y centrifugaron a 3000 rpm, durante 10 minutos. El sobrenadante fue evaporado y retomado con metanol purísimo.

b3. Alícuotas de tejido (10gr de cada órgano) se procesaron convenientemente, mediante mixer para lograr un desmenuzado óptimo y posteriormente tratado con sulfato de sodio anhidro de pureza analítica durante 24 horas en estufa a 40°C. El polvo desecado fue

introducido en un cartucho de papel de filtro Wathman N°3 y colocado en un Soxhlet a efectos de realizar la extracción durante 12 horas con metanol p.a. El extracto fue evaporado a baja temperatura mediante un rotavapor a presión reducida y mantenido en heladera a 4°C hasta su análisis.

Las muestras de sangre fueron tratadas directamente con metanol p.a (1:10) agitando y luego centrifugando a 3000 rpm durante 10 minutos, previo agregado de etilenglicol como estándar interno.

7.6.3. Condiciones del ensayo de cromatografía para muestras viscerales

Fue aplicada la técnica de cromatografía gaseosa para el análisis cuali-cuantitativo, utilizando para ello un equipo Shimadzu GC 14 A con similares condiciones a las comentadas más arriba. La temperatura inicial del horno fue de 110°C durante 2 min y un gradiente de 8°C/min hasta temperatura final de 210°C.

7.6.4. Determinación de parámetros bioquímicos ensayados

Los parámetros de medio interno se realizaron sobre muestras de sangre obtenidas en el momento de ingreso al hospital mediante punción arterial empleando jeringa de vidrio heparinizada y mantenida en anaerobiosis.

Los iones potasio y sodio fueron determinados mediante fotometría de emisión por llama empleando un equipo Radiometer FLM, Chirom Rapid Lab 348, ILAIT y se expresaron en mEq/L. El pH y pCO₂ fueron medidos por un equipo Radiometer BMS3, MK2 conjuntamente con ion cloruro, bicarbonato y carbonato expresados en mEq/L, mientras que el exceso de base (EB) fue calculado empleando los datos de pH, bicarbonato y hemoglobina.

El GAP aniónico fue calculado mediante la siguiente fórmula:

$$\text{GAP anionico (mEq/L)} = (\text{Na}^+) + (\text{K}^+) - (\text{Cl}^-) - (\text{HCO}_3^-) \quad (10)$$

7.7. Reseña del caso de intoxicación masiva con DEG

Durante los primeros días del mes de agosto de 1992 comenzaron a circular noticias sobre extrañas muertes de personas cuya característica común era presentar un daño renal intenso, que para muchos especialistas parecía impresionante y sin precedentes.

Al transcurrir los días el número de personas afectadas por éste síndrome aumentaba. Al daño renal se sumaba una depresión del SNC, daño hepático y debilidad muscular generalizada.

Otros síntomas registrados consistían en náuseas, vómitos, cefaleas con daño a nivel hepático, con altos niveles en sus enzimas (GPT, GOT, gamma-GT y LDH) y acidosis metabólica.

Se propusieron distintas hipótesis: que el factor causante de las muertes ocurridas podía ser un virus, una toxina de un poderoso veneno, con la angustiante realidad, que mientras no se conociera el agente causal no podía establecerse el camino apropiado para combatirlo. Con el correr de las horas se encontró un factor común en los afectados: todos habían ingerido jarabes de propóleos de una marca en su momento muy conocida.

Fue así que el Laboratorio de Toxicología y Química Forense recibió el día 13 de agosto, mediante un pedido especial de colaboración por parte del Ministerio de Salud Provincial, cinco frascos de jarabe de propóleos para su estudio. A pocas horas de comenzada la investigación aparecieron los primeros indicios que el agente responsable pudiera ser un glicol (etilenglicol o dietilenglicol).

Resolvimos confirmarlo por otra técnica totalmente desvinculada de la anterior: espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

En el presente trabajo se estudiaron víctimas fatales y en distintos tiempos postmortem. Para encarar el estudio de la afectación de parámetros de medio interno y estimación de dosis letales, contamos con quince historias clínicas e informes de autopsia, además de otros datos recabados por los investigadores del episodio.

7.7.1 Clasificación de víctimas en grupos de acuerdo al tiempo de supervivencia

Las 15 víctimas se clasificaron en tres grupos de acuerdo al tiempo de supervivencia desde el ingreso al hospital hasta la muerte. Tres grupos fueron definidos como se detalla a continuación:

Grupo 1: pacientes que sobrevivieron hasta 3 días (3 casos)

Grupo 2: pacientes que sobrevivieron entre 3 y 5 días (3 casos)

Grupo 3: pacientes que sobrevivieron entre 5 y 21 días (9 casos).

En todos los pacientes se realizó tratamiento de hemodiálisis (HD) con un retardo entre 1 y 6 días entre la ingestión del jarabe de propóleo y el inicio del tratamiento de HD con desarrollo de acidosis metabólica.

7.8. Determinación de alcohol etílico en sangre

Se trabajó con muestras de sangre de individuos postmortem las cuales arriban a nuestro laboratorio. En un frasco de vidrio de 10 ml de capacidad, se agregaron:

1 ml de sangre entera previamente homogeneizada

1 ml de isopropanol, 1 g. ‰, como estándar interno

1 ml de solución saturada de K_2CO_3 , como agente liberante

A continuación se precintó el tapón de goma colocado como cierre del recipiente y sellado herméticamente con precinto de aluminio. Posteriormente se colocó durante 30 minutos en un baño termostático a 50°C y a continuación se dejó enfriar a temperatura ambiente.

Se tomaron entonces entre 0.4 a 0.5 ml del aire confinado en el recipiente mediante una jeringa hipodérmica plástica de 1 ml de capacidad inyectadas en el cromatógrafo.

El equipo utilizado fue un Cromatógrafo Gaseoso Shimadzu GC-14 conectado a un integrador CR4A, columna de acero inoxidable (2 m de longitud, 3 mm de diámetro interno) empacada con 0.3% Carbowax 1500-graphapack 60/80 (EMQ-ALL TECH), isotérmica 100°C, detector de ionización de llama (FID) conectado a un integrador Shimadzu C-R4A. Se realizó una curva de calibración, tal como se señala en el anexo I de esta tesis. Las condiciones de trabajo fueron las siguientes: Temperatura inicial 35°C, 1 minuto y 10°C/min de gradiente hasta 100°C temperatura final; siendo la temperatura de inyección y detector de 150 °C

7.8.1. Diseño factorial de los ensayos de variación del contenido de etanol en muestras de sangre sometidas a diversas condiciones de preservación

Se diseñó una experiencia para analizar el efecto de las condiciones de preservación (temperatura, presencia de cámara de aires en el recipiente y tiempo) sobre los valores de alcoholemia en muestras de sangre recibidas en nuestro laboratorio.

Se analizaron los siguientes factores:

Cámara de aire, 5 condiciones: 0, 5, 20, 35 y 65%

Temperatura de almacenamiento 3 condiciones: 20°C, 4°C y -10°C

Diseño factorial: (5 x 3), total: 15 condiciones de ensayo.

Asimismo, se estudió la cinética de degradación de etanol en las 15 condiciones ensayadas en función del tiempo. Se ensayaron los siguientes tiempos: 0, 3, 7, 15 y 30 días. Se trabajó con muestras de sangre conteniendo diferentes concentraciones de alcoholemia que variaron entre 0.5 y 4.30 g/L.

Se trabajó en todos los casos con muestras de sangre entera y sin agregado de preservador químico debido a que en esas condiciones se reciben las muestras que llegan a nuestro laboratorio (95% de los casos).

También, en el mismo ensayo se estudió la generación de sustancia de putrefacción que se determinaron como la relación de áreas entre la señal previa al standard interno (amina de putrefacción) y estándar interno: Isopropanol en las muestras de sangre entera.

Los análisis se realizaron por duplicado y se expresaron en g/L.

7.8.2. Diseño del experimento para analizar las variaciones de etanol agregado a muestras de sangre entera bajo diferentes condiciones de preservación.

Se realizó el diseño de un experimento con muestras de sangre exentas de etanol a las que se les agregó concentraciones conocidas de etanol (0, 0.84, 1.64, 2.70 y 3.60 g/L).

Se estudió el efecto que presenta el agregado de 5% de preservador (NaF) y presencia o no de cámara de aire en un 5% sobre los valores de alcohol agregado. Se estudiaron las cinéticas de degradación del etanol a tres temperaturas (20°C, 4°C y -10°C).

En la Tabla 9 se presentan las condiciones ensayadas.

Este diseño se efectuó para evaluar las pérdidas de alcohol en prácticamente ausencia de cámara de aire y el efecto de la matriz en la generación de productos de putrefacción y etanol.

Tabla 8: Condiciones experimentales ensayadas en los estudios de etanol contaminado en muestras de sangre entera.

Muestra	NaF (5%)	Cámara de aire %	Cantidad de alcohol agregado (g/L)
1	Si	5	0.84
2	No	5	1.64
3	Si	0	2.70
4	No	5	3.60
5	No	5	0.0

7.9. Cocaína y productos de biotransformación

Para el estudio de cocaína y sus metabolitos se ensayaron varias matrices (tradicionales y alternativas) obtenidas de individuos fallecidos y tomadas en diferentes condiciones (a, b y c).

a) Se estudió la presencia de cocaína y sus metabolitos tomados de ocho casos reales de individuos fallecidos cuyas muestras arribaron a nuestro laboratorio. Las muestras fueron extraídas entre 15-120 días posteriores a la muerte, procurando obtener sangre, orina, cerebro, hígado, riñón y contenido estomacal cuando fuera posible.

El criterio en la selección de las ocho muestras se basó en:

1. Casos con tiempos conocidos desde la muerte hasta el análisis en el laboratorio.
2. Conocimiento certero que la víctima era adicto consuetudinario.
3. Detalles, a través de la anamnesis, sobre forma habitual de incorporación.
4. Forma de resguardo. Caso N°1: a -10°C ; casos 2, 7 y 8: a 4°C ; casos 3, 4, 5 y 6: a temperatura ambiente.
5. Disponibilidad de tejidos: se escogieron los que ofrecían mayor variedad.

b) Se estudió la presencia de cocaína y sus metabolitos en **exhumaciones** provenientes de 4 casos de individuos en los cuales se conocía la data del óbito y de la exhumación. En estos cuatro casos se estudió cocaína y sus metabolitos en vísceras (putrúlagos) y en cabello y vello púbico y axilar como matriz alternativa.

c) Se estudió la presencia de cocaína y sus metabolitos utilizando a los pelos como matriz. Se utilizó pelo (pericraneal y púbico) provenientes de exhumaciones.

7.9.1. Procedimiento para humores y órganos

Las muestras se dividieron en dos alícuotas con el objeto de aplicar dos métodos de aislamiento paralelos: extracción directa mediante la técnica de Fassi y la extracción en fase sólida (SPE).

Se desmenuzó el material hasta formar una papilla homogénea, de la que se tomaron 10g, se introdujeron en un mortero al que se le adicionó ácido tartárico sólido hasta franca reacción ácida al papel de pH.

A continuación se agregó sulfato de sodio anhidro en cantidad doble del peso de la papilla de la muestra problema, mezclando continuamente hasta formar una masa homogénea que se deja secar al aire en lugar templado y a temperatura inferior a 50°C . Una vez seco se disgregó el material y se pulverizó hasta consistencia de polvo fino.

Se colocó luego en un cartucho de papel de filtro para incorporarlo a un soxhlet. Ensayamos también la siguiente modificación:

Se tomó una ampolla de decantación, tal como se ilustró en la Figura 2 y se colocó un trozo enrollado de lana de vidrio. A continuación se introdujo la muestra desecada y se procedió a la extracción directa con los solventes orgánicos.

Para la determinación de cocaína y/o sus metabolitos en vísceras y/o sangre por medio de extracción en fase sólida (SPE), se procedió a la preparación de la muestra empleando una

parte de tejido o sangre con 3 partes de agua deionizada para luego centrifugar a 3000 rpm durante 10 minutos. Se tomó el sobrenadante y luego de ajustar el pH a valores dentro del rango 4.4-5.5, el extracto se procesó en columnas de extracción en fase sólida Clean Screen DAU 303[®]. Se ensayaron varios solventes de extracción hasta lograr la mejor recuperación de las muestras: 1) Mezclas de éter etílico-éter de petróleo (50:50); 2) Metanol p.a. 3) etanol 4) diclorometano; observándose que el mejor solvente fue el diclorometano.

7.9.2. Adaptación que puede ser usada en un laboratorio de baja complejidad

Una vez disgregado y convertido en polvo fino se colocó en un erlenmeyer con tapa esmerilada y se procedió a la extracción del material del siguiente modo:

1. Se agregó a continuación tres porciones de éter de petróleo en cantidad suficiente hasta que sobrepasó 1cm aproximadamente la superficie de la muestra. Se agitó a intervalos de tres a cinco minutos, dejando en contacto aproximadamente 20 minutos (se dejó en reposo hasta obtener una neta separación entre las fases) recogiendo en un vaso de precipitados de capacidad adecuada. Este extracto se desechó.

Este extracto *éter de petróleo ácido* extrae las materias lipídicas, constituyéndose en una etapa previa de purificación.

2. Luego de la extracción se alcalinizó la muestra con amoníaco hasta franca reacción alcalina y se extrajo con éter etílico.

Esta es la fracción *éter etílico alcalino* donde se extraerá la cocaína y estructuras relacionadas. Para purificar el residuo se retomó este, con algunos mililitros de ácido sulfúrico al 5%. Se realizó la extracción con éter etílico. A continuación se desechó la fracción orgánica y se alcalinizó la fracción acuosa restante con amoníaco y posterior extracción 3 veces con porciones de 10 ml de éter etílico. Se filtró, evaporó y retomó con 1ml de metanol.

7.9.3. Confirmación de Cocaína por GC

Al extracto de la orina o sangre evaporado a sequedad se le añadieron 50 µl de PFPA (anhídrido pentafluorpropiónico) y 25 µl de pentafluoropropanol y se calentó la mezcla a 90 °C por 15 min. Se evaporó a sequedad y se reconstituyó con 25 µl de acetato de etilo.

Columna: OV-17 de 2 m por 2-4 mm d.i.

Gas Portador: N₂ a 30 ml / min.

Temperaturas: Inyector a 220°C.

Horno: 220°C.

Detector (FID): 300°C.

Luego, los extractos fueron analizados por cromatografía gaseosa con detector selectivo de masas en modo SIM (selected ion monitoring). Los espectros obtenidos se compararon con las bibliotecas NIST y Pfleger-Maurer-Weber que se encuentran incorporadas en el soft del equipo. El cromatógrafo gaseoso que se utilizó fue un equipo marca Shimadzu GC-17 con columna capilar no polar DB-5 MS de J&W Scientific (30 metros de longitud, 0.25 mm diámetro interno, 0.25µ de film). La temperatura de inyección fue de 280°C. El gas portador He a flujo constante de 8 ml/min. En el horno: Temperatura inicial fue de 200°C durante 3 min y un gradiente de 8°C/min hasta 290°C. El cromatógrafo se halla asociado a un detector de masas Shimadzu QP 5000.

7.9.4. Metodología para estudio de cocaína en pelo

Pasos metodológicos:

7.9.4.1. Decontaminación o sistema de lavados: tiene por objeto remover droga externa adherida al pelo.

7.9.4.2. Preparación de la muestra: consiste en la extracción de la droga incorporada en la matriz.

7.9.4.3. Purificación: tiene por finalidad remover restos de la matriz y otras sustancias contaminantes.

7.9.4.4. Identificación analítica: de droga madre y metabolitos.

7.9.4.5. Interpretación de resultados: discusión de valores de corte (cut-off).

7.9.4.1. Recontaminación

El material a analizar (pelos) se decontaminó siguiendo el siguiente procedimiento

1. Se lavó con diclorometano durante 15 minutos a 37°C
2. Se lavó con agua destilada durante 15 minutos a 37°C
3. Se lavó con diclorometano durante 15 minutos a 37°C
4. Se reservó los lavados para posterior análisis por CG-MS.
5. Se secó el pelo colocándolo entre papeles de filtro y presionando.
6. Se pesó con exactitud de todo el material a analizar.
7. Se cortó en segmentos de 1.0 a 1.5 cm cada uno.

7.9.4.2 Preparación de la muestra.

Se realizó la extracción de cada uno de los segmentos en forma separada. Se utilizó la técnica de extracción y derivatización de cocaína

Se tomó pelo trozado y se agregó standard interno deuterado (250µl) de cocaína-d₃ Sigma® y Benzoilecgonina-d₃ Sigma®

Se agregó 1 ml HCL 0.1 N a 50°C durante 18hs.

Se neutralizó con NaOH 0.1 N a pH =7

Se agregó Buffer pH: 9.2

Se extrajo dos veces con 5 ml cloroformo- isopropanol- n-heptano (50:17:33)

Se evaporó y derivatizó con 100 µl de HFBA (anhídrido heptafluorutírico) más 70µl HFP-OH (pentafluoropropanol) a 60°C, durante 30 minutos.

Se evaporó y reconstituyó con acetato de etilo.

7.9.4.3. Purificación

Además de la extracción líquido-líquido, consignada en el paso anterior, se procedió de la siguiente manera con el objeto de purificar el extracto obtenido luego de la digestión:

a) Preparación de la columna

Se eluyó una vez con 3 ml de metanol y luego una vez con 3 ml de agua destilada.

A continuación se agregó 1 ml de ácido acético. En ninguno de estos pasos se dejó secar la columna.

b) Aplicación de la muestra:

Se colocó la totalidad de la muestra dentro del reservorio y se adicionó a la columna a un flujo de 1-2 ml / minuto.

c) Lavado de la columna. (Se efectuaron eluciones como sigue)

Una vez con 3 ml de buffer fosfato 0.1 M a pH 6.

Una vez con 1 ml de ácido acético 1 N.

Luego drenar la columna durante 5 minutos con máximo vacío (15-20mm Hg.)

Una vez con 3 ml de n-hexano.

d) Elución de drogas básicas:

Se eluyó en un vial dos veces con 1 ml de metanol básico (2 partes de hidróxido de amonio concentrado en 98 partes de metanol)

Se agregó 3 ml de agua destilada y 200-300 µl de cloroformo, se agitó y centrifugó durante 30 segundos.

7.9.4.4 Identificación analítica.

La identificación analítica se realizó por cromatografía gaseosa-espectrometría de masas (GC-MS), siendo la técnica más utilizada y recomendada para el análisis de drogas de uso indebido en pelo. Se confrontaron los tiempos de retención para la cocaína, benzoilecgonina y metilecgonina.

El equipo utilizado fue un cromatógrafo marca Shimadzu GC-17 con columna capilar no polar DB-5 MS J&W Scientific (30 metros de longitud, 0.25 mm diámetro interno, 0.25 μ de film). La temperatura de inyección fue de 280°C. El gas portador He a flujo constante de 8 ml/min. En el horno, la temperatura inicial fue de 200°C durante 3 min y un gradiente de 8°C/min hasta 290°C. El cromatógrafo se halla asociado a un detector de masas Shimadzu QP 5000 con tres bibliotecas incorporadas en el soft: Pfleger Maurer Weber, NIST61 y NIST12.

7.9.4.5 Cuantificación

Fue realizada mediante la medición de relación de las áreas correspondientes a las señales m/z 182 de la muestra y 185 del estándar interno deuterado.

7.9.5. Determinación de límites de detección para el análisis de cocaína y sus metabolitos.

a) en muestras de pelo

Se determinaron los límites de detección (LOD) para los análisis de cocaína y sus metabolitos como benzoilecgonina. Para los casos donde hubo que efectuar una evaluación cronológica de consumo de cocaína, se tomaron muestras de pelo de la zona pericraneal y púbica por arranque alcanzando inclusive el folículo piloso. Se realizaron los cortes del cabello a distancias entre 1 cm y 1.5 cm y se evaluaron las concentraciones límites de cocaína en cada fracción cortada.

El valor de corte (cut off) fue tomado como 0.5ng/mg de pelo para cocaína, benzoilecgonina y EME, según lo recomendado por la Society of Hair Testing (Wennig, 2000). El límite de detección para ambos analitos fue de 0.01 μ g.

b) en sangre entera

Se ensayó la recuperación de la metodología empleando sangre fresca libre de drogas y adicionada con diferentes niveles de cocaína deuterada y se compararon los porcentajes de recuperación aplicando el método de Fassi con SPE. El límite de detección fue también de 0.01 μ g.

RESULTADOS Y DISCUSION

CAPITULO 8

FACTORES FISICOS Y QUÍMICOS INVOLUCRADOS EN LA GENERACIÓN DE ACIDO CIANHÍDRICO Y MONÓXIDO DE CARBONO EN INCENDIOS. TRATAMIENTO DE LOS DATOS ANALITICOS EN LA PREDICCIÓN DE SU ACCIÓN BIOLÓGICA.

A los fines de la presente contribución es importante destacar el rol del ácido cianhídrico (HCN) en la combustión de polímeros que contienen nitrógeno en su estructura, tal como el poliuretano, utilizado entre otros fines para la fabricación de colchones o bien como cobertores acústicos en locales bailables o de espectáculos musicales.

A propósito de este último comentario acerca del uso de materiales sintéticos orgánicos, fue mencionado en la introducción el trágico episodio del incendio del local de bailes y recitales “República de Cromagnon” en la ciudad de Buenos Aires.

Los mensajes preliminares basados en intercambio de información y consultas entre especialistas toxicólogos de nuestro país, a través de la REDARTOX (Red Argentina de Toxicología), dieron cuenta en varias víctimas de la presencia de cianuro en la sangre.

Por otro lado, distintos centros hospitalarios alertaron sobre casos de afectados severamente y que poseían tenores de monóxido de carbono en sangre muy por debajo de los que se espera para intoxicaciones oxicarbonadas por incendios en espacios confinados, tal como sucedió en la tragedia denominada “de Once”.

Asimismo, Parrini (2005) señalaba a través de la misma red que atento los bajos valores de monóxido de carbono, la investigación de HCN en los cadáveres podría explicar el coma y la muerte de muchos afectados. Es decir, los datos disponibles aún eran escasos.

Seguramente resultará llamativo que los clásicos tóxicos gaseosos CO y HCN se presten a contradicción y dificultades. Es que en realidad los conocimientos sobre la generación de estos gases tóxicos en combustiones no han sido hasta hoy suficientemente comprendidos por los investigadores en todo el mundo (Alarie, 2002; Yeoh y Braitberg, 2004).

El episodio traído en esta contribución corresponde a un incendio de colchones en cierta unidad penitenciaria y que provocara un saldo de 35 muertes, como fuera comentado en la introducción. Nos ocuparemos de éste caso para responder a los objetivos específicos que fueron propuestos.

La Tabla 9 expresa los valores de ácido cianhídrico y monóxido de carbono para cada una de las víctimas del trágico incendio.

Tabla 9 Tenor de Monóxido de carbono y ácido cianhídrico en la sangre de las víctimas fatales del incendio de colchones de goma espuma de poliuretano.

	Víctimas	Monóxido de Carbono en % de saturación de carboxihemoglobina	Ácido Cianhídrico (en mg/kg)
1	A.B.A.H	9	3.0
2	B.N.O.H	12	2.5
3	C.S.M.A	18	4.0
4	G.V.R	7	4.0
5	C.N.N.F	6	2.5
6	R.S.R.A	9	2.7
7	B.N.N.L.H	8	2.8
8	G.R.H.L	9	3.5
9	R.M.E.C	10	2.8
10	C.A.H.E	5	2.8
11	A.G.E.E	14	4.5
12	C.L.R.A	10	6.2
13	G.M.H.D	5	2.8
14	D.A.F.P	14	4.5
15	B.M.D	7	2.5
16	F.R.U	4	7.2
17	R.I.F.E	5	4.4
18	G.V.L	5	2.9
19	D.M.A	6	2.5
20	M.P.H.A	10	4.5
21	F.C.J.L	13	2.0
22	T.P.F.A	10	4.5
23	A.G.D.A	5	2.4
24	G.A.F	5	2.5
25	C.M.N.F	10	2.9
26	L.G.W	12	3.8
27	A.G.R	10	4.5
28	P.A.U.V	15	4.9
29	M.M.M.A	10	3.5
30	F.N.G	10	2.4
31	G.C.J.A	14	2.8
32	C.G.R.D	5	4.9
33	W.S.M	5	4.8
34	C.L.M.A *	N.D	N.D
35	A.G.D.A *	N.D	N.D

N.D: No detectado.

* permanecieron internados más de 24 hs. con tratamiento terapéutico de rigor.

Los resultados cuantitativos presentados en la tabla precedente pueden expresarse como valores mínimos, máximos y sus promedios. Para el CO oscilan entre un 4%-18% con un promedio de 9%, expresado como % de saturación de COHb (carboxihemoglobina).

Por otro lado el HCN muestra un intervalo de 2.0-7.2 mg/L, con un promedio de 3.5 mg/L. Estos últimos valores exceden ampliamente los valores letales, mayores a 1 µg/L, consignados en bibliografía. Para el gas cianhídrico en sangre (Ballantyne, 1974; Baselt, 2000; Moffat et al, 2004).

Repetto y Martínez (1976) informaron que en las víctimas fatales de un incendio en un “night club”, encontraron altos niveles de CO y dosis sub-letales de ácido cianhídrico en 4 de los 6 occisos.

Elkius y Coleman, citado por Guatelli (1992), señalaron que se obtiene una mayor proporción de CO con respecto a HCN en la descomposición pirogenada de plásticos nitrogenados, mientras que Montgomery (1986) consigna que el HCN en forma masiva es desprendido en ambientes con muy poco oxígeno.

Guatelli (1964, 1992), comenta detalladamente ensayos experimentales y accidentes provocados por incendios en los que se generaron el HCN.

La mayoría de las muertes por cianuro ha sido consecuencia de contaminaciones accidentales, suicidios u homicidios. En este sentido hicimos hincapié en las intoxicaciones agudas por liberación masiva del gas cianhídrico en incendios de sustancias cuya estructura molecular contiene nitrilos, capaces de generar al potente tóxico.

Si bien existe un considerable número de trabajos que mencionan la posible producción de HCN en incendios de plásticos nitrogenados, poco en cambio se ha informado sobre el posible rol preponderante del HCN como agente letal respecto del CO, especialmente en combustiones de plásticos o espumas como las de poliuretano.

La producción de HCN en diversos procesos, según los materiales involucrados, ha sido demostrada por diversos investigadores (Terril et al, 1978; Symington et al, 1978; Birky y Clarke, 1981; Montgomery, 1986; Lundquist et al, 1989; Alarie, 2002; Walsh et al, 2004; Yeoh y Braitberg, 2004). Se observa no obstante, una tendencia a atribuir un papel más relevante al CO generado que al HCN. Inclusive algunos autores sostienen que la producción de distintos compuestos nitrogenados (derivados nitrilos), podrían competir con el HCN limitando los efectos tóxicos de este último (Guatelli, 1992).

Estos estudios entonces sugerirían que el HCN podría provocar una rápida inhibición inicial sobreviniendo posteriormente la muerte por intoxicación con CO (Purser et al, 1984). Nuestros hallazgos para el caso del episodio de incendios de goma espuma de poliuretano, se contraponen a esta postura.

Purser et al (1984) comprobaron que la asociación del HCN con productos de la pirólisis de poliacrilonitrilos y monóxido de carbono era menos tóxica que el HCN *per se* observando una verdadera disminución de los síntomas clínicos. Los autores presumieron, sin comprobación alguna que existía un mecanismo competitivo entre los nitrilos y el ácido cianhídrico, limitando así los efectos de este último. Así estos estudios sugirieron que el HCN puede provocar, en casos de incendios, una rápida incapacidad o inhibición inicial produciendo luego la muerte por intoxicación oxicarbonada.

El primer informe sobre la detección de HCN en sangre de víctimas de incendios fue en 1966 (Wetherell, 1966) y desde allí varias contribuciones han confirmado este hallazgo. Sin embargo el rango de importancia de éste agente tóxico en incendios permanece bajo debate. Algunos autores informaron que el envenenamiento con HCN provocado por pirólisis de materiales conteniendo nitrógeno orgánico, puede ser un factor decisivo en las muertes consignadas (Mohler, 1975; Symington et al. 1978; Zamecnik y Tam, 1987; Ferrari et al, 2001; Walsh et al, 2004). Otros, sin embargo consideran al monóxido de carbono como el agente tóxico más importante (Repetto y Martínez, 1974; Birky et al, 1980; Lowry et al, 1985; Elkus, cit.Guatelli, 1992; Alarie, 2002).

Sin embargo, Guatelli (1992) menciona en su extensa monografía, que en varios episodios de incendios intencionales, nacionales como extranjeros, no se efectuaron determinaciones de ácido cianhídrico en laboratorio. Por ejemplo, en el primer incendio de estas características publicado por la literatura universal se estudió la existencia de CO y compuestos nitrosos, sin hacer referencia sobre la determinación de HCN. Este episodio ígneo involucró películas de nitrocelulosa en una importante clínica de Cleaveland, Estados Unidos en 1929 y que costó la vida de 125 personas.

La combustión inicial descompone al poliuretano entre 150-300°C, liberando entre otros productos HCN y CO. Montgomery (1986) basado en experimentos animales consignó que la temperatura en la que se formaría el temido HCN puede variar según los distintos tipos de polímero, notándose una diferencia relevante en las espumas rígidas y las espumas flexible. Estas diferencias se equilibran cuando se sobrepasan los 800°C. Por otro lado Kimmerle (cit. por Montgomery, 1986) encontró que la temperatura de descomposición de una espuma flexible de poliuretano a la cual producía una atmósfera letal en ratas era menor a 300°C, mientras que las espumas rígidas lo hacían por sobre los 650°C.

Al escindirse en una combustión más fácilmente el grupo CN^o del polímero con el aumento de la temperatura, teniendo en cuenta que esta puede alcanzar entre 500-1000°C en un tiempo de 2 a 5 minutos se deduce la rápida liberación masiva de HCN que se produciría.

Cabe señalar que la propagación de la combustión en este caso es significativamente más rápida que la observada en un incendio con cantidad equivalente de madera.

La descripción de incendios incontrolables con poliuretanos, indica que existe una rápida diseminación de fuego y humo que puede contribuir en forma relevante al potencial letal de estos sucesos. Guatelli (1992) en nuestro medio, nota que en unidades carcelarias se han producido incendios intencionales de colchones, con relleno de goma espuma, señalando que la muerte de muchos internos se habría producido por intoxicación oxicarbonada, sin practicar la determinación de HCN. Manifiesta además, que la incorporación de agentes retardantes de la combustión en este tipo de polímeros puede modificar los productos de degradación. Expresa también que la adición de cobre a la espuma flexible de poliuretano redundaría en una significativa reducción del HCN generado en incendios, como también otros productos de combustión.

Esta apreciación coincide con lo informado por Ferrari et al (2004) donde consignan un trágico episodio de incendio de colchones generado en pequeña celda de una comisaría. Las personas allí detenidas, bajo los efectos del alcohol, iniciaron la quema de goma espuma, produciéndose el deceso de cinco de los siete reclusos allí alojados. El estudio de la sangre, mediante la misma metodología que la consignada para el estudio de los 35 casos fatales, permitió revelar CO en tenores considerables: 35-65% y ausencia de HCN; mientras que el etanol fue positivo en un rango de 0.39 a 3.99g/L. La Tabla 10 muestra estos resultados, para confrontarlos con los emanados del episodio estudiado en esta tesis. Además, el ensayo en un dispositivo ad hoc sobre trozos de colchones quemados, como se comentó en el episodio del poliuretano, no mostró la generación de ácido cianhídrico, por lo que se presume que los aludidos colchones contenían agentes retardantes o bien no estaban compuestos por grupos funcionales ciano como en el caso objeto de estudio de la tesis.

La siguiente tabla muestra los resultados a los que se arribó en el estudio:

Tabla 10. Niveles de CO, Etanol y HCN en sangre de cinco víctimas por incendio de colchones informados por Ferrari et al (2004) en un episodio similar al que se trata en la tesis. (-) negativo

Muestra	COHb sat. (%)	Etanol (g/L)	Cianuro	Otras drogas
1	60	0.54	(-)	(-)
2	35	3.99	(-)	(-)
3	55	0.39	(-)	(-)
4	45	0.70	(-)	(-)
5	50	0.81	(-)	(-)

Aunque, no pudo verificarse la acción protectora del etanol frente al monóxido de carbono, el estudio permitió indirectamente, comprobar que ante la ausencia de materiales conteniendo nitrógeno en su estructura o bien poliuretanos con agentes retardantes de la ignición, no es generado el HCN.

En los estudios llevados a cabo con motivo de esta tesis, en las 35 víctimas fatales procedimos a aplicar el test de Pearson, Chi cuadrado, con el objeto de determinar si existía una relación estadística entre el HCN y el %COHb en sangre.

El resultado de $\chi^2 = 8.25$ (χ^2 teórico = 2.09; grados de libertad = 9, $\alpha=0.05$), mostró que el %COHb y concentración en sangre de HCN no son variables independientes. Por tanto, se analizaron diferentes relaciones entre estas dos variables, obteniéndose una razón:

$$\text{(COHb) / (HCN)} = \text{constante} \quad (11)$$

La mayoría de los casos mostró una relación de 2.72 ± 1.26 . Esta relación puede observarse en el histograma de la Figura 23.

Algunos autores han estudiado la relación entre ambos gases generados en incendios de materiales plásticos conteniendo nitrógeno en su estructura pero los reportes en este sentido son controvertidos. Matsubara et al (1990) informaron una correlación positiva entre el HCN y la COHb, por medio del análisis de regresión lineal, con significancia estadística ($p < 0.05$), en tanto que otros (Peclet et al, 1982; Zamecnik et al, 1987; Alarie, 2002) no encuentran correlación entre ambos especímenes en sangre de víctimas de incendios de este tipo de materiales. No obstante ello, nosotros sostenemos que se debe realizar la determinación de ambos tóxicos volátiles en estas circunstancias, con el objeto de alcanzar una idea más acabada sobre la presunta influencia de alguno o de ambos venenos en el proceso de intoxicación. Esta opinión se encuentra en línea con una publicación muy reciente de Walsh et al (2004) que enfatiza seriamente la importancia del ácido cianhídrico en incendios de materiales diversos, consignando que entre 5000 y 10000 personas mueren cada año en Estados Unidos por motivo de intoxicación cianhídrica proveniente de la inhalación de gases en incendios.

Estimamos que las disimilitudes encontradas se deben en parte a la composición y tipo de espuma obtenidos en los procesos de fabricación además de la incorporación de sustancias como retardadores de la combustión. Esto se halla en consonancia con estudios de otros

casos, en nuestro medio y bajo similares condiciones de incendio en los que la determinación de ácido cianhídrico arrojó resultados negativos (Ferrari et al, 2004).

Asimismo, debe ponerse especial cuidado en la investigación de otros compuestos provenientes de la degradación pirolítica de plásticos, que serían originados en la combustión y que podrían influir en el grado de intoxicación. No obstante para casos de liberación masiva por medio de poliuretanos, sin agentes retardantes de ignición, estos productos secundarios no influirían significativamente, pues los síntomas del envenenamiento se producen en un breve lapso (pocos minutos), condicionando así la acción biológica de estos componentes tóxicos.

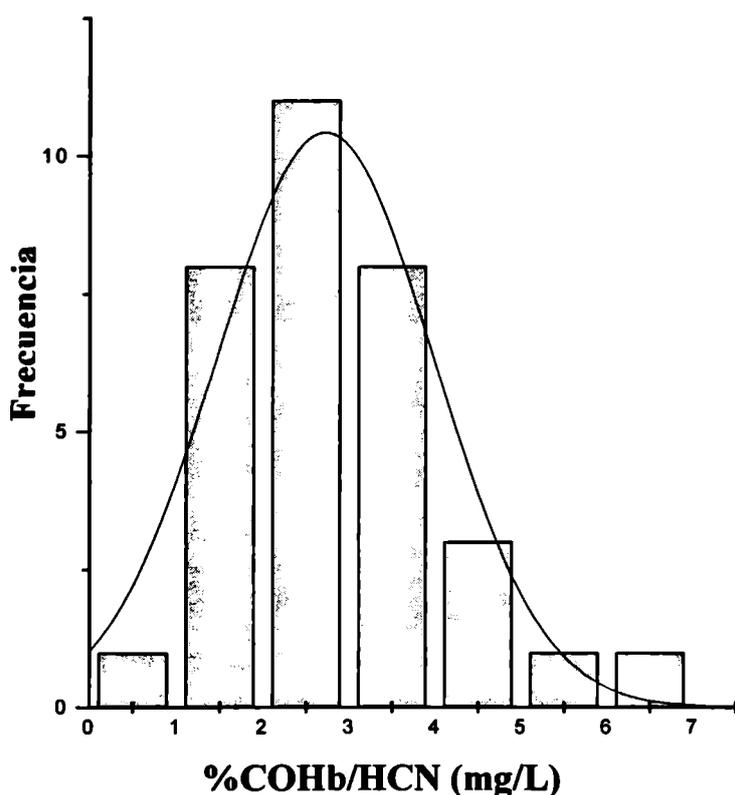


Figura 23 Histograma correspondiente a las relaciones de concentración de monóxido de carbono y ácido cianhídrico en las 35 víctimas fatales de ésta investigación.

Aunque el efecto letal del gas cianhídrico es bien conocido en el hombre, poca es la información disponible acerca del curso y severidad en la acción incapacitante para huida en situaciones de incendio, durante los estadios tempranos de la exposición.

Como fue dicho anteriormente, la descomposición térmica de productos complejos, cuya estructura varía considerablemente en diferentes condiciones de temperatura y oxigenación,

pueden influir notablemente en la composición de la atmósfera tóxica generada en el incendio. Esto obviamente, representa otra dificultad para predecir el efecto incapacitante de dicha atmósfera.

Para poder evaluar la contribución de cada tóxico y elucidar la posible causa de envenenamiento hemos definido dos diferentes índices de letalidad (IL):

$$IL_{CO} = \frac{(COHb) - x}{x} \quad (12)$$

Donde IL_{CO} es el índice de letalidad del CO.

Si IL_{CO} es igual a 0 entonces la concentración de COHb en la muestra es 50%, si damos a x el valor de 50%. Este último, es tomado como el guarismo a partir del cual, el efecto tóxico es determinante de la muerte, según informan la mayoría de los autores (Baselt, 2000; Moffat et al, 2004). Del mismo modo, si IL_{CO} es menor que 0, la concentración de COHb es menor al 50%; en tanto que si es mayor a 0, indicará un porcentaje de saturación mayor al 50%.

El segundo índice:

$$IL_{CN} = \frac{(HCN) - y}{y} \quad (13)$$

Siendo IL_{CN} el índice de letalidad para el HCN.

(HCN) es la concentración de gas cianhídrico en sangre e $y = 1$ mg/L. El guarismo escogido de 1 mg/L corresponde a los niveles a partir del cual se asocia con casos letales (Birky y Clarke, 1981; Rumack y Levejoy, 1991; Ferrari et al, 2001).

Cuando $IL_{CN} = 0$, el HCN en la muestra sanguínea es 1 mg/L.

De la misma manera, si IL_{CN} es mayor a 0 la concentración de HCN será mayor a 1 mg/L, mientras que si IL_{CN} es menor a 0 será la concentración menor a 1 mg/L.

Con los datos de concentraciones de CO (como COHb) y HCN de la Tabla 10 se obtienen los valores de ambos índices que se grafican en abscisas como IL_{CO} y en ordenadas como IL_{CN} .

Una vez obtenidos los índices para cada individuo fallecido en el presente caso estudiado, fueron ubicados en el esquema de la Figura 24. Asimismo, consideramos relevante incluir datos de otros casos consignados en la literatura (Repetto y Martinez, 1974; Zamecnik y Tam, 1987; Lundquist et al, 1989; Ishii et al, 1998). En la Figura 24 se muestran los datos de cada episodio publicado conjuntamente con los obtenidos en el presente estudio.

A partir de estas consideraciones, definimos cuatro zonas (I a IV) en la que el dato de abscisas corresponde a IL_{CO} y el de ordenadas IL_{CN} .

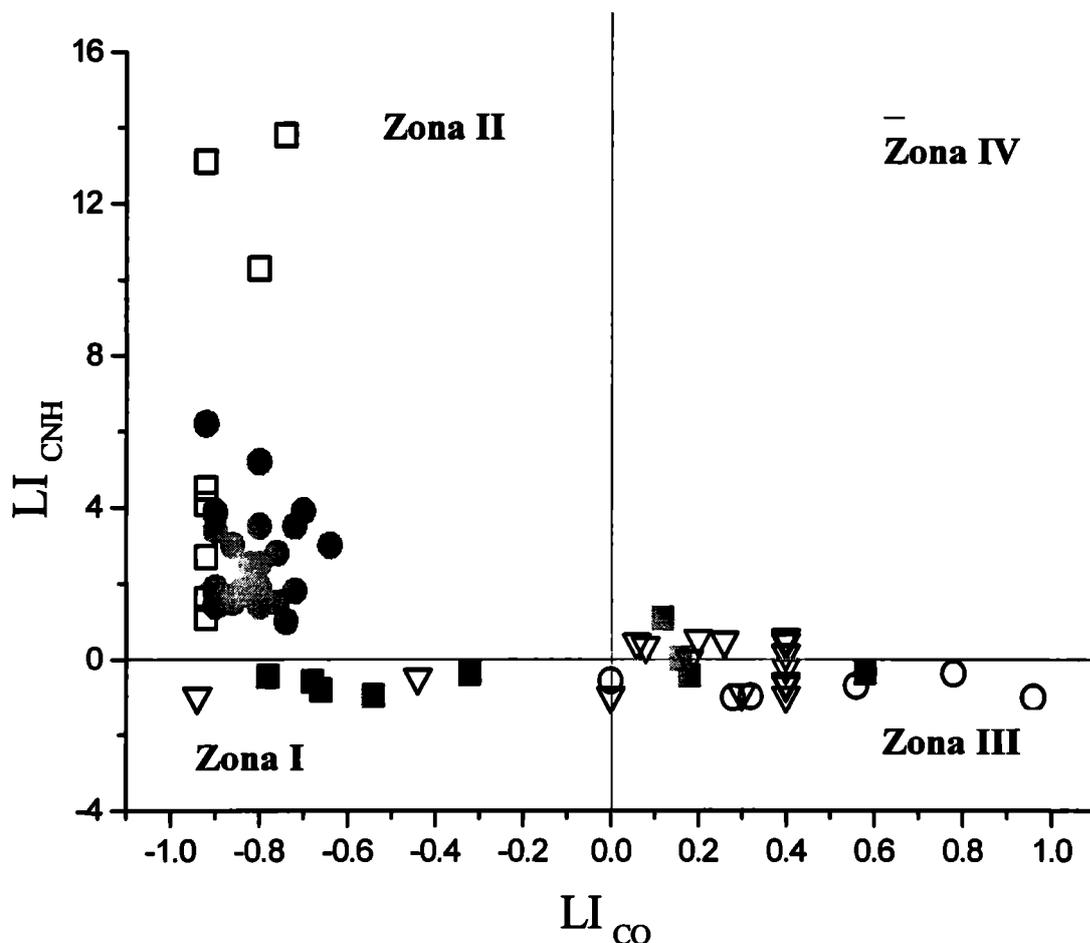


Figura 24. Esquema que muestra los índices de letalidad (IL) para datos de este trabajo y otros autores, ubicados en las zonas previas definidas. (●) trabajo presente (□) Zamecnik (1987); (○) Repetto (1974); (■) Ishii (1998); (▽) Lundquist (1989).

Puede observarse en el gráfico que la intersección de las líneas correspondientes a $IL_{CO} = 0$ y $IL_{CN} = 0$, delimitan cuatro regiones o zonas. Estas se definen según el siguiente atributo:

Zona I: Individuos con niveles subletales de COHb y HCN en sangre

Zona II: Individuos cuyo deceso se atribuye principalmente a la acción del HCN.

Zona III: Individuos cuyo deceso se atribuye principalmente a la acción del monóxido de carbono.

Zona IV: Individuos fallecidos en los que ambos gases serían responsables del deceso.

Nótese que estas regiones definidas nos permitirían inferir la composición de la atmósfera, mediante el conocimiento del contenido de cada tóxico en la sangre de las víctimas de

incendios de materiales plásticos nitrogenados, susceptibles de generar HCN y CO, más aún cuando la combustión y los efectos tóxicos se han desarrollado en forma rápida.

En el caso de nuestro estudio, con 35 víctimas fatales, las manifestaciones tóxicas se produjeron entre 3 a 5 minutos, tiempo coincidente con el inicio de liberación del HCN al alcanzar las temperaturas de ruptura del grupo CN del poliuretano a los dos o tres minutos, como se refirió precedentemente.

Por último, es muy importante realizar ensayos sobre muestras de materiales que han combustionado con el objeto de verificar la formación o no del HCN.

Conclusiones del capítulo

El CO tuvo en este episodio estudiado poca o ninguna influencia.

Los niveles de CO hallados en muestras refrigeradas y enviadas al laboratorio rápidamente resultaron ser muy bajos como para ejercer efecto tóxico.

Nuestro estudio permitió endilgar al HCN como agente responsable de las 35 muertes.

Si bien pudo detectarse otros productos de combustión, tal como el acetonitrilo, tampoco esto justificó la muerte de los 35 reclusos en tan solo 3 minutos aproximadamente.

Por último, estimamos que la disparidad de información que nos brindan las distintas contribuciones se debe principalmente a la temperatura generada en cada episodio y tipo de polímero que se quema, como así también la existencia o no de agentes retardantes de la combustión adicionados a los polímeros.

El tipo de índice propuesto nos permitió inferir el tipo de atmósfera tóxica generada y la incidencia contundente del HCN en la génesis de los óbitos, siendo útil también en otros casos de incendios descriptos en la bibliografía.

Es llamativo que en muchos de esos episodios no se indicaron determinaciones de HCN por lo que opinamos debería efectuarse de rutina en este contexto.

CAPITULO 9

ESTABILIDAD, PÉRDIDAS Y GENERACIÓN DE ALCOHOL ETÍLICO

9.1. Estudio del origen de las pérdidas y generación de alcohol etílico en muestras sanguíneas

Los trabajos sobre pérdidas de alcohol etílico por fenómenos putrefactivos son controvertidos. Algunos autores, entre otros el toxicólogo estadounidense Charles Winek, (1996) opinan que dichos fenómenos no influyen tanto como se creía dos décadas atrás. Sin embargo en nuestro medio Coloccia y Argeri (1969) publicaron una experiencia donde observaron pérdidas de alcohol a una tasa diaria del 6%, es decir con pérdidas totales a los quince o diecisiete días post toma de muestra. En la actualidad, un respetable número de publicaciones señalan que las pérdidas de etanol con el transcurrir de días, incluso semanas, no son relevantes, si las muestras son convenientemente extraídas y colocadas en recipientes adecuados y bien sellados. (Parsons, 2002; Sreerama y Hardin, 2003; Ferrari, 2004).

El uso de preservantes (como el fluoruro de sodio) en sangre de individuos vivos no mejora mucho los resultados, más aún si la muestra fue tomada con jeringa estéril y mantenida a bajas temperaturas. En estas condiciones la sangre de personas vivas puede analizarse aún después de dos semanas sin variaciones apreciables respecto de la alcoholemia que se hubiera obtenido en el primer día (Winek y Paul, 1989).

Winek (1996), efectuó estudios en muestras de sangre entera y suero que habían sido mantenidas por varias semanas a diferentes temperaturas, notando que las muestras resguardadas a temperatura más alta, mostraban pérdidas significativas a partir de treinta días y particularmente en las de sangre entera.

En el trabajo de Coloccia y Argeri, no se mencionan datos sobre estado del recipiente o muestra sanguínea en el momento de recepción y posterior resguardo (como ser existencia de cámara de aire).

Respecto a la producción de alcohol etílico post-mortem, O'Neal y Poklis (1996) notan que existen unas 58 especies de bacterias que son capaces de producir alcohol in vivo e in vitro. Si bien es cierto que la preservación de las muestras a temperaturas inferiores a los 4°C y la incorporación de fluoruro de sodio inhibe la producción de etanol de la mayoría de las bacterias no sucede así con *Cándida albicans*. Esta levadura ha demostrado ser una importante especie productora de alcohol (Blume y Lakatua, 1973).

Se han informado muchos productos volátiles producidos por fenómenos postmortales: n-propanol, butanol, feniletanol, etc (Mayes, 1988; Canfield, 1994; O'Neal y Poklis, 1996; Jones, 2004).

Un hecho relevante que surge del estudio bibliográfico y la experiencia a través de miles de análisis de alcoholemias practicadas, es que en la mayoría de los casos donde se atribuyó formación post-mortem de alcohol, raras veces superan concentraciones de 0.3 g/L. Esta circunstancia deja cierto margen de seguridad ante las discusiones sobre el grado de afectación en la conducta de individuos alcoholizados, más aún si los guarismos hallados en laboratorio superan 1.5 g/L.

Algunos autores han opinado que no deberían informarse alcoholemias postmortem inferiores a 0.3 g/L con el objeto de evitar conclusiones sujetas a discusiones controvertidas sobre el origen del etanol hallado (Levine et al, 1993; Leikin y Watson, 2003; Ferrari, 2004).

En éste sentido Levine et al (1993) sugirieron que en ausencia de información adicional, concentraciones de alcohol etílico en sangre entera de 0.4 g/L o más, probablemente provengan de un consumo de alcohol.

Recientemente Leikin y Watson (2003), consignaron que la producción de etanol a través de la fermentación, puede ocurrir sustancialmente en cuerpos descompuestos resultando niveles sanguíneos en el orden de 0.5 g/L. Por otro lado, Garriott (1996) informó que los procesos putrefactivos que generan etanol llevan entre 3 y 10 días en desarrollarse.

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

En nuestro medio, García Fernández et al (1994), efectuaron un estudio con 30 muestras de humor vítreo. En doce muestras se obtuvo una correlación de la concentración de etanol en ambos fluidos. La relación entre ambos especímenes osciló entre 0.7 - 0.95. La concentración mayor se encontró en humor vítreo. Una ventaja que posee esta matriz es ser bastante indemne a contaminación bacteriana o susceptible de transformaciones post-mortem que originarían productos complejos. Sin embargo, estudios más recientes (Honey et al, 2004), advierten que la relación puede invertirse, o sea cuando la concentración de etanol en sangre entera sea superior a la concentración en humor vítreo. Esto se manifiesta en casos que el óbito se produzca antes que el etanol ingresado al cuerpo alcance el equilibrio o que se compruebe que la formación de alcohol se debió a fenómenos microbiológicos o si el espécimen se contaminó durante el muestreo. Además, los autores informan que concentraciones de etanol superiores a 1g/L, generalmente poseen una relación estable para

humor vítreo/sangre de 1.16-1.19, mientras que para concentraciones menores la relación adolece de mayor variación. No obstante los autores advierten la prudencia en aplicar estos coeficientes en cada caso particular, aconsejando poner énfasis en el conocimiento de las circunstancias ante y postmortem que rodean el caso (Jones y Holmgren, 2001).

La implementación de métodos instrumentales de alta performance, permiten en la actualidad analizar con gran exactitud el contenido de alcohol etílico y discriminar sustancias reductoras u otros compuestos que interferían antiguamente con los métodos colorimétricos.

La metodología utilizada en los laboratorios de la Asesoría Pericial de Tribunales es la cromatografía gaseosa con detector FID (Ionización de llama) en la forma denominada espacio-cabeza o Headspace (Ramsay et al, 1982). Esta técnica sencilla y altamente reproducible puede aplicarse inclusive para el análisis de otros alcoholes, como metanol e inclusive, el metabolito de mayor relevancia toxicológica (ácido fórmico).

En cuanto a los nuevos aportes de la comunidad científica internacional relacionados a sustancias producidas en baja concentración y que podrían ser utilizadas, eventualmente como biomarcadores de ingesta aguda o crónica, ha sido posible verificar que una pequeña fracción del etanol consumido (<0.1%) sufre reacciones de conjugación de Fase II, mediante el ácido glucurónico activado, catalizadas por UDP-glucuroniltransferasa unida a la membrana mitocondrial, para producir etilglucurónido (EtG), hallados en niveles similares al acetaldehído en orina y sangre de pacientes alcoholizados (Shmitt et al, 1997; Baselt, 2000; Feldman et al, 2004).

El EtG es producido en un 0.02-0.06% aproximadamente de la dosis ingerida. Este compuesto es estable, soluble en agua, pudiendo ser detectado en orina hasta tres días posteriores al consumo de bebida alcohólica, con la importante implicancia que ello adquiere en el ámbito jurídico. Recordemos que el alcohol etílico solo puede ser detectado en sangre hasta las 12-16 horas posterior a la última libación.

Asimismo el EtG podría ser utilizado, como marcador para monitoreo de abstinencia en pacientes que efectúan programas de rehabilitación alcohólica.

Respecto de su investigación analítica, las técnicas publicadas hasta la fecha no consignan pre-tratamientos extractivos en orina, estableciéndose un valor de corte de 0.1 µg/ml.

Una publicación reciente informó sobre el hallazgo de etilsulfato (EtS), propuesto como nuevo biomarcador para ingestas agudas de etanol (Helander y Beck, 2004).

Aproximadamente pasada una hora desde la ingesta se detecta el EtS, obteniéndose un máximo a las 4 hs, permaneciendo detectable hasta las 29 horas. Resulta entonces un buen

marcador en casos donde se desea confirmar consumos recientes como en los controles de conductores de vehículos con sospecha de encontrarse bajo los efectos del alcohol y en los lugares de trabajo, para aquellos operarios que conducen vehículos o maquinarias o bien para determinar si el alcohol etílico analizado en etapa postmortem provino de una incorporación activa o fue producido por microorganismos, posterior a la toma de muestra.

Para ilustrar estas últimas consideraciones resulta interesante consignar la contribución de Schmitt et al (1997) donde se estudió el caso de un individuo que conducía un vehículo y sufrió un severo accidente produciendo la muerte de uno de los ocupantes. Tres horas y media posteriores al hecho se le extrajo sangre y se determinó una alcoholemia de 1.44 g/L, dejando este guarismo la convicción de que el conductor del vehículo público se hallaba bajo los efectos del alcohol con la consecuente negligencia imputada. Sin embargo, el análisis de EtG arrojó resultados negativos. Los autores cuestionaron entonces el *modus operandi* de la toma de muestra poniendo en entredicho la posibilidad de una contaminación con un desinfectante conteniendo alcohol etílico, utilizado en el proceso de extracción de la muestra hemática.

Posteriores estudios en la misma persona demostraron que a concentraciones de etanol en sangre menores al valor indicado, se formaba EtG en su organismo. Asimismo pudo demostrarse que el resguardo de la muestra sanguínea durante un largo período (más de un año) permitía la detección del EtG, de lo que se dedujo que el EtG en suero, es bastante estable resguardado a temperaturas de congelación.

Atento lo expresado precedentemente podemos percibir que la pérdida y generación de alcohol posteriores al óbito y a la toma de muestra pueden inducir a conclusiones erróneas en los casos forenses analizados. Por ello resultó muy interesante para nosotros proponernos el objetivo de estudiar en forma un tanto más minuciosa los factores que operan en la pérdida de alcohol y proponer un modelo de cinética de pérdida con fines retrospectivos. Este último aspecto, hasta hoy no ha sido registrado en la literatura universal.

A continuación mostramos los resultados a los que hemos arribado luego de aplicar las técnicas y/o ensayos descriptos en la sección respectiva en este trabajo.

En la sección 7.8.2 de Materiales y Métodos se describe el diseño experimental de los ensayos a efectos de estudiar la variación de alcoholemia en muestras de sangre sometidas a diversas condiciones de preservación (temperatura, presencia de cámara de aires en el recipiente y tiempo).

La Tabla 11 presenta las variaciones de alcohol etílico durante el almacenamiento a diferentes temperaturas en muestras de sangre sin preservador provenientes de individuos muertos con diferentes grados de alcoholemia inicial. En la Tabla figura también la relación de putrefacción (R) respecto del estándar interno para cada muestra.

Tabla 11 Concentración de alcohol etílico (g/L) y relación entre productos de putrefacción y estándar interno en sangres enteras almacenadas en distintas condiciones de temperatura y con % variables de cámara de aire (CA).

M	CA %	Ai	3d 25°C	3d 4°C	3d -10°	7d 25°C	7d 4°C	7d -10°C	15d 25°C	15d 4°C	15d -10°C	30d 25°C	30d 4°C	30d -10°C
4513	0	2.75	2.60	2.72	2.74	2.58	Nd	2.52	2.46	Nd	2.65	Nd	Nd	2.55
R			5.11	5.36	5.06	5.20	Nd	5.40	4.87	Nd	5.35	Nd	Nd	5.20
8131	5	2.74	2.67	2.67	2.50	2.33	Nd	2.40	2.39	2.30	2.15	2.39	2.33	2.25
R			1.48	1.50	1.65	1.80	Nd	1.50	2.46	1.75	1.60	2.91	2.12	1.60
4161	20	4.30	4.45	4.30	4.10	3.90	3.80	3.97	3.98	Nd	3.56	Nd	Nd	3.50
R			---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
4416	35	1.92	1.03	1.47	1.70	0.90	1.44	1.60	1.27	Nd	1.52	Nd	Nd	1.45
R			2.79	2.26	2.08	2.83	2.11	2.15	2.59	Nd	2.28	Nd	Nd	2.20
3758	65	2.72	0.61	0.5	Nd	0	0	0	0	0	Nd	0	0	Nd
R			---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

M: muestra; CA%: Cámara de aire en % del volumen del recipiente donde se halla contenida la muestra; Ai: Alcoholemia inicial; 3d: alcoholemia a los 3 días de la determinación inicial; 7d: ídem a los 7 días; 15d: ide. a los 15 días; 30d: ídem a los 30 días; 25°C; 4°C y -10°C son las temperatura de resguardo luego de la primera determinación.

R: Relación de áreas entre la señal previa al estándar interno (amina de putrefacción) y estándar interno: isopropanol.

Nd: Dato no disponible, debido a la carencia de muestra para plantear el presente modelo basado en muestras reales, sin contaminar.

indica inexistencia de señales de putrefacción y por ende carece de sentido efectuar la relación de áreas señalada.

9.2. Cinética de decaimiento de la concentración de etanol

En la Figura 25 a, b y c se presenta el decaimiento de la concentración de etanol en sangre en función del tiempo en las distintas condiciones ensayadas que involucran la presencia de diferentes porcentajes de cámara de aire en el envase durante el almacenamiento a 25°, 4° y -10°C respectivamente (datos de Tabla 12).

Como puede observarse, la velocidad de decaimiento del etanol aumenta en función del incremento del porcentaje de %CA y de la temperatura.

Con el objeto de modelar el decaimiento del etanol en función del tiempo, se ensayaron varias cinéticas siendo la de primer orden la que presentó el mejor ajuste:

$$\frac{dC}{dt} = -k_0 \cdot C \quad (14)$$

Integrando: $\int dC/C = \int -k_0 dt$

$$\ln \frac{C}{C_0} = -k_0 \cdot t \quad (15)$$

Donde k_0 = constante aparente de decaimiento de primer orden (1/día); C = concentración de etanol a tiempo t ; C_0 es la concentración inicial de etanol (g/L); t = tiempo (días).

Mediante la representación de $\ln C/C_0$ en función de t se calculó el valor de k_0 mediante regresión lineal empleando el programa Sigma Plot. Un buen ajuste de los datos experimentales se logró con la cinética propuesta. La Tabla 12 presenta los valores de k_0 y los coeficientes de determinación encontrados. Puede deducirse de la tabla que los valores de k_0 resultan ser cada vez mayores según se aumente el contenido de %CA en el recipiente

Asimismo, el valor de k_0 también resulta ser afectado por la temperatura; así, para 25°C la degradación ocurre con mayor rapidez dado por los mayores valores de k_0 obtenidos. En la Figura 25 se observa que con 65% de cámara de aire solo dos valores pudieron ser determinados, dado que la disminución del contenido de etanol es tan rápida que a los 7 días ya no se detectaba etanol en las muestras, a las tres temperaturas ensayadas.

Con el objeto de evaluar el efecto del %CA sobre k_0 se propuso la siguiente ecuación:

$$k_0 = c \cdot \exp(-k \cdot \%CA) \quad (16)$$

Donde k = constante verdadera de decaimiento de primer orden, c = constante empírica, %CA= porcentaje de cámara de aire en el envase.

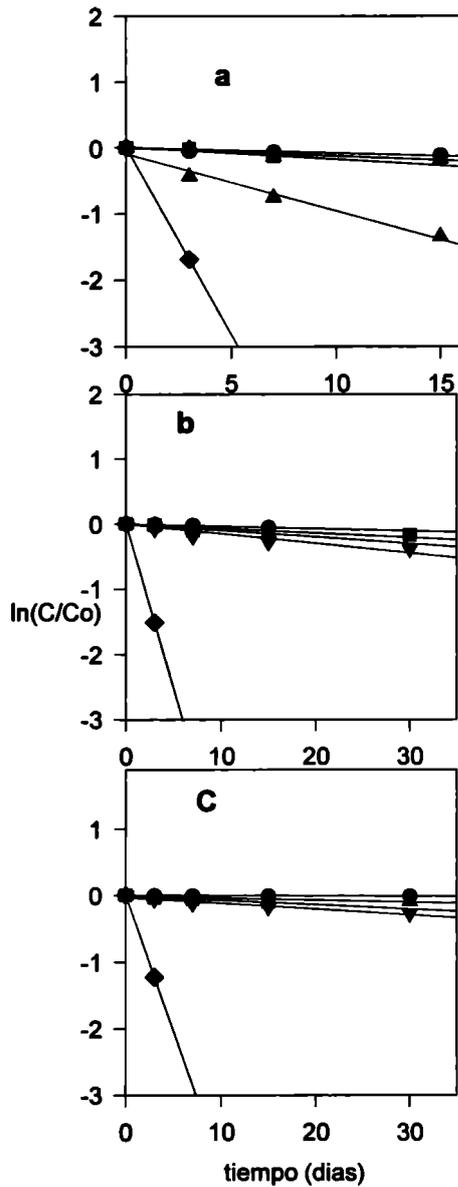


Figura 25. Cinética de decaimiento del etanol en muestras de sangre a) 25 °C, b) 4 °C y c) -10 °C, ● 0%CA, ■ 5%CA, ▲ 20%CA, ▲ 35%CA, ◆ 65%CA..

La Figura 26 presenta la variación de k_0 en función del %CA, observándose que al aumentar %CA los valores de k_0 disminuyen exponencialmente presentando un buen ajuste experimental a la ecuación propuesta ($R^2 = 0.99$ a las tres temperaturas).

Tabla 12. Parámetros obtenidos del ajuste de la cinética de primer orden a los datos experimentales. R^2 : coeficiente de determinación.

Temperatura (°C)	%CA	ln C/Co (g/L)	Ko (1/días)	R^2
25	0	$-1.62 \cdot 10^{-2} \pm 1.30 \cdot 10^{-2}$	$-6.72 \cdot 10^{-3} \pm 1.64 \cdot 10^{-3}$	0.91
	5	$-1.30 \cdot 10^{-2} \pm 2.40 \cdot 10^{-3}$	$-1.40 \cdot 10^{-2} \pm 5.66 \cdot 10^{-3}$	0.92
	20	$-4.38 \cdot 10^{-2} \pm 3.30 \cdot 10^{-3}$	$-1.30 \cdot 10^{-2} \pm 4.01 \cdot 10^{-3}$	0.83
	35	$-9.64 \cdot 10^{-2} \pm 1.10 \cdot 10^{-2}$	$-8.6 \cdot 10^{-2} \pm 9.17 \cdot 10^{-3}$	0.98
	65	0	$-5.63 \cdot 10^{-1}$	0.99
4	0	$1.85 \cdot 10^{-4} \pm 1.75 \cdot 10^{-4}$	$-3.74 \cdot 10^{-3} \pm 2.64 \cdot 10^{-5}$	0.99
	5	$2.67 \cdot 10^{-2} \pm 2.56 \cdot 10^{-2}$	$-5.76 \cdot 10^{-3} \pm 1.66 \cdot 10^{-3}$	0.80
	20	$2.21 \cdot 10^{-3} \pm 3.28 \cdot 10^{-3}$	$-1.01 \cdot 10^{-2} \pm 2.94 \cdot 10^{-4}$	0.99
	35	$-5.56 \cdot 10^{-2} \pm 3.30 \cdot 10^{-2}$	$-1.40 \cdot 10^{-2} \pm 2.24 \cdot 10^{-3}$	0.90
	65	0	$-5.03 \cdot 10^{-1}$	0.99
-10	0	$-2.74 \cdot 10^{-2} \pm 1.36 \cdot 10^{-3}$	$-4.56 \cdot 10^{-4} \pm 8.84 \cdot 10^{-5}$	0.90
	5	$1.08 \cdot 10^{-2} \pm 8.30 \cdot 10^{-3}$	$-6.59 \cdot 10^{-3} \pm 1.04 \cdot 10^{-3}$	0.95
	20	$-1.37 \cdot 10^{-2} \pm 7.66 \cdot 10^{-3}$	$-3.00 \cdot 10^{-3} \pm 4.98 \cdot 10^{-4}$	0.92
	35	$-3.35 \cdot 10^{-2} \pm 1.08 \cdot 10^{-2}$	$-1.00 \cdot 10^{-2} \pm 1.14 \cdot 10^{-3}$	0.95
	65	0	$-4.10 \cdot 10^{-1}$	0.99

Se observa que el parámetro k_0 varía marcadamente con la variación del %CA en el envase, modificándose substancialmente en los casos que el %CA aumenta de 35% a 65% para cada temperatura estudiada.

La Tabla 13 presenta los valores de los parámetros de la ecuación (16) obtenidos mediante un ajuste no lineal empleando en programa Sigma Plot.

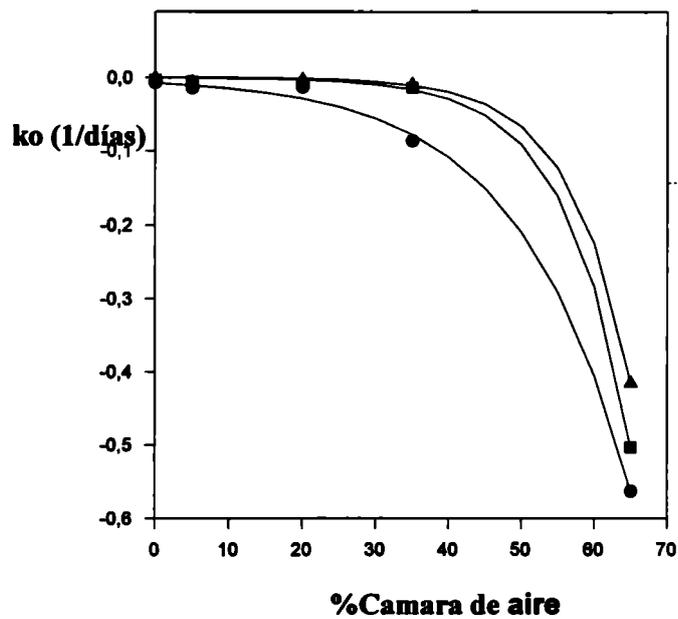


Figura 26. Efecto del contenido de la cámara de aire en el recipiente sobre los valores de k_0 (constante de decaimiento del etanol) ● 25°C, ▲ 4°C y ■ -10°C.

Tabla 13. Parámetros del ajuste de la ecuación (15) a los datos experimentales.

Temperatura	c (1/días)	k (%CA.1/días)	R ²
25°C	$-7.79 \cdot 10^{-3} \pm 1.80 \cdot 10^{-3}$	$-6.59 \cdot 10^{-2} \pm 3.80 \cdot 10^{-3}$	0.99
4°C	$-3.03 \cdot 10^{-4} \pm 2.18 \cdot 10^{-4}$	$-1.14 \cdot 10^{-1} \pm 1.10 \cdot 10^{-1}$	0.99
-10°C	$-1.48 \cdot 10^{-4} \pm 1.09 \cdot 10^{-4}$	$-1.20 \cdot 10^{-1} \pm 1.31 \cdot 10^{-2}$	0.99

Asimismo se estudio la variación del valor de k_0 con la temperatura. El gráfico de variación del valor de k_0 con la temperatura se presenta en la Figura 27. Pudo observarse una variación lineal entre k_0 y la temperatura.

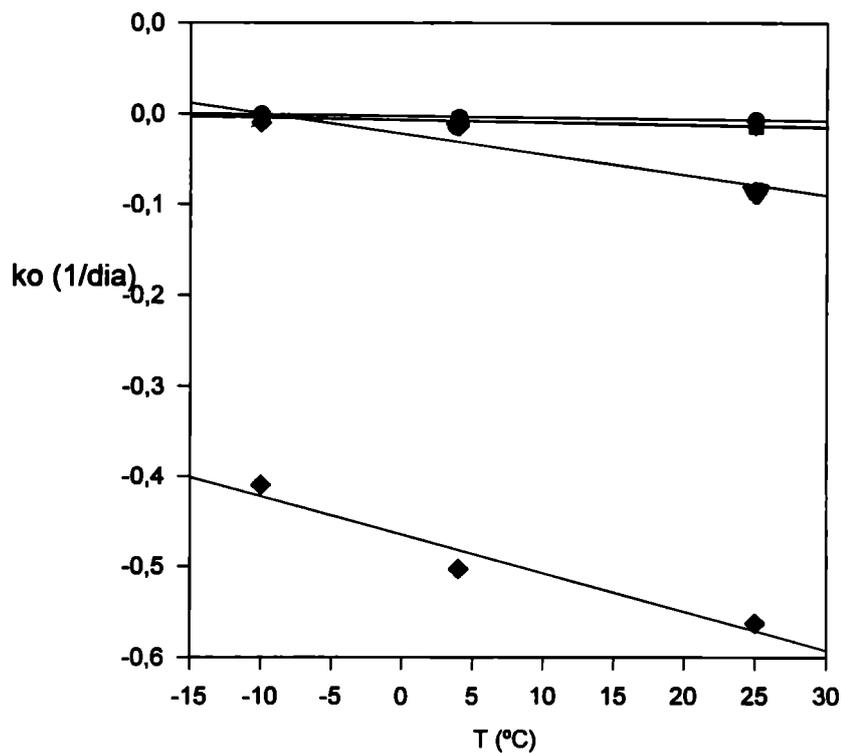


Figura 27: Efecto de la temperatura de almacenamiento sobre los valores de k_o (constante de decaimiento del etanol) ●0%CA, ■ 5%CA, ▲20%CA, ▼35%CA, ◆65%CA.

Se propone una ecuación lineal para estudiar dicha dependencia:

$$k_o = a - b.T \quad (17)$$

donde a y b son constantes

La Tabla 14 presenta los valores de los parámetros para esta dependencia:

Tabla 14: Parámetros del ajuste de la ecuación (16) a los valores de k_o .

%CA	a	b	R ²
0	$-2.52 \cdot 10^{-3} \pm 1.40 \cdot 10^{-3}$	$1.76 \cdot 10^{-2} \pm 3.40 \cdot 10^{-3}$	0.90
5	$-6.83 \cdot 10^{-3} \pm 1.63 \cdot 10^{-3}$	$2.52 \cdot 10^{-4} \pm 1.04 \cdot 10^{-4}$	0.85
20	$-6.90 \cdot 10^{-3} \pm 1.52 \cdot 10^{-3}$	$2.74 \cdot 10^{-4} \pm 1.00 \cdot 10^{-4}$	0.88
35	$-2.29 \cdot 10^{-2} \pm 1.35 \cdot 10^{-2}$	$2.23 \cdot 10^{-3} \pm 8.59 \cdot 10^{-4}$	0.87
65	$-4.65 \cdot 10^{-1} \pm 1.62 \cdot 10^{-3}$	$4.25 \cdot 10^{-3} \pm 1.00 \cdot 10^{-3}$	0.94

9.2.1 Predicción del tiempo necesario para la reducción de la concentración de etanol a la mitad de la inicial

Los gráficos de contorno son útiles para predecir la variación de diversos parámetros frente a diferentes variables, en este caso, predecir la concentración de etanol en las muestras en las diferentes condiciones de preservación (temperatura y cámara de aire).

En el presente trabajo, se construyeron los gráficos de contorno con los valores encontrados de a y b (ecuación 17) que contempla el efecto de la temperatura sobre los valores de k_0 .

En el intervalo de temperaturas estudiado (-10°C , 4°C y 25°C), se construyó un gráfico de contorno que permitió predecir a las diferentes temperaturas y en el rango de %CA investigado (0-65%), el tiempo necesario para que la concentración de etanol decaiga a la mitad del valor inicial. Se tomó el valor de decaimiento a la mitad en forma arbitraria, pudiendo construirse fácilmente gráficos de contorno proponiendo otros valores de disminución de etanol dado que se cuenta con los valores de k_0 ajustados para cada caso. La Fig. 28 presenta gráficos de contorno para esa condición.

Puede observarse del gráfico que la dependencia de la variación de alcohol en la muestra es fuertemente dependiente del contenido de cámara de aire presente en el envase.

Los gráficos de contorno correspondientes a 5%CA y 20%CA se superponen, indicando que no existen diferencias en las pérdidas de etanol en esos dos contenidos de cámara de aire. Con 0%CA es posible conservar las muestras por tiempos prolongados (más de 100 días) en el rango de temperaturas estudiado. Así, para el almacenamiento a -10°C la concentración de alcohol disminuye a la mitad a los 909 días, mientras que a 25°C esa disminución de etanol en la muestra se logró a los 100 días. Sin embargo, con 35% de CA en el envase la concentración de etanol en la muestra disminuye a la mitad a los 21 días a 4°C y solo 9 días a 25°C . La peor condición se obtiene con 65%CA en el cual la concentración de etanol en la muestra cae a la mitad en solo 1.2 días a 25°C y 1.6 días a -10°C indicando poco efecto de la temperatura.

Esto señala la importancia del resguardo de la muestra en adecuadas condiciones principalmente en cuanto a la presencia de cámara de aire en el envase que según se ha demostrado presenta la mayor influencia sobre las pérdidas de alcohol en sangre.

Es interesante resaltar que este modelo teórico propuesto en base a los resultados obtenidos se corresponden muy bien con las investigaciones de Winek et al (1996), que reportaron pérdidas promedios de 15% de etanol en muestras de sangre entera resguardadas a temperaturas superiores a los 26°C durante 35 días. Este autor, no informa el % de cámara de

aire en el recipiente (confróntese con nuestro estudio cinético que mostró una disminución a la mitad de concentración de etanol en 100 días a 25°C y 5% CA).

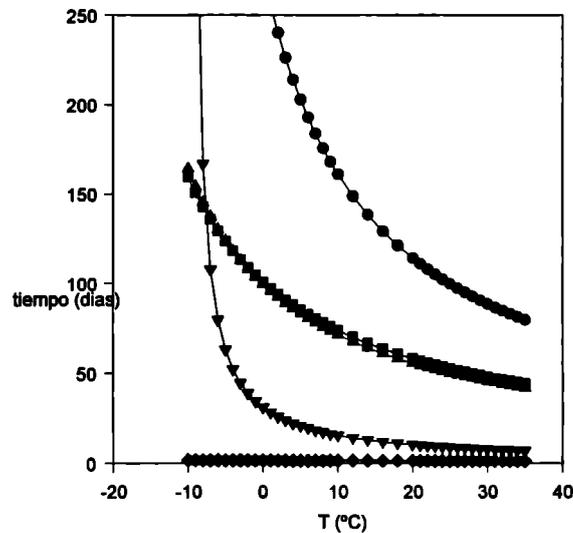


Figura.28: Gráfico de contorno que permite predecir el tiempo necesario para que la concentración de etanol caiga a la mitad del valor inicial en las diferentes condiciones estudiadas. ● 0%CA, ■ 5%CA, ▲ 20%CA, ▼ 35%CA, ◆ 65%CA.

9.3 Cálculo de la energía de activación

La variación de la constante cinética (k_0) con la temperatura es conocido que sigue generalmente una variación tipo Arrhenius.

$$k_0 = A \cdot \exp\left(-\frac{EA}{RT}\right) \quad (18)$$

Donde T es la temperatura en °K, EA es la energía de activación (KJoule/mol).

“A” es un factor preexponencial y R es la constante de los gases 8.31 (KJoule/°K mol).

Aplicando logaritmos se obtiene:

$$\ln(k_0) = \ln A - \frac{EA}{RT} \quad (19)$$

Representando $\ln(k_0)$ en función de $1/T$ es posible calcular la EA de la pendiente del gráfico correspondiente.

La Figura 29 muestra las regresiones de Arrhenius para los diferentes porcentajes de cámara de aire presente en el recipiente. Los valores de las EA y los coeficientes de regresión se

presentan en la Tabla 15. La energía de activación (EA) puede ser considerada como la sensibilidad que presenta la constante de decaimiento de la concentración de etanol (k_0) frente a los cambios térmicos.

Tabla 15 Aplicación de la ecuación de Arrhenius para evaluar el efecto de la temperatura sobre la velocidad de decaimiento de etanol (k_0) a diferentes niveles de %CA.

%CA	$\ln A$ (ln(/1día)	EA (KJoule/mol) 10^3	R^2
0	14.70	47.86	0.84
5	1.58	14.79	0.70
20	6.43	26.26	0.81
35	13.95	40.96	0.91
65	1.94	6.15	0.92

Puede observarse que los valores de la EA en la cinética estudiada resulta ser afectada por el contenido de cámara de aire en el envase. Los menores valores de EA se obtuvieron para el caso del mayor contenido de %CA indicando la menor sensibilidad a los cambios térmicos, sugiriendo que en esas condiciones los valores de (k_0) se ven modificados predominantemente por el contenido de cámara de aire en el envase. Para el caso de 0%CA, condición que presenta la mayor EA, se observa una mayor influencia de la temperatura sobre el valor de (k_0) sugiriendo que el valor de (k_0) se ve predominantemente modificado por la temperatura. Entre 5 y 35%CA la EA varió entre 26.26 y 36.28 10^3 KJoule/mol, donde posiblemente se presentan interacciones de ambos efectos combinados, incidiendo directamente sobre el valor de (k_0).

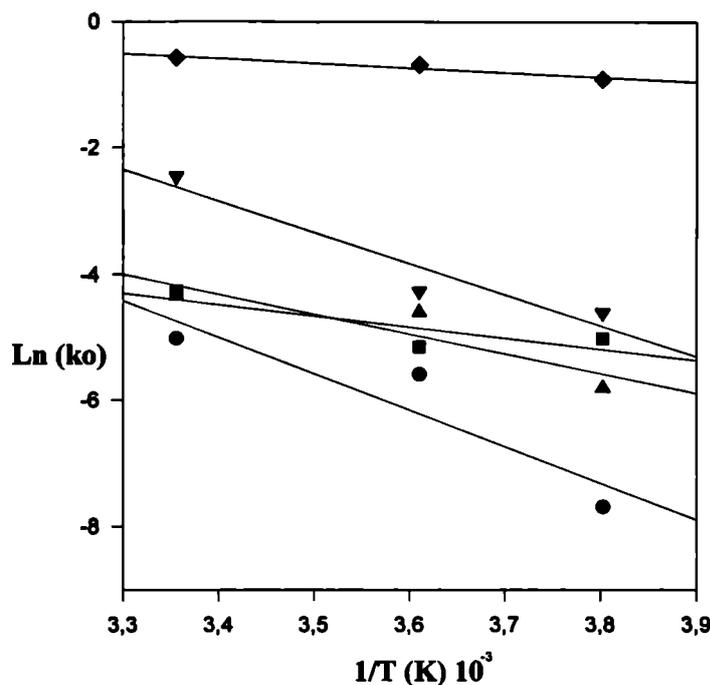


Figura 29 Dependencia de la constante de decaimiento del etanol en función de la temperatura

● 0%CA, ■ 5%CA, ▲ 20%CA, ▼ 35%CA, ◆ 65%CA.

9.4. Estudio de relación de áreas entre la señal previa al estándar interno (amina de putrefacción) y estándar interno: isopropanol (R).

Se estudió la relación R: relación de áreas entre la señal previa al estándar interno (amina de putrefacción) y el estándar interno: Isopropanol, en función del tiempo a las diferentes condiciones estudiadas: 3 temperaturas (25, 4 y -10°C) y %CA (0, 5 y 35%CA) (Fig. 30). Para los casos de 20% y 65% de CA no se presentaron señales de putrefacción y por ende carece de sentido efectuar la relación de áreas señalada. Con 5% y 20% de CA se observa una disminución en los valores de R a la mitad del observado con 0%CA. Asimismo, no se registra variación significativa de R para cada temperatura estudiada con el tiempo de almacenamiento. Lo anterior sugeriría que deben realizarse estudios más profundos a efectos de analizar con mayor detalle el tipo de amina producida en cada caso y si existen relaciones que pudieran predecir la pérdida o generación de etanol a través del tiempo y en diversas condiciones de preservación.

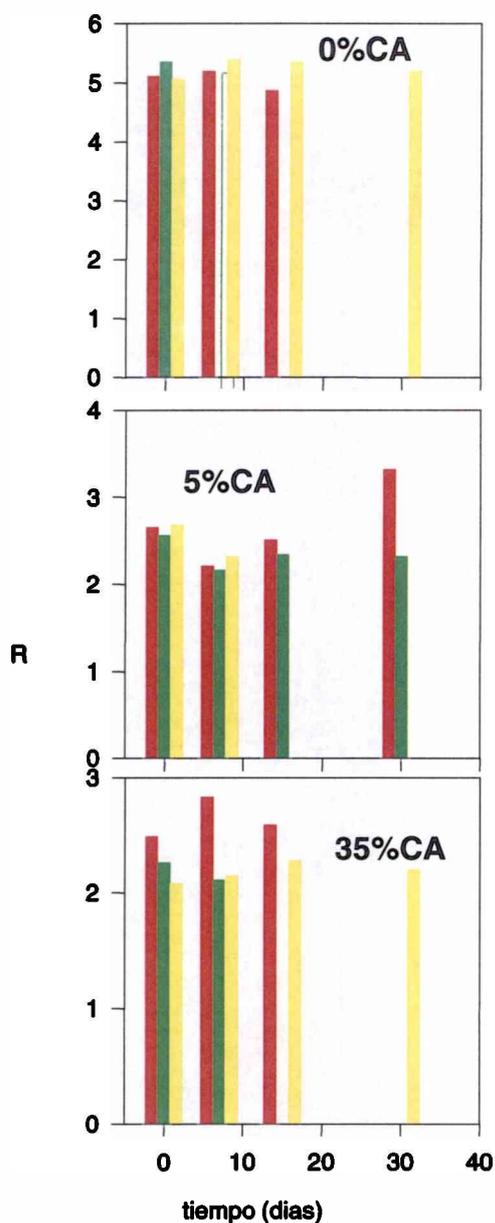


Figura 30 Relación de áreas entre la señal previa al estándar interno (amina de putrefacción) y estándar interno: Isopropanol (R) en función del tiempo a las diferentes condiciones estudiadas 25°C, 4°C y -10°C.

9. 5. Estudio de la variación de etanol agregado a muestras de sangre entera bajo diferentes condiciones de preservación.

En esta sección se estudió el efecto del agregado de 5% NaF (conservador) sobre la cinética de degradación del etanol el cual fue agregado a muestras de sangre exentas de etanol, en

concentraciones conocidas (0, 0.84, 1.64, 2.70 y 3.60 g/L). Se estudió el efecto que presenta el agregado de 5% de preservador (NaF) y presencia o no de cámara de aire en un 5% sobre los valores de alcohol agregado. Se estudiaron las cinéticas de degradación del etanol a tres temperaturas (20°C, 4°C y -10°C). En la Tabla 9 de la sección Materiales y Métodos se presentan las condiciones ensayadas. La Tabla 16 presenta los resultados hallados de alcohol en las muestras durante el almacenamiento a las diferentes condiciones ensayadas.

Tabla 16 Concentración de etanol (g/L) en sangre contaminadas con diferentes concentraciones de alcohol y almacenadas en distintas condiciones de temperatura y con % variables de cámara de aire (CA).

M	%CA	Ai	3d 25°C	3d 4°C	3d -10°	7d 25°C	7d 4°C	7d -10°C	15d 25°C	15d 4°C	15d -10°C	30d 25°C	30d 4°C	30d -10°C
1	5	0.84	0.75	0.82	0.82	0.80	0.80	0.82	0.73	0.83	0.82	0.75	0.80	0.79
2	5	1.64	1.66	1.61	1.62	1.87	1.76	1.70	2,05	1.88	1.71	1.83	1.81	1.74
3	5	2.70	2.77	2.60	2.70	2.77	2.73	2.70	2.68	2.77	2.70	2.65	2.80	2.70
4	5	3.56	3.58	3.80	3.70	3.86	3.67	3.72	3.75	3.86	3.76	3.42	3.54	3.76
5	5	0	0.06	0.04	0.02	0.12	0.05	0.02	0.14	0.03	0.01	0.13	0.02	0.02

Se eligió sangre entera por ser ésta la muestra más habitual recibida en el laboratorio forense (más del 95%).

La Fig. 31 presenta los datos correspondiente al caso de muestras sin agregado de alcohol (control) y que fuera almacenado con 5% CA y a 25, 4 y -10°C (muestra 5, Tabla 16).

Puede observarse que en esas condiciones se produce un aumento en la concentración de alcohol posiblemente debido a reacciones enzimáticas, siendo más notorio a 25°C. Sin embargo, estas variaciones en la concentración de alcohol están dentro del error aceptado por esta metodología, que es del 5%. El máximo de producción de alcohol fue de 0.14 g/L a 25°C, mientras que menor producción (0.05 y 0.02 g/L) se obtuvo a 4°C y -10°C respectivamente.

Se estudió la variación de etanol agregado a muestras de sangre entera y almacenada a diferentes temperaturas. La Fig.32 indica la variación de diversas concentraciones de etanol agregado en función del tiempo, a las tres temperaturas estudiadas y con agregado de NaF y 5%CA (muestras 1, 2, 3 y 4). Puede observarse que se presentan mayores variaciones en las concentraciones de alcohol a 25°C entre -0.14 y 0.20 en $\ln (C/Co)$. Asimismo, el almacenamiento a 4°C y -10°C presentó menores variaciones de $\ln (C/Co)$ que oscilaron entre -0.14 y 0.13 a 4°C y entre -0.06 y 0.05 a -10°C.

Los valores de k_0 obtenidos por regresión lineal aplicando la ec. 15 variaron entre 4.07×10^{-3} a 1.59×10^{-3} 1/día para las diferentes concentraciones de etanol agregadas a las muestras

almacenadas a 25°C. Estos valores resultan estar dentro del rango de variación del método, no resultando ser significativamente diferentes ($p < 0.05$) al valor de k_0 calculado para el caso de las muestras con alcoholemias naturales mantenidas a 25°C y con 5%CA pero sin agregado de NaF ($-1.40 \times 10^{-2} \pm 5.66 \times 10^{-3}$, Tabla 13).

Lo expuesto precedentemente indica que el agregado de NaF a las muestras permite una menor degradación del etanol y con ello, mejor conservación de la muestra en esas condiciones.

De igual manera a 4°C los valores de k_0 calculados para las muestras con NaF, variaron entre 3.95×10^{-3} y -7.38×10^{-3} 1/días, no siendo diferente al valor de k_0 calculado para el caso de muestras que no contenían NaF ($-5.76 \times 10^{-3} \pm 1.66 \times 10^{-3}$, Tabla 13).

A -10°C los valores de k_0 para las muestras con NaF variaron entre 3.11×10^{-4} y -3.58×10^{-3} 1/días, no resultando ser significativamente diferentes ($p < 0.05$) al valor de k_0 calculado para muestras que no contenían NaF ($-6.59 \times 10^{-3} \pm 1.04 \times 10^{-3}$, Tabla 13).

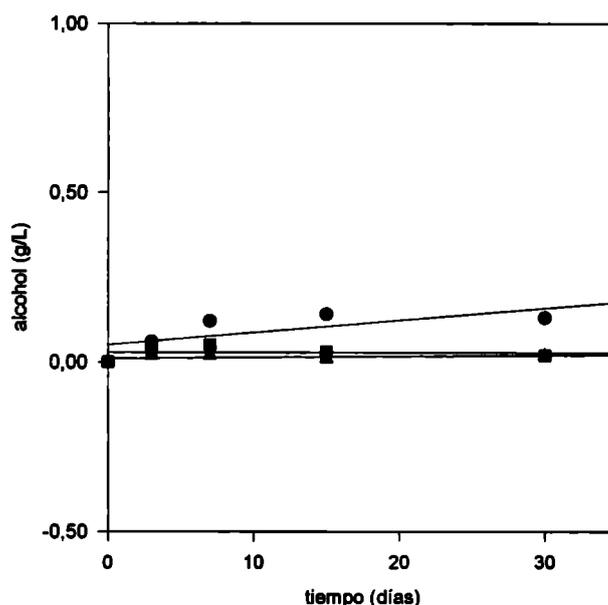


Figura 31: Efecto del almacenamiento a diferentes temperaturas sobre muestras de sangre entera sin agregado de alcohol y con 5% de NaF y 5%CA. ●25°C, ■4°C, ▲ -10°C

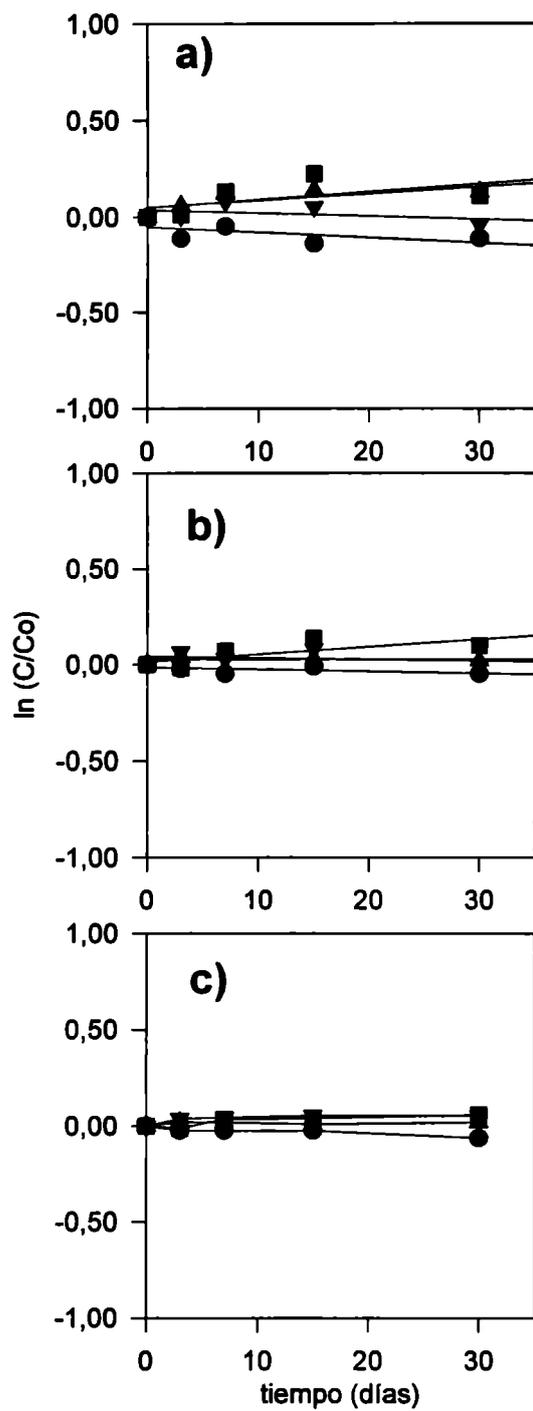


Figura 32. Variación en la concentración de alcohol agregado a muestras de sangre entera con NaF y 5%CA. a) 25°C, b) 4°C y c) -10°C. Concentración inicial: ● 0.84 g/L, ■ 1.64 g/L, ▲ 2.70 g/L y ▼ 3.56 g/L

Conclusión del capítulo

1. La cámara de aire en las muestras sanguíneas remitidas para estudio de etanol se constituye en el factor más importante de pérdida del alcohol.
2. La descomposición de sustancias orgánicas complejas ejerce poca influencia en las pérdidas o generación de alcohol.
3. La preservación de la sangre a bajas temperaturas, adicionada de NaF y con 5% de cámara de aire ofrece muy buenas posibilidades en cuanto a que el resultado sea aceptablemente repetitivo en el tiempo y por lo menos 30 días posteriores a la toma de muestra.
4. El modelo cinético elaborado en base a los resultados obtenidos en este estudio se adapta en forma aceptable a lo consignado por otros autores para la estimación de pérdidas, especialmente para los datos de pérdida de etanol en muestras con poca cámara de aire o sin ella.
5. La cinética de pérdida de etanol es de primer orden y el análisis de la Energía de activación evaluada mediante la ecuación de Arrhenius permitió establecer la mayor influencia de la temperatura en la constante k_0 en muestras sin cámara de aire.

CAPITULO 10

DISTRIBUCIÓN Y ESTABILIDAD DEL METANOL Y EL ÁCIDO FÓRMICO EN INTOXICACIONES METÁLICAS. PROPUESTA DE UN ÍNDICE A TRAVÉS DE RELACIONES DE CONCENTRACIÓN DEL ANALITO ENTRE ÓRGANOS PARA INFERIR LA CERTEZA O NO DE INTOXICACIÓN A PARTIR DE DATOS POST MORTEM.

Como fuera descrito en el capítulo 7, la intoxicación masiva puso de manifiesto que el conocimiento sobre el metabolismo, distribución y estabilidad del metanol son aún hoy rudimentarios y sujetos a una revisión profunda. Los casos analizados fueron divididos en tres grupos, según el tiempo de supervivencia de la víctima. Se estudió la concentración de ácido fórmico en los diversos tejidos ya que este compuesto se constituye en el principal metabolito del alcohol metílico.

10.1. Distribución de metanol y ácido fórmico en el hombre

Se analizó la concentración promedio de metanol y ácido fórmico en diferentes matrices biológicas: sangre (S), hígado (H), pulmón (P), cerebro(C) y riñón (R), en los tres grupos de víctimas definidos para éste caso. Los valores resultantes de los análisis para cada órgano y para cada grupo así como el rango de concentración hallada son mostrados gráficamente y en forma de barras en la Fig. 33.

Cuando se habla de supervivencia se indican los límites máximos a los que a lo sumo un individuo del grupo alcanzó. Por ejemplo solo un individuo del grupo uno sobrevivió hasta casi diez días, el resto promedió los tres y cuatro días. Asimismo, los dos primeros grupos recibieron algún tratamiento terapéutico de rigor, aún en los casos que fueron incipientes; mientras que los individuos del grupo tres no alcanzaron a recibir tratamiento terapéutico.

Los mayores niveles de metanol en todos los tejidos, se observaron en las víctimas pertenecientes al grupo 3, luego las del grupo 2 y no se detectó metanol en las víctimas del grupo 1. En orden decreciente, el promedio de concentración de metanol fue: cerebro, sangre, riñón y pulmón con 1.98, 1.75, 1.68 y 1.41 g/L, respectivamente.

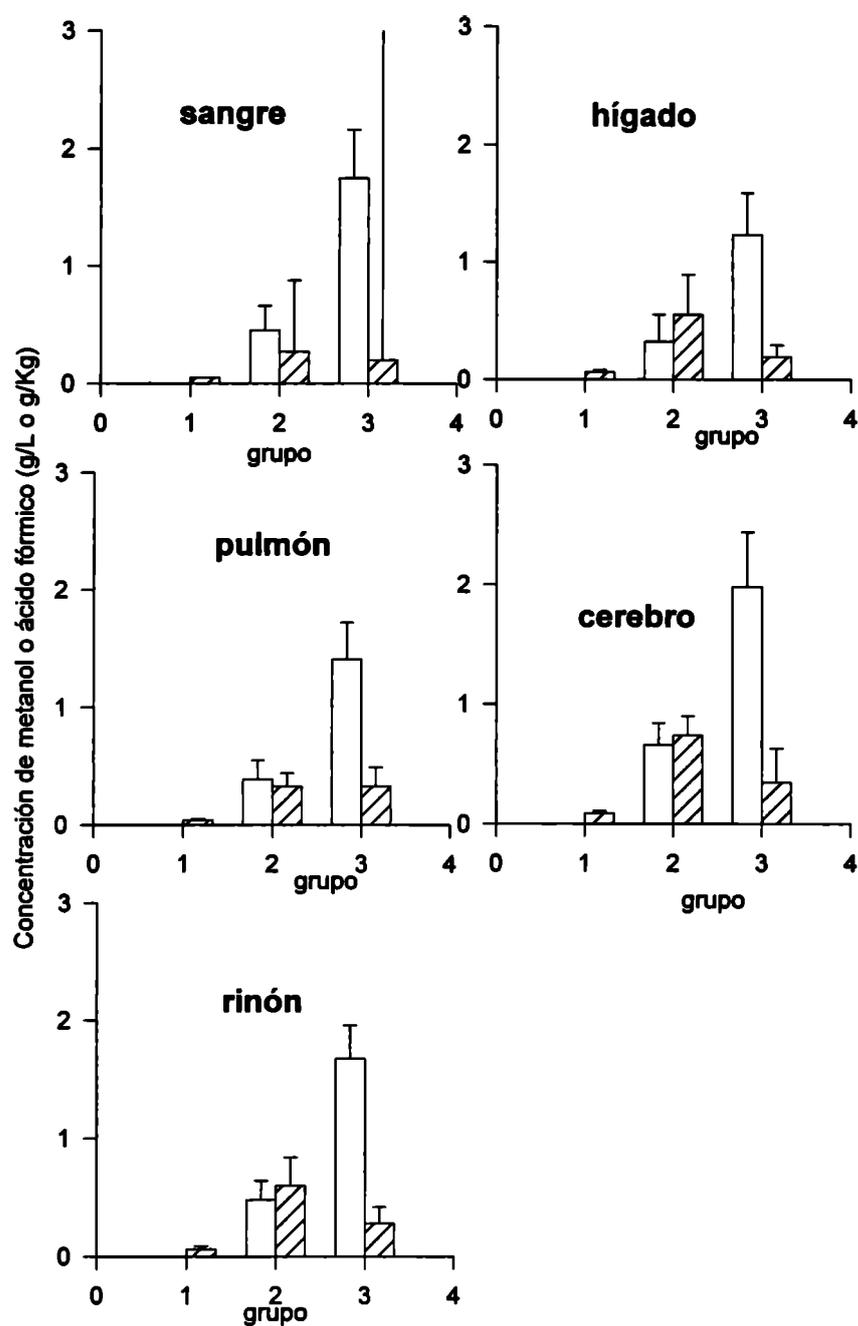


Figura 33. Concentración de metanol  y ácido fórmico  (g/L or g/Kg) en grupo 1, 2 y 3 en sangre, hígado, pulmón, cerebro y riñón.

La concentración de metanol informada en el presente trabajo y en los diferentes órganos y sangre fue comparada con otros datos bibliográficos presentados en casos de intoxicación por metanol (Bennet et al, 1953; Kane et al, 1968; Pla et al, 1991; Ferrari et al, 1997).

Los niveles de metanol en sangre en casos fatales fueron informados en un amplio rango (0.2-6.3 g/L).

En realidad ha sido muy cuestionado el uso de los niveles de metanol como índice de grado de intoxicación en este tipo de envenenamientos, como fuera expresado en la introducción, prefiriéndose al ácido fórmico, metabolito de éste, como marcador de la intoxicación.

En este estudio, la alta concentración de metanol encontrada en cerebro (superior al consignado en sangre) resulta superior al valor esperado, teniendo en cuenta el bajo contenido acuoso de la matriz. Esto indicaría que la distribución de metanol no es similar a la informada para el etanol. Pla et al (1991) arribaron a una conclusión similar para el hígado.

Por otro lado Barlett (1950), utilizando metanol marcado con carbono 14 y ensayando en ratones, encontró mayores concentraciones de metanol en riñón e hígado.

En la Figura 34 se muestra la relación de concentración de metanol en sangre para diferentes órganos correspondiente a los individuos pertenecientes al grupo dos y tres. Para el caso del grupo uno, el metanol no fue detectado ni en sangre ni en los órganos estudiados.

Puede observarse una buena correlación entre estos dos grupos con $r^2=0.996$, indicando un equilibrio en la distribución.

Grupo 3 (sangre/tejidos)

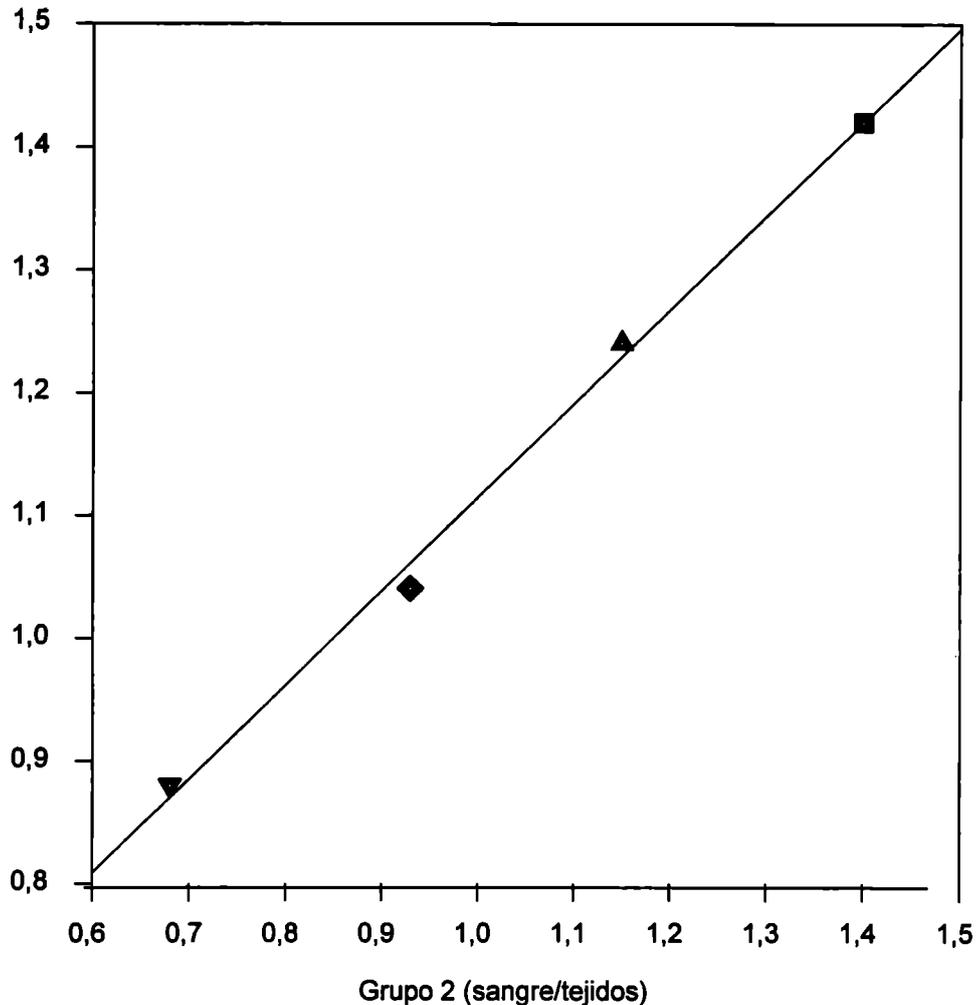


Figura 34: Relación promedio de la concentración en sangre de metanol respecto de los distintos tejidos para los grupos 2 y 3. ▼Sangre/cerebro, ▲ sangre/pulmón ◆ sangre/riñón, ■ sangre/hígado

Existe consenso que el camino metabólico más importante es el hepático donde la enzima alcohol deshidrogenasa oxida entre un 60 a 70 % del tóxico a formaldehído, el cual es enzimáticamente transformado a ácido fórmico. Tanto el riñón como el pulmón constituyen importantes vías de detoxificación, excretando metanol entre el 10-20% y el 5-7% respectivamente.

Las observaciones clínicas de pacientes con intoxicación metílica han revelado un perfil de síntomas, cuyo inicio de acidosis metabólica comienza entre las 12-24 horas luego de la ingestión (King, 1992). No se ha encontrado relación entre la concentración de metanol y el

grado de toxicidad. Se ha intentado equívocamente establecer una cantidad de metanol que represente una dosis fatal, perdiendo de vista que las mayores manifestaciones tóxicas se deben al producto de biotransformación, ácido fórmico, encontrado en forma amplia en los casos de envenenamiento luego de consumo de cantidades determinadas de metanol. Esta postura se encuentra en la misma línea que la sostenida por Baselt y Cravey (1995) quienes informaron que las concentraciones de metanol en sangre no necesariamente se constituyen en buenos índices de pronóstico en este tipo de intoxicaciones.

En el presente trabajo no se encontró una relación entre la concentración de metanol en sangre y el grado de toxicidad.

Nótese que en las víctimas incluidas en el grupo 1, el alcohol metílico no fue hallado ni en sangre ni en órganos; sin embargo el ácido fórmico estuvo presente en todas las matrices estudiadas.

Así, el metanol no puede considerarse como un parámetro fidedigno en el pronóstico de sobrevida y menos aún tomar el dato emanado del informe analítico para aseverar que este sea o no el causante del óbito en un análisis post mortem con fines forenses. Asimismo, diversos autores han comenzado a considerar al ácido fórmico, más bien que el metanol, como el agente tóxico más importante (Cooper et al, 1952; Jacobsen y McMartin, 1986; Liesivuori y Savolainen, 1991; Ferrari et al, 1997; 2003).

Por tanto, un estudio exhaustivo de la distribución del ácido fórmico en cada víctima resultó necesario a los fines de la presente investigación.

10.2. Análisis post mortem de la distribución del ácido fórmico en una intoxicación aguda por metanol.

Los informes previos referidos a la concentración de ácido fórmico se han restringido a la sangre. Algunas de las concentraciones de ácido fórmico en sangre publicadas y en relación a casos de intoxicación por metanol fueron efectuadas por Shanagian et al (1984), quienes han consignado valores de 0.31g/L; Fraser y Mc Nail (1989) han señalado guarismos entre 2.5-104g/L; Mahieu et al (1989) consignó concentraciones entre 0.015-0.19 g/L e indicó que concentraciones superiores de 0.5 g/L de ácido fórmico produce una severa intoxicación metálica. .

La Tabla 17 expresa los resultados obtenido en nuestros estudios. Esta tabla presenta la distribución post-mortem de ácido fórmico (g/L o g/kg) en sangre, hígado, riñón, cerebro y

pulmón de 15 víctimas provenientes de la intoxicación masiva por ingesta de vinos adulterados con alcohol metílico.

Tabla 17: Concentración de ácido fórmico (g/L o g/Kg) en diferentes matrices biológicas correspondiente a 15 víctimas involucradas en intoxicación metilica

	Víctima	S sangre	H hígado	P pulmón	C cerebro	R riñón	H+P+C+R
Grupo 1 Sobreviven hasta 10 días	1	0.08	0.09	0.05	0.11	0.06	0.31
	2	0.07	0.07	0.03	0.10	0.03	0.23
	3	0.12	0.03	0.04	0.09	0.04	0.02
	4	0.08	0.08	0.05	0.12	0.07	0.32
	5	0.06	0.08	0.03	0.07	0.04	0.22
Grupo 2 Sobreviven hasta 3 días	6	0.56	0.88	0.47	0.50	0.86	2.71
	7	0.56	0.15	0.19	0.74	0.29	1.28
	8	0.91	0.62	0.40	0.82	0.60	2.44
	9	0.69	0.52	0.38	1.10	0.82	2.82
Grupo 3 Sin tratamiento	10	0.61	0.34	0.58	0.67	0.49	2.08
	11	0.07	0.06	0.08	0.09	0.08	0.31
	12	0.25	0.25	0.32	0.29	0.32	1.18
	13	0.32	0.38	0.35	0.38	0.22	1.33
	14	0.21	0.19	0.42	0.16	0.45	1.22
	15	0.26	0.09	0.20	0.50	0.17	0.96

La concentración del metabolito ácido fórmico en sangre fue correlacionada con la concentración en los diferentes órganos estudiados.

La mejor correlación de concentraciones corresponde a sangre vs cerebro, con un coeficiente de regresión lineal $r^2 = 0.86$, para las 15 muestras analizadas (Fig.35a). Los coeficientes de correlación entre sangre y otros tejidos fueron: sangre vs hígado, con $r^2 = 0.69$; sangre vs riñón, con un coeficiente $r^2 = 0.68$ y sangre vs pulmón, con un coeficiente de regresión $r^2 = 0.56$.

La mejor correlación entre órganos fue la de pulmón vs riñón, para cada grupo con $r^2 = 0.91$, 0.84 y 0.87 , para los grupos 1, 2 y 3 respectivamente (Fig.35b). Otras relaciones entre tejidos fueron estudiadas pero no mostraron una buena correlación.

En los siguientes gráficos se observan las señaladas correlaciones, tomado aquellas con mejor coeficiente de regresión r:

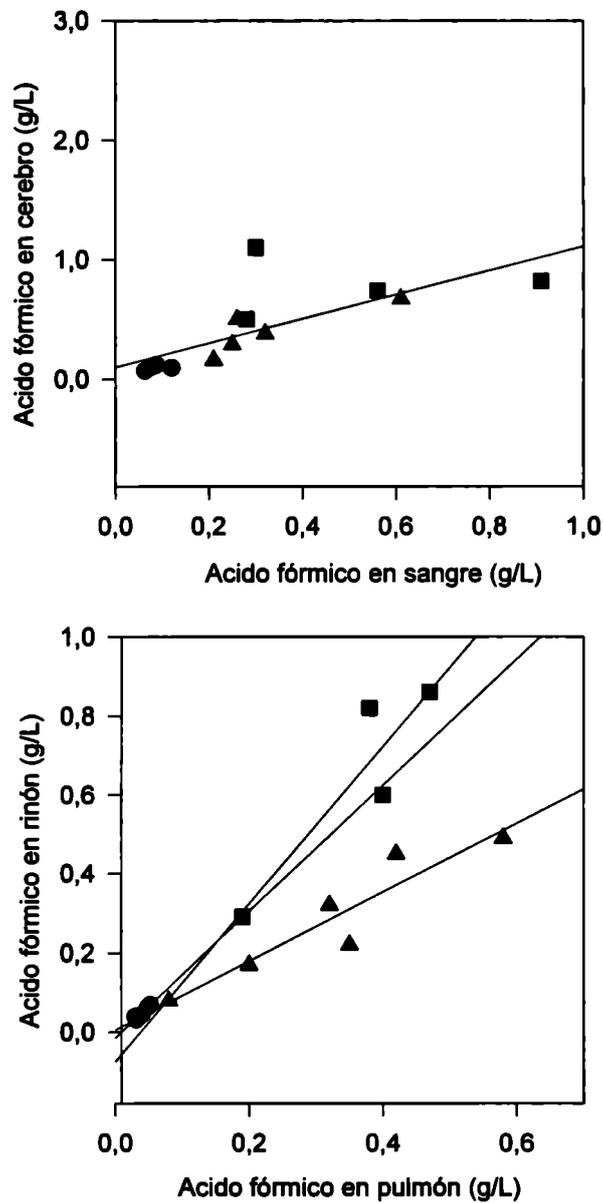


Figura 35: Gráfico mostrando la correlación entre a) concentración de ácido fórmico en cerebro y la concentración correspondiente en sangre ($r^2=0.86$, $n=15$), b) ácido fórmico en riñón y la concentración correspondiente en pulmón para los .grupo 1, ■ grupo 2, ▲ grupo 3.

Estas consideraciones sugieren que las concentraciones en sangre y cerebro pueden mejorar la interpretación del análisis de ácido fórmico y además la relación entre órganos, principalmente pulmón vs riñón, podrían ayudar a la comprensión forense en los casos de intoxicación metilica postmortem.

La siguiente ecuación fue definida para estudiar el grado de letalidad debido al ácido fórmico en intoxicaciones por metanol, teniendo en cuenta el tiempo de sobrevida y el tipo de terapia aplicada (etílica).

$$LI = (\text{concentración de ácido fórmico en sangre} / 0.5) 100 \quad (20)$$

LI es definido como índice de letalidad y 0.5 es el nivel de ácido fórmico en g/L informado en casos de intoxicación metilica (Mahieu, 1989).

LI muestra una buena correlación ($r^2 = 0.80$) con el ácido fórmico total en hígado, pulmón, cerebro y riñón, informado en la Tabla 17 para cada víctima. En la Fig.36 se muestra la correlación referida, incluyendo datos de Tanaka et al (1990) y Hantson et al (2000). Estos últimos presentaron víctimas con tiempo de sobrevida entre 2 y 3 días por lo que se ajustan a nuestro grupo 2 (tiempo de sobrevida hasta tres días) pero la terapia aplicada fue la hemodiálisis y no la etílica como en nuestro caso estudiado. Los resultados confrontados en ambos casos permiten deducir que el tipo de terapia aplicada, influye en la concentración de ácido fórmico encontrado y en la distribución post-mortem. También pudo apreciarse el alto grado de dispersión que presentaron los datos correspondientes al grupo 2.

Obsérvese que las altas concentraciones de ácido fórmico en sangre y vísceras correlacionaron bien con la severidad de los efectos como puede apreciarse en los casos estudiados, ya que las víctimas del grupo 2 recibieron tratamiento terapéutico a base de alcohol etílico y sobrevivieron al menos 3 días. Esto hace al ácido fórmico mejor indicador de la intoxicación metilica.

En la presente investigación se efectuaron relaciones de concentración de ácido fórmico entre órganos y posteriormente se vincularon con el índice de letalidad definido.

Así, los datos de ácido fórmico de cada una de las quince víctimas analizadas fueron agrupados según el tiempo de supervivencia y la existencia o no de tratamiento, de acuerdo a lo consignado en el capítulo de materiales y métodos. Como se deduce de la Figura 36, cada víctima según el grupo al que pertenece, quedó en una de las tres zonas definidas: Zona I (corresponde a las relaciones cuyo $LI < 40$), Zona II ($40 < LI < 100$) y zona III (con $LI > 100$). En los mismos gráficos hemos incluido los datos reportados por Tanaka et al (1990).

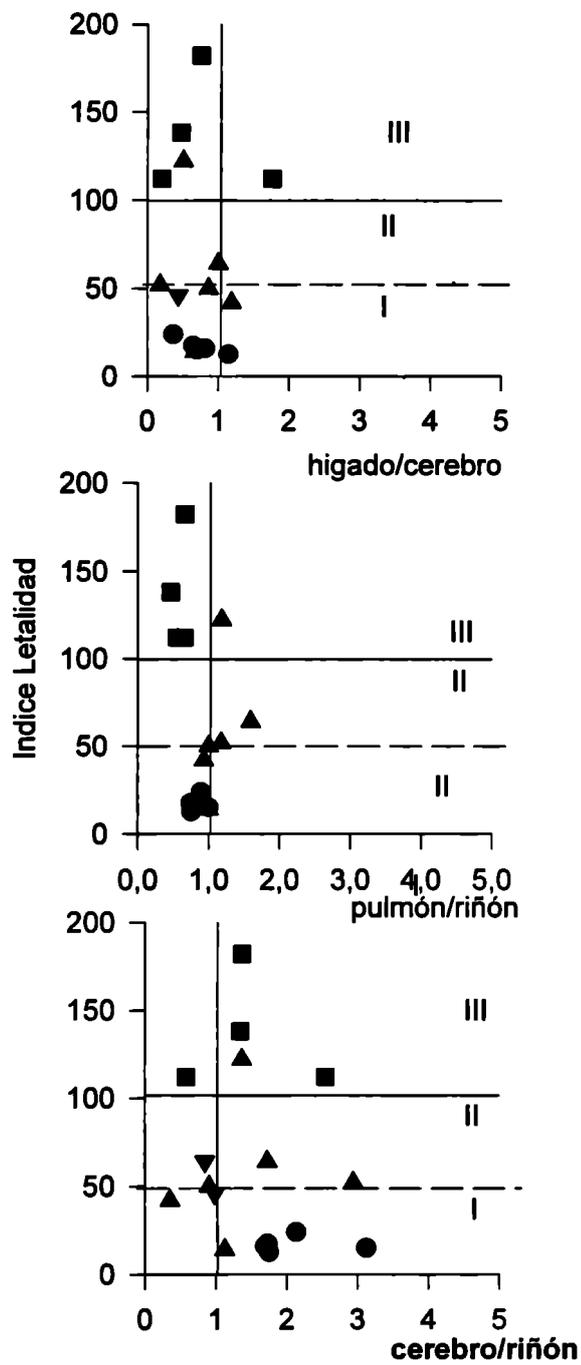


Figura 36: Correlación entre el índice LI y la relación de concentraciones en diversos órganos.
 ● grupo 1, ■ grupo 2, ▲ grupo 3., ▼ Datos de Tanaka

En las relaciones entre órganos consignadas precedentemente se observa que para todos los individuos pertenecientes al grupo I LI es menor a 40, observándose bajas concentraciones para hígado y pulmón y una más alta para cerebro (ver Figura 33). Las víctimas del grupo 3, es decir aquellas que fallecieron en breve tiempo, caen en la zona intermedia, con LI entre 40 y 100. Obsérvese que los datos consignados por Tanaka et al (1990), caen dentro de valores de LI correspondiente al grupo 3 definido aquí, es decir aquellos individuos que no fueron sometidos a tratamiento terapéutico alguno. Para este grupo las mayores concentraciones de ácido fórmico se hallaron en pulmón y cerebro.

En cuanto a las víctimas del grupo 2, muestran éstas los mayores niveles de LI, superiores a 100. Asimismo muestran mayores concentraciones en cerebro.

Como puede verse, mediante el análisis de relaciones de concentraciones de ácido fórmico entre distintos tejidos, pudimos deducir que el cerebro se constituye en un órgano relevante para el estudio post mortem de intoxicaciones metílicas, ya que el ácido fórmico se mantiene por varios días, aún cuando el metanol ya no es detectado en las matrices biológicas.

En cuanto a la relación pulmón / riñón, esta nos permitió ubicar a los grupos de víctimas en zonas bien definidas (I, II y III). Nótese que esta relación es muy valiosa a la hora de interpretar la distribución en un análisis post mortem, ya que justamente las víctimas del grupo 1 tienen mayor concentración de ácido fórmico en riñón que en pulmón, mientras que el grupo 2 posee mayor concentración de ácido fórmico en pulmón, de una manera muy definida, en tanto que el grupo 3 mantiene el sesgo hacia el riñón.

La introducción del índice de letalidad (LI) y las relaciones de concentración entre órganos, en el estudio de estabilidad y distribución post mortem de ácido fórmico, permitirían inferir la posible causa de deceso de las víctimas de la intoxicación metílica. Por otro lado, los datos presentados aquí nos advierten sobre la necesidad del estudio órgano por órgano del principal producto de biotransformación del metanol: *ácido fórmico*; más aún, cuando para órganos muy ricos en lípidos como el cerebro, hubiera sido esperado un comportamiento distinto respecto de otros órganos con mayor contenido acuoso. Sin embargo ésta postura se desvanece frente a casos donde la terapia aplicada es la hemodiálisis, ya que la remoción del agente tóxico es muy rápida y la distribución no sigue pautas normales biocinéticas. Esto último quedó demostrado, como ya se ha señalado, con los trabajos de Hantson et al (2000), donde las concentraciones totales de ácido fórmico y los índices LI son más bajos que los consignados para nuestros casos del grupo 2. Además, las correlaciones

entre tejidos se ven severamente modificadas, por lo que el presente modelo no puede aplicarse.

En la Figura 37 se observa una buena correlación ($r^2= 0.80$) entre LI y la suma de las concentraciones en hígado, pulmón, cerebro y riñón. En éste pudo observarse nítidamente como los datos de Hantson et al (2000) son discordantes respecto de las víctimas del grupo 2 de nuestro estudio, atento que en los dos casos consignados por los autores se aplicó, como se dijo, hemodiálisis. Además, si efectuamos el cálculo para la relación de concentración pulmón / riñón, se hallará invertida (> 1) respecto a los guarismos obtenidos para nuestro estudio. Nótese que los datos de Tanaka et al (1990) se ubican en la misma zona que los correspondientes a nuestro grupo 3, es decir aquellos que no recibieron tratamiento terapéutico, tal como sucediera con las víctimas reportadas por los autores japoneses.

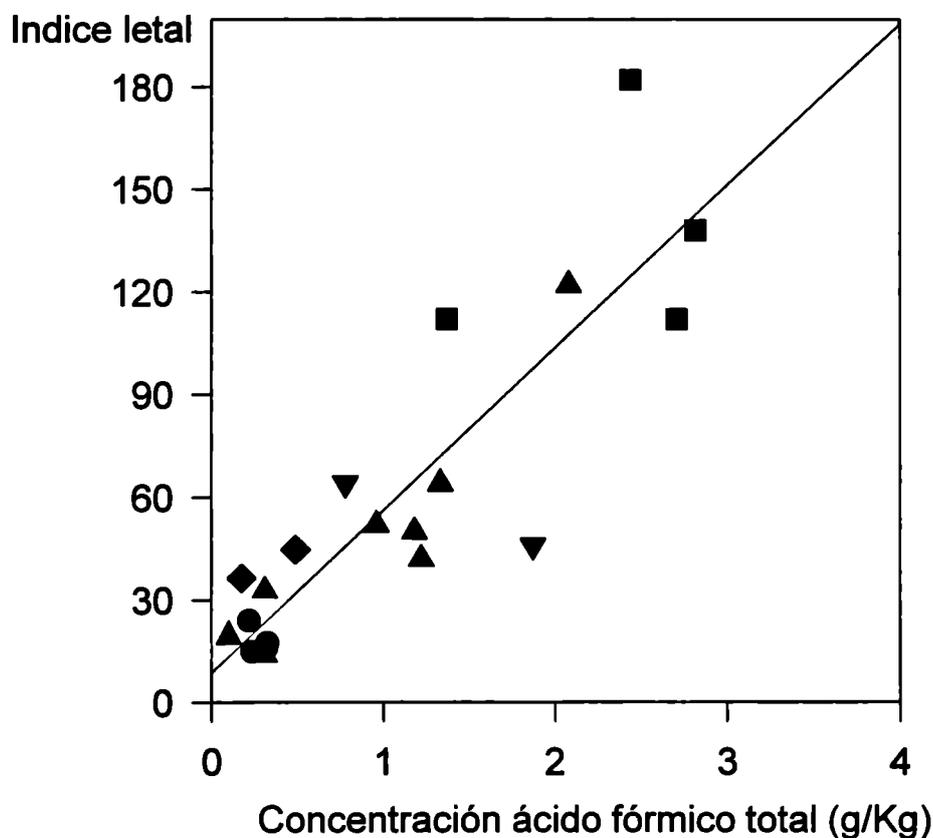


Figura 37: Correlación entre Índice de Letalidad vs. Concentración total de ácido fórmico (mg/L) ● grupo 1, ■ grupo 2, ▲ grupo 3., ▼ Datos de Tanaka y Hantson..

Sobre la base de lo señalado precedentemente, debe considerarse que para aquellas víctimas que no han sido sometidas a tratamiento terapéutico alguno, el modelo propuesto aquí se mantiene firme y como una herramienta sumamente útil para aseverar diagnósticos de intoxicación letal en casos forenses y aún transcurridas varias semanas luego del deceso. Asimismo los valores de IL, que se incrementan para casos severos de ingesta metélica, correlacionan muy bien con lo informado por Mahieu et al (1989).

Por otro lado Liesivuori y Savolainen (1991) expresaron que las concentraciones de ácido fórmico en sangre y orina correlacionaban bien con los efectos clínicos y la severidad del cuadro en modelos animales. Esta postura ha podido verificarse en nuestros estudios en seres humanos.

La Figura 37 nos permite inferir también que en los casos donde fue aplicada la terapia etélica y con supervivencias superiores a los dos o tres días, se hallaría muy bajo tenor de ácido fórmico en los distintos órganos o tejidos, por lo que el estudio de las relaciones entre órganos, principalmente pulmón / riñón ayudaría a una mejor interpretación médico legal del óbito que se investiga.

La Tabla 18 muestra la incidencia del lapso entre el tiempo de muerte y el análisis de metanol y ácido fórmico en 15 víctimas estudiadas, concluyéndose que el tiempo transcurrido incide poco en la determinación de ácido fórmico. En cambio, el metanol parecería ser más susceptible de transformaciones post mortem, ya que en los tejidos de 5 (identificados como números 1 a 5) de un total de 15, el metanol arrojó resultados negativos, con lapsos promedios de 3 días y supervivencia entre 4 a 14 días; mientras que los casos identificados como 9 a 10 dieron resultados positivos para metanol con un lapso de 4 días entre la muerte y el análisis y una supervivencia menor a 4 días. Por último, los casos 14 y 15 fueron positivos para el alcohol metélico en ambas exhumaciones y luego de transcurridos 69 días y con supervivencia menor a 4 días. Obsérvese que el ácido fórmico resulta positivo en todos los casos independientemente del tiempo de supervivencia de las víctimas.

Por lo tanto nuestra conclusión fue que debe tenerse en cuenta el tiempo de supervivencia cuando se evalúan los resultados analíticos para el metanol. En cambio el ácido fórmico no presentó ninguna incidencia en la valoración cualitativa.

El tiempo transcurrido desde la toma de muestra al análisis tuvo poco efecto sobre los mismos resultados.

Tabla 18. Metanol y ácido fórmico en 15 casos, considerándole tiempo transcurrido hasta el análisis

Víctima	Lapso entre muerte- tiempo de análisis (días)	Metanol		Acido Fórmico	
		sangre	órganos	sangre	órganos
1 ^a	3			+	+
2 ^a	19			+	+
3 ^a	3			+	+
4 ^a	3			+	+
5 ^a	3			+	+
6 ^b	3		+	+	+
7 ^b	NA	+	+	+	+
8 ^b	23	ND	+	+	+
9 ^b	4	ND	+	+	+
10 ^b	4	+	+	+	+
11 ^b	NA	+	+	+	+
12 ^b	2	+	+	+	+
13 ^b	2	ND	+	+	+
14 ^b	69 ^c	ND	+	ND	+
15 ^b	69 ^c	ND	+	ND	+

^a Tiempo de supervivencia entre 4 y 11 días.

^b Tiempo de supervivencia menor 4 días.

^c Exhumación.

NA: no disponible; ND: no determinado; +: positivo (mayor al límite de detección de 0.001 g/L); - negativo (menor al límite de detección (0.001 g/L)).

Como conclusión final deducimos que estos resultados mostraron que es necesaria la determinación de ácido fórmico y metanol para afirmar una intoxicación metílica en casos postmortem. El metabolito constituye un mejor indicador luego de las 48 hs. de la ingestión, si el tratamiento terapéutico es en base a terapia etílica. Esto podría aplicarse a individuos vivos para un mejor seguimiento de la intoxicación.

CAPITULO 11

ESTABILIDAD Y FACTORES FISICOS Y QUÍMICOS QUE INCIDEN EN LA DETECCIÓN DE DIETILENGLICOL EN TEJIDOS HUMANOS. CORRELACIÓN ENTRE PARÁMETROS DE MEDIO INTERNO Y LA ACIDOSIS METABÓLICA. ESTIMACIÓN DE LA DOSIS LETAL PARA EL EPISODIO ESTUDIADO

11.1 Estudio de la concentración en jarabes de propóleos contaminados con dietilenglicol.

La Tabla 19 muestra las cantidades encontradas de dietilenglicol (DEG) y propilenglicol (PG) expresadas como porcentaje en las muestras de jarabe de propóleos pertenecientes a las víctimas de la intoxicación masiva estudiada en la presente investigación. Las muestras fueron aportadas por los familiares de los afectados o bien como resultados de los procedimientos judiciales llevados a cabo en su oportunidad. En esta Tabla se advierten los altos porcentajes (superiores al 50% para la mayoría de los casos) de DEG.

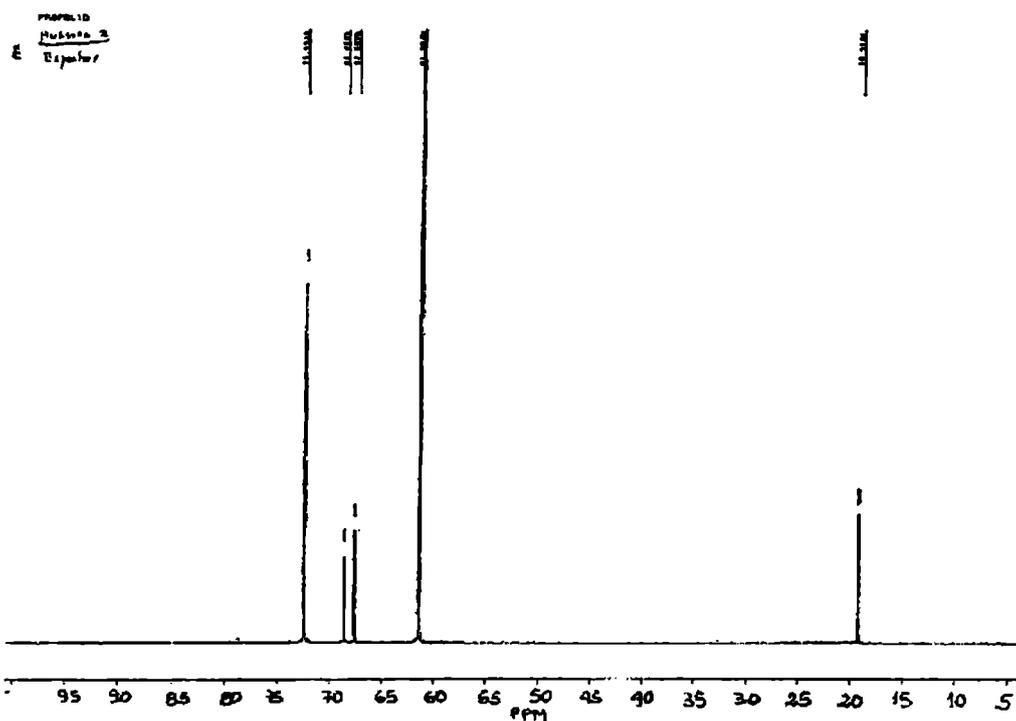
Cabe señalar, que el mayor tenor de dietilenglicol en las muestras de jarabe de propóleos se halló en una partida, denominada "29"; el resto mostraron ausencia del peligroso glicol o bien concentraciones muy bajas.

Más adelante señalaremos como estos valores de concentración pudieron ayudar en la interpretación de las cantidades aproximadas ingeridas, mediante su correlación con los parámetros bioquímicos de medio interno.

Las Figuras 38 y 39 muestran el espectro RMN de la muestra rotulada como caso 12. El resto de las muestras analizadas manifestaron similar comportamiento.

Tabla 19 Contenido de DEG y PEG en las muestras de jarabes pertenecientes a cada una de las víctimas de la intoxicación masiva

M. N°	Víctim#	% DEG V/V	% PG V/V	DEG+PG % V/V	% DEG P/V	% PG P/V	DEG+PG % P V	% DEG/ % PG
1	Z	58.5	29.5	88	65	31	96	1.98
2	A	58.0	30.0	88.0	65	32	97	1.97
3	Cu	50.6	31.8	82.4	56.5	33	89.5	1.59
4	Y	56	27	83	63	28	91	2.07
5	L	59.5	29	88.5	66.5	30	96.5	2.07
6	Ca	24	51	75	26.6	53	79.6	0.47
7	P	32	49	81	36	51	87	0.65
8	M	54	40	94	60	42	102	1.34
9	G	47	28	75	52.5	29	81.5	1.67
10	Ga	53	32	86	59.5	34	93.5	1.63
11	Cr	34	41	75	38	43	81	0.82
12	Ru	64.5	31	95	72	32	104	2.07
13	Ot	25.5	41	66.5	28.5	42.5	71	0.62
14	Fr	46.5	24	70.5	52	25	77	1.93
15	Fa	58.5	31	89.5	65	32	97	1.88
16	N	64.0	28	96.0	71	29	100	2.09
17	Nn	64.0	28	96.0	71	29	100	2.09
18 / 20	*	(+) NE	(+) NE					



GF4 CR=F1

D QN QP AO	DP = 20H	TD = 16K
= .7372800	SI = 16K	SF = 50.3234030
= 8600.000	O2 = 3670.000	SW = 11111.111
PT = 1.356	FW = 13900	TE = 297
= 0.0	PW = 4.00	NS = 411
= 0	DW = 45	DE = 58.90
CURRENT=12	SY = 50.0000000	PR = H 2
= 300		
= 7	IB = .150	GB = 0.0
I = 0	IM2 = 0	APKN = 0
(PPM) = 100.604	F2(PPM) = 1.446	
KCM = 124.75	PPM/GCM = 2.4789	CX = 40.000
= 0.0	MAXX = 35	MAX1 = 25.600
= 3403.000	IS = 4	AZFW = 100.000H
FE = 200	ABCO = 0	ABC1 = 0
CN = 32	ABSG = 5	ABSL = 3
BE = 0	NOBC = 0	ISEN = 128
= 2.500	PC = 1.000	AI = 0
O = 0.0	PC1 = 0.0	QS GAMMA = 0.0
PHA = 0.0	NZP = 0	SREP = B

FIGURE 3a

Figura 38 Espectro RMN de una muestra de jarabe de propóelos contaminado con DEG

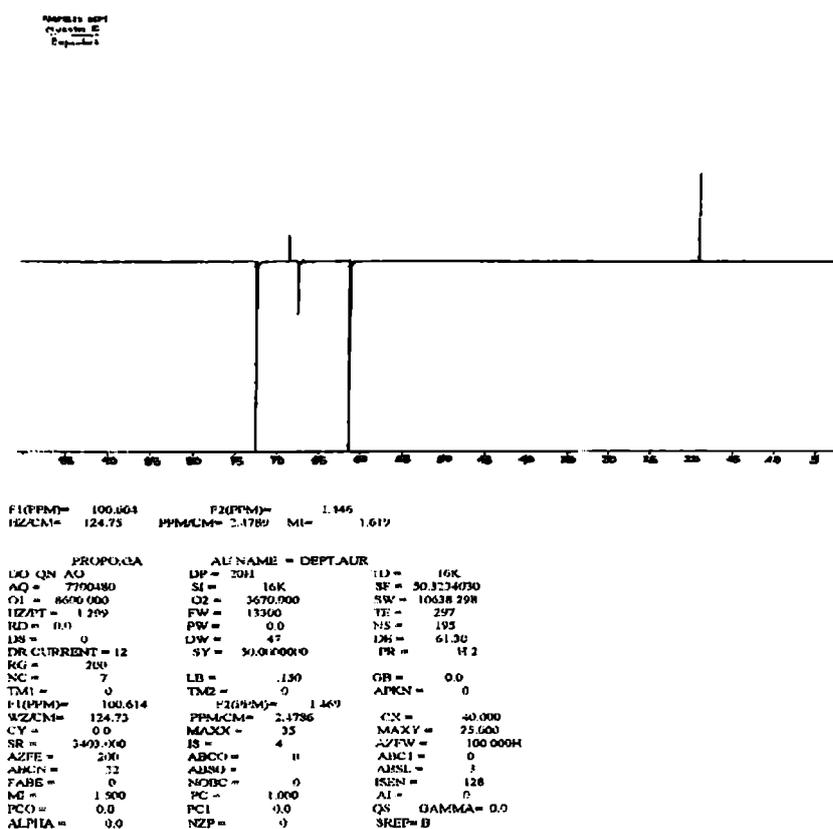


Figura 39. Espectro RMN – DEPT de otra muestra de jarabe de propóleos contaminado con DEG

11.2 Aislamiento e identificación de DEG en sangre y vísceras

De los tres métodos ensayados para el aislamiento del DEG de los tejidos utilizados, el método c descrito en el capítulo “Materiales y Métodos” resultó el más eficiente. La recuperación fue superior a los restantes, aunque la consecución de la técnica completa demandó un tiempo mayor. Debido al estado de putrefacción de muchas de las matrices, se justificó escoger el método que permitiera mayor recuperación. Asimismo la naturaleza muy polar del metanol, evitó de alguna manera la extracción cuantiosa de lípidos, aunque el extracto no fue completamente lípido.

Cuando el extracto metanólico fue resguardado en heladera a temperaturas entre 2 – 4°C por 24 horas, se observó al retirar que el recipiente de vidrio contenía, adherido a las paredes, una sustancia semicristalina. En estas circunstancias el análisis de dietilenglicol en el extracto metanólico arrojaba resultados negativos. Cuando dicha sustancia se redisolvió en el extracto metanólico (el recipiente era dejado algunas horas a temperatura ambiente, 20°C–25°C) el resultado de la cromatografía ponía de manifiesto la señal asignable al DEG. Este comportamiento se mantuvo constante para los casos donde el DEG había sido detectado en

los órganos. Asimismo, la disolución del componente hallado se separó y redisolvió en metanol purísimo, detectándose así el DEG por cromatografía gaseosa.

Advertimos entonces que el fenómeno fisicoquímico era relevante a la hora de evaluar la existencia del tóxico en el extracto proveniente del aislamiento. Por tanto se decidió estudiarlo por medio de GC-FID y TLC-FID (cromatografía en placa delgada con posterior elución y resolución con detector de ionización de llama) con el objeto de conocer la composición. Esta fracción incógnita la denominaremos en adelante “fracción semicristalina”.

11.3 Análisis de la fracción semicristalina separada del extracto metanólico a baja temperatura

En el siguiente esquema se resume el procedimiento que fuera descrito en el capítulo 7 de Materiales y Métodos, indicando los resultados en porcentaje de las fracciones lipídicas complejas, componentes de la sustancia similar cristalina adherida a las paredes de los recipientes donde eran tomados los extractos procedentes de la técnica de aislamiento empleada. Luego, se muestran los espectros obtenidos.

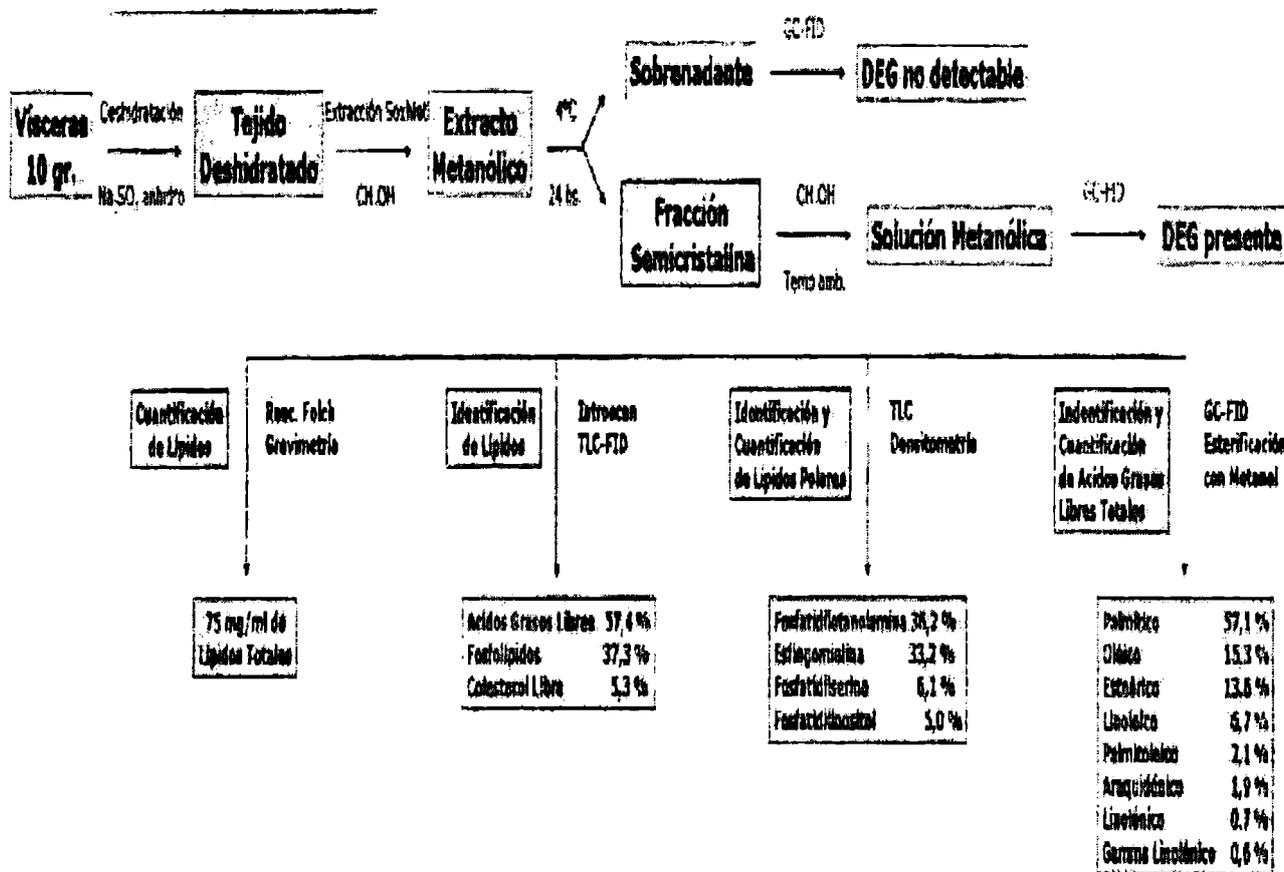
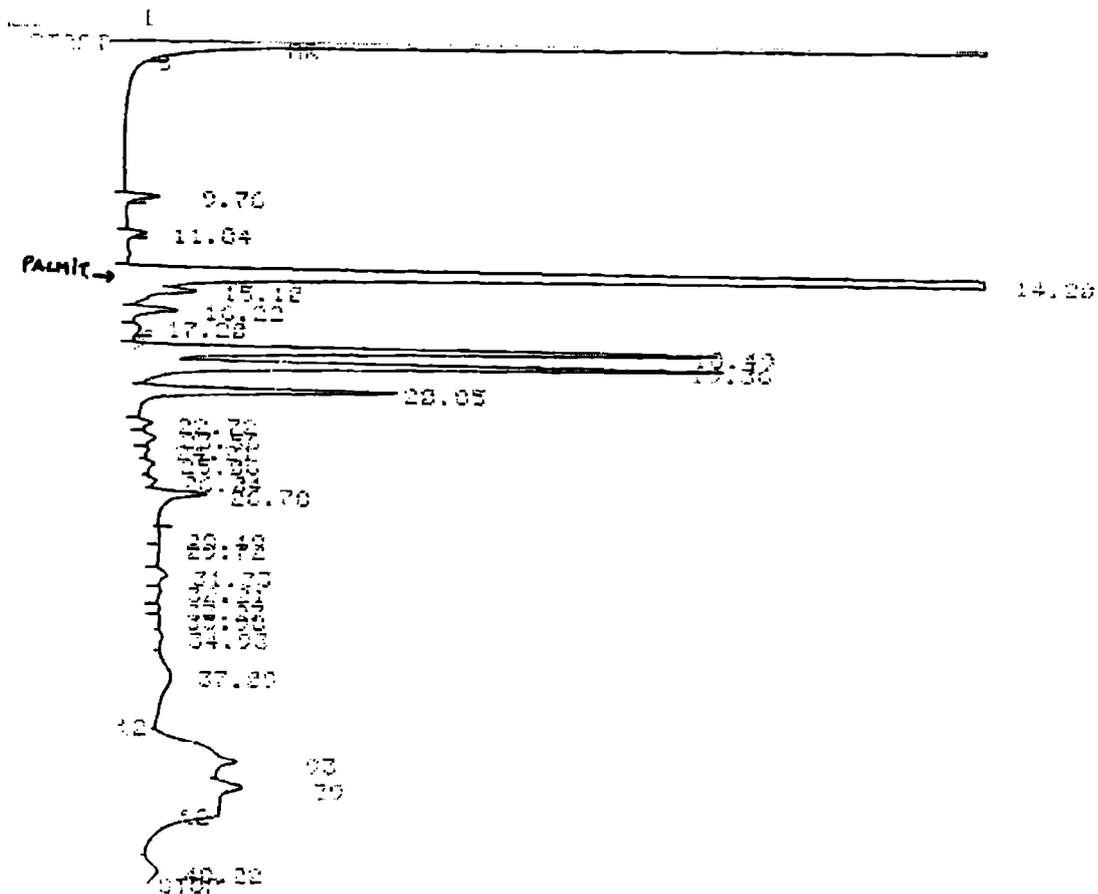


Figura 40. Esquema de procedimiento y resultado del estudio de la fracción incógnita denominada semicristalina, con indicación de los porcentajes de lípidos complejos

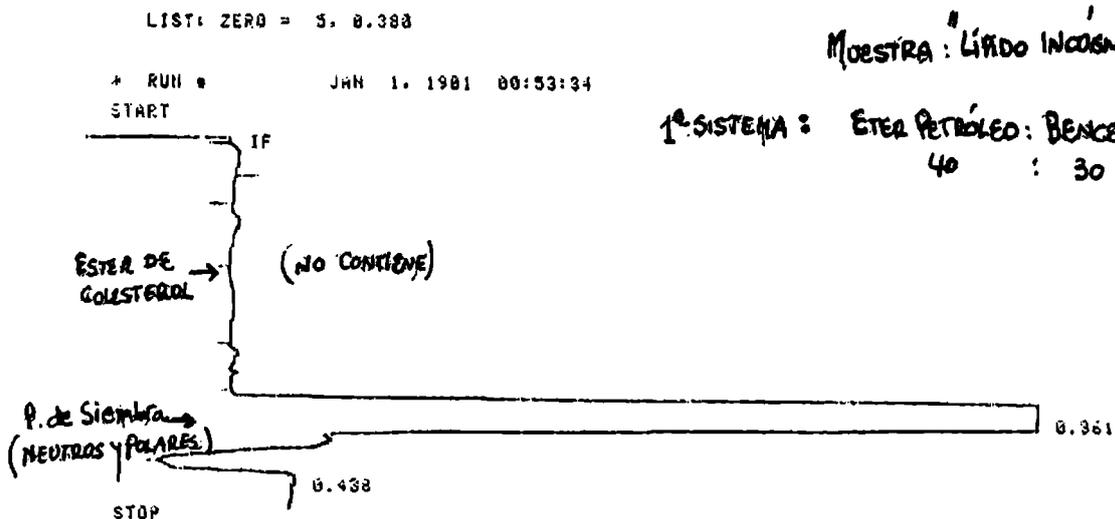


RT	Area	%
0.6	0.000000	0.00
0.9	0.000000	0.00
57.1	100.000000	100.00
2.1	0.000000	0.00
13.6	0.000000	0.00
15.3	0.000000	0.00
6.7	0.000000	0.00
0.6	0.000000	0.00
0.7	0.000000	0.00
0.2	0.000000	0.00
1.9	0.000000	0.00
0.4	0.000000	0.00
0.2	0.000000	0.00
0.1	0.000000	0.00
0.2	0.000000	0.00
14.26	0.000000	0.00

Area	N°C.	D. Ligadura
0.6	12:0	
0.9	14:0	
57.1	16:0	Palmitico
2.1	16:1	Palmitoleico
13.6	18:0	Estearico
15.3	18:1	oleico
6.7	18:2	linoleico
0.6	16:3	n-3
0.7	16:4	n-4
0.2	20:5	n-3 Araquidónico
1.9	20:4	n-6
0.4	22:6	n-6
0.2		
0.1		
0.2		
14.26		

133

Figura 41. Cromatografía (GC-FID) obtenido del análisis de ácidos grasos libres totales, luego de esterificar con metanol.

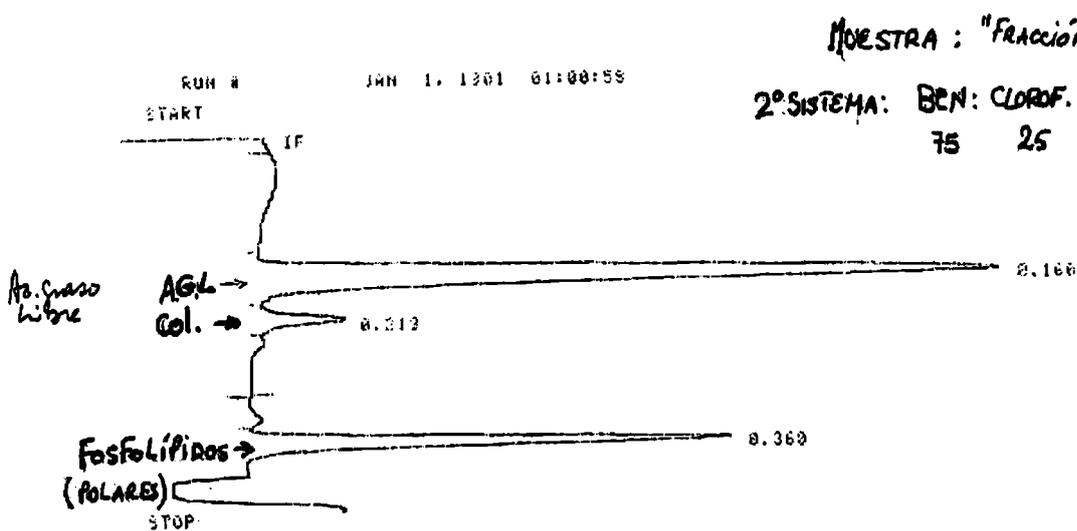


RUN# JAN 1, 1981 08:53:34

AREA#

RT	AREA	TYPE	WIDTH	AREA%
.361	251074	VP	.027	96.33836
.438	9543	PH	.039	3.66170

TOTAL AREA= 260617



RUN# JAN 1, 1981 01:00:58

AREA#

RT	AREA	TYPE	WIDTH	AREA%
.160	34154	PV	.020	57.36890
.212	3173	VV	.015	5.32973
.360	22207	VF	.018	37.30138

TOTAL AREA= 59534

MUL FACTOR=1.0000E+00

→ AGL

→ COLESTEROL

→ POLARES

Figura 42. Cromatograma obtenido para lípidos totales mediante TLC-FID. Obsérvese la resolución alcanzada con el segundo sistema de fase móvil

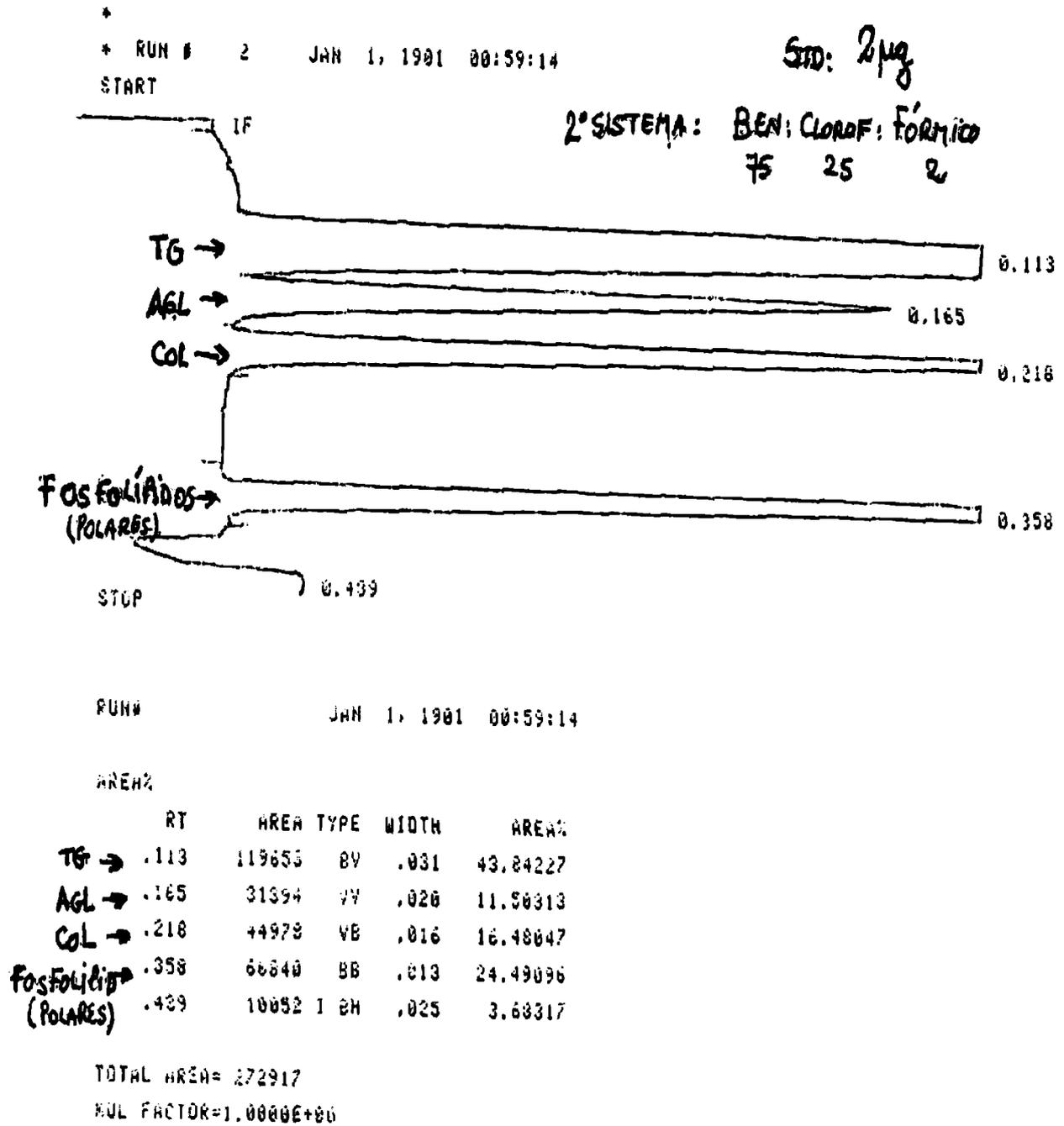
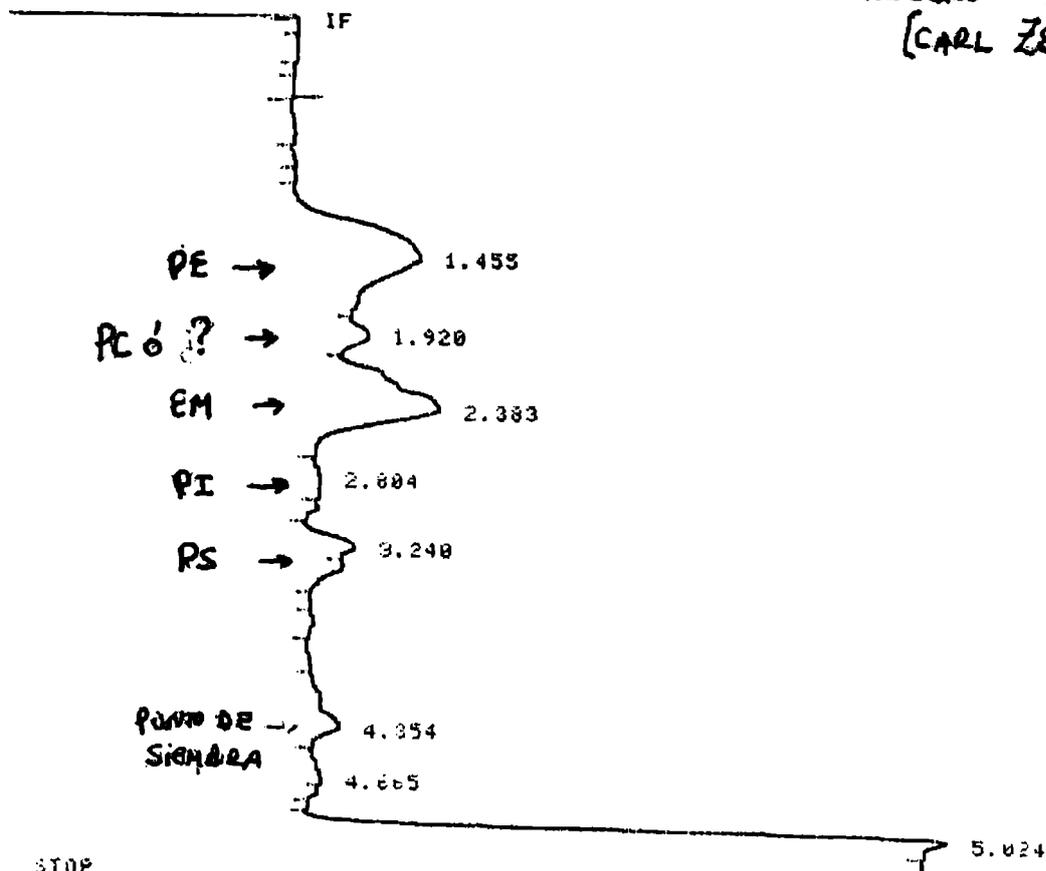


Figura 43. Cromatograma obtenido mediante TLC-FID de estándares resueltos en el segundo sistema de fase móvil utilizado.

BREAK

* RUN # 3 JAN 1, 1981 00:22:25
START

"LÍPIDO INCOGNITA"
POR DENSITOMETRÍA. (TLC)
(CARL ZEISS)



STOP

RUN# 3 JAN 1, 1981 00:22:25

RT	AREA	TYPE	WIDTH	AREA%	Lípido	% RELAT.
1.455	408732	VV	.446	23.10076	→ PE (fosfatidiletanol)	36.2
1.920	107505	VV	.196	6.07598	→ PC? (fosfatidilcolina)	9.5
2.383	375075	VV	.354	21.19854	→ EM (ESFINGOMIELINA)	33.2
2.804	96381	VV	.253	3.18655	→ PI (fosfatidilinositol)	5.0
3.240	69004		.150	3.89998	→ PS (fosfatidilserina)	6.1
4.354	113763	VV	.305	6.42967	→ P. de SIEMBRA.	10.0
4.665	46532	VV	.188	2.62990		
5.024	592352		.126	33.47352		

TOTAL AREA=1769344

MUL FACTOR=1.0000E+00

Figura 44. Resolución de los lípidos polares mediante cromatografía TLC-FID, indicando los porcentajes relativos de fosfolípidos

Como conclusión del estudio se pudo demostrar la existencia de ácidos grasos, principalmente ácido palmítico, ácido esteárico y ácido oleico en un 57% y de fosfolípidos como la fosfatidiletanolamina y la esfingomiélin en un 37%; el 4% restante se halló constituido por esteroides.

Los compuestos orgánicos de cadena larga pueden formar estructuras de tipo cristalina, interviniendo las interacciones denominadas de Van der Waals. Asimismo los ácidos grasos tienden a formar pares orientados cabeza a cabeza compartiendo enlaces de hidrógeno entre los grupos carboxilos, con la particularidad de formar, en mezcla de lípidos similares, cristales que contienen más bien un determinado tipo de moléculas que otras. Dentro de las estructuras formadas con estas mezclas podemos encontrar las soluciones sólidas, en las que las moléculas componentes de un tipo están distribuidas al azar en la red espacial del otro, o también una estructura espacial en la que, debido a un enfriamiento lento puede dar lugar en determinadas condiciones a la formación de cristales a modo de "capas" en los que las capas de un determinado tipo de cristal se depositan en la superficie cristalina de otro. Por otro lado sabemos que existen fases con propiedades intermedias a las de la fase líquida y cristalina; a estas fases mesomórficas se las denomina, cristales líquidos y son compuestos típicamente anfifílicos. La formación de dicha estructura depende de factores como la concentración y la estructura química del compuesto anfifílico, de la temperatura y de otros componentes de la mezcla.

Por lo consignado y en base a la composición lipídica de la fracción que se forma por enfriamiento del extracto metanólico obtenido en el proceso de aislamiento del DEG desde el material biológico, es posible plantear el mecanismo de retención del dietilenglicol como formación de una fase mesomórfica, dada la cantidad de fosfolípidos presentes (véase la Figura 45), los que retendrían al dietilenglicol por interacciones de tipo polar, formándose al mismo tiempo una solución sólida con los ácidos grasos libres presentes.

Es conocido que los fosfolípidos forman micelas en soluciones polares. Además, la posible interacción de los grupos polares de los ácidos grasos con el dietilenglicol, influiría directamente en su retención.

Como conclusión de estos estudios, hemos podido identificar y establecer el porcentaje relativo de los componentes de los tres grupos de lípidos encontrados, a saber: lípidos polares complejos, como lo son los fosfolípidos, los ácidos grasos libres totales y los lípidos totales que no integran los otros dos, cuya estimación realizada en esta tesis nos permiten interpretar

el fenómeno de retención de naturaleza físico química que opera en un sencillo proceso de aislamiento y el que podría determinar el éxito o fracaso de una determinación analítica post mortem.

Cabe preguntarse acerca de si la carencia de datos bibliográficos internacionales sobre detección de DEG en material post mortem se deba a una consecuencia de este tipo de fenómenos que dificultan su identificación y consecuente cuantificación.

Esta apreciación se halla en consonancia con los datos señalados en la Tabla 21, donde se observa que el DEG fue detectado en cuerpos exhumados y en total descomposición, por lo que es dable pensar que la codisolución o coadsorción podría ser operada en el organismo tal como sucede in vitro. El DEG pudo ser “protegido” de la degradación que se realizaría desde los primeros estadios de la descomposición histológica en el hombre por acción de microorganismos. Por otro lado estos agentes microbianos han mostrado capacidad de incorporar a los glicoles. Se ha informado que el dietilenglicol es degradado por asimilación de cultivos mixtos de *Pseudomona sp*, transformándolo a ácido etoxihidroxiacético y ácido etoxiglicoxiacético (Kawai, 1995). Siendo este microorganismo muy común en los cuerpos en descomposición debería entonces concretarse totalmente la degradación en un tiempo relativamente breve, cosa que no sucedió en algunos de los casos estudiados en la presente tesis, llegando a detectarse DEG inclusive hasta más de dos meses posteriores al óbito. Cabe señalar que una gran parte de los métodos informados y que se aplican al aislamiento de DEG, son para suero y orina (Maurer et al, 2001) que contienen una cantidad pequeña de lípidos complejos (fosfolípidos) por lo que el fenómeno no sería tan relevante como en vísceras.

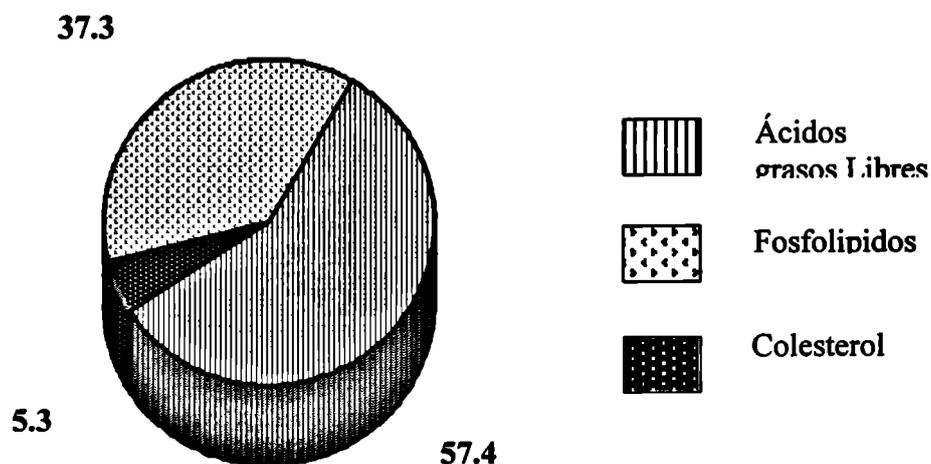


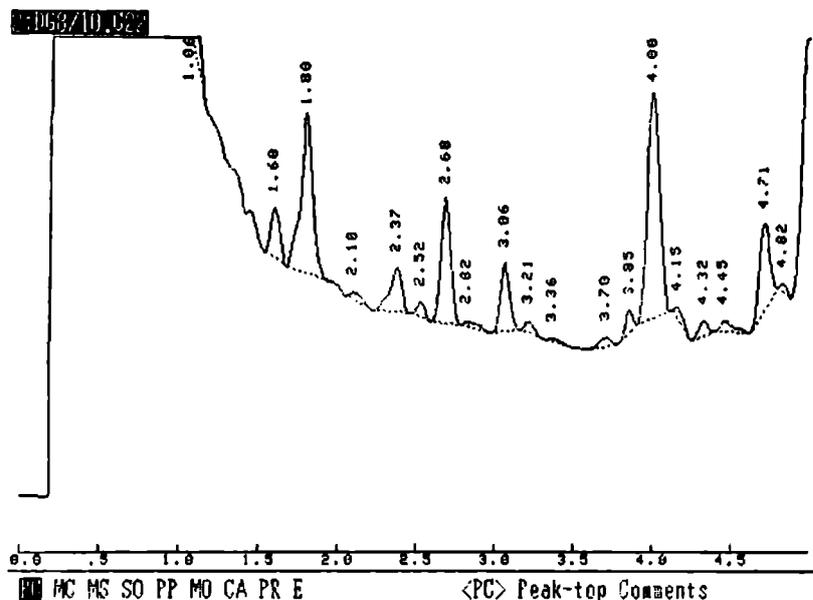
Figura 45. Gráfico de torta donde se observa la composición y porcentaje de la fracción semicristalina estudiada.

Asimismo, esta circunstancia alerta al analista sobre la posible interacción de los analitos (en este caso DEG) con componentes biológicos normales extraídos durante la técnica de aislamiento, que podrían retener la droga por alguno de los mecanismos explicados y negativizar así, falsamente, el resultado del estudio.

Es interesante a esta altura señalar la advertencia que hace Skoop (2004), en una reciente revisión sobre aspectos preanalíticos en las determinaciones toxicológicas postmortem, en la que ha señalado que los mayores errores, teniendo en cuenta todas las etapas que constituye la investigación en el laboratorio, se cometen en la fase preanalítica y no en el proceso analítico propiamente dicho.

A continuación se muestran los cromatogramas obtenidos mediante cromatografía gaseosa y detector de ionización de llama, de los extractos obtenidos luego del aislamiento practicado en los órganos de las víctimas fatales de la intoxicación por ingesta de jarabes de propóleos contaminados con DEG (Fig. 46, 47 y 48).

A) Cromatograma de extraído de vísceras.
 Condiciones de ensayo III-1-1.Método del standar externo.



B) Superposición de los cromatogramas de extraído de vísceras
 y de droga patrón dietilenglicol. (conc. 3ppm.)

Resultado positivo.Coincidencia para tr.3.85min.

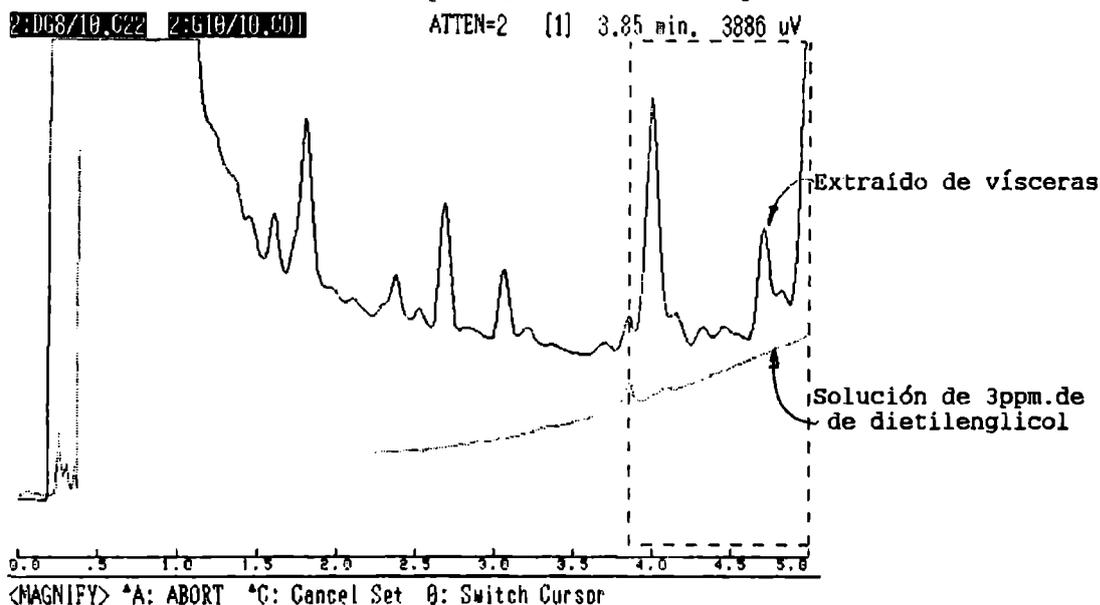
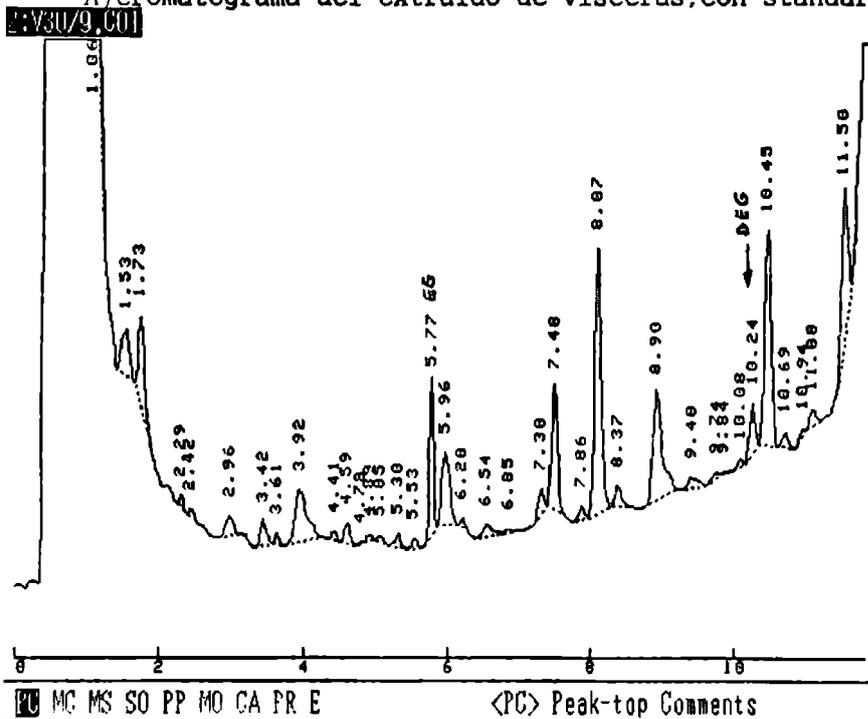


Figura 46 Cromatograma de un extracto visceral correspondiente a una de las víctimas del envenenamiento. Flujo de gas carrier a 20 cm³/min y temperatura de horno de 150°C, 1 min. luego a. 10°C/min hasta 200°C.

A) Cromatograma del extraído de vísceras, con standar interno.



B) Superposición del cromatograma de extraído de vísceras y el correspondiente a solución de standar interno (etilenglicol) con droga patrón dietilenglicol.

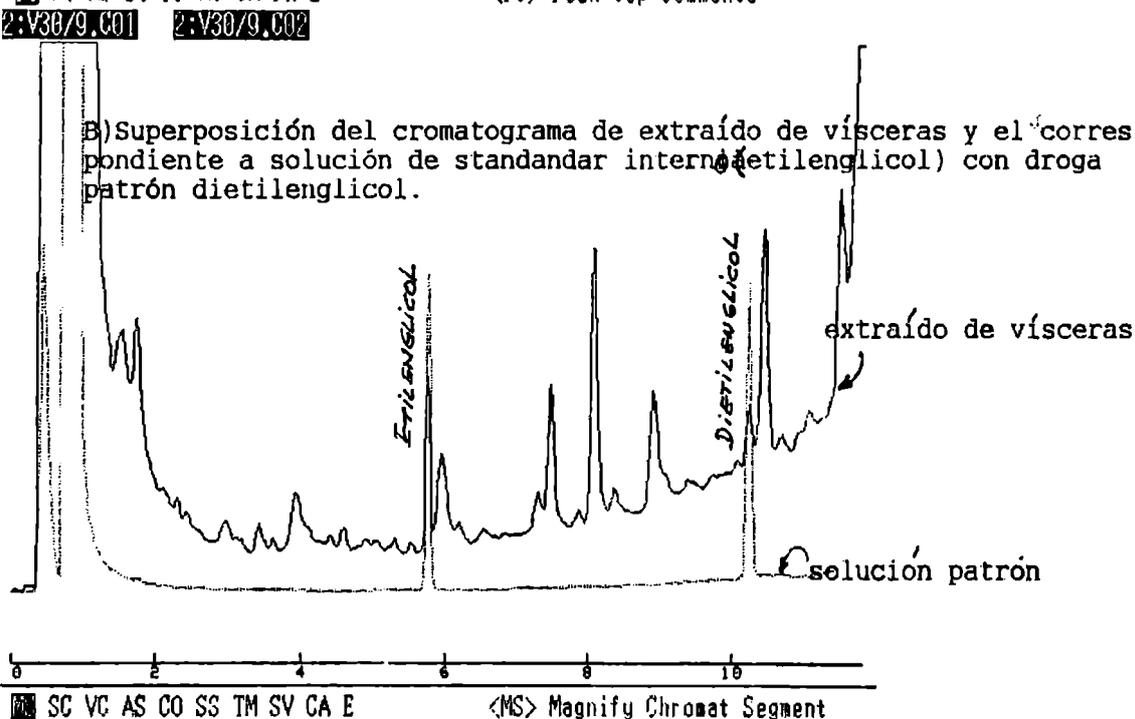


Figura 47 Cromatogramas correspondiente a la misma víctima cuyos cromatogramas precedentes se muestran. El ensayo fue realizado con carrier a 12 cm³/min y temperatura de horno 110°C, 2 min, grad. 8°C/min hasta Temp. final de 200°C. Obsérvese la buena separación y resolución de los picos.

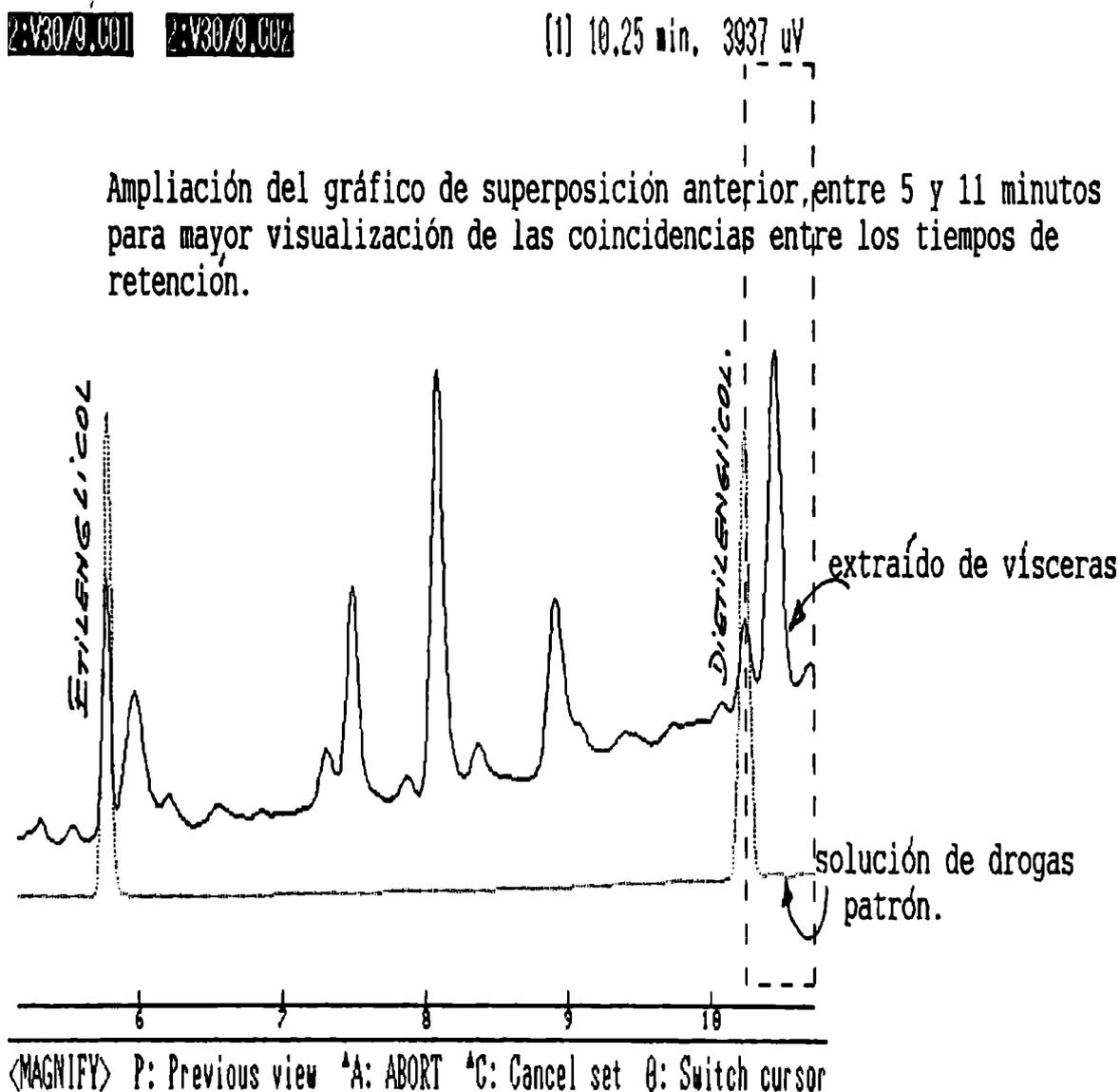


Figura 48 Cromatograma ampliado del análisis anterior, donde se observan el DEG y el EG como estándar interno y su aceptable resolución

En el cuadro siguiente pueden apreciarse interesantes datos sobre la detección post mortem del DEG, inclusive el tiempo de supervivencia y el tiempo desde la muerte hasta el inicio del estudio toxicológico en el laboratorio (Tabla 20).

Tabla 20 Víctimas en la que se consigna sexo, edad, tiempo de sobrevivida (TS), DEG en sangre y vísceras aplicación de terapia, tiempo transcurrido entre la muerte y el análisis en laboratorio (TPM).

Victima	edad	sexo	TS	DEGs	DEGv	terapia	T.P.M.	AM	DR	DH
1Z	59	F	21	-	-	Y	23	++	++	+++
2 a	56	F	11	-	-	N	198	++	++	+++*
3Cu	62	M	5	-	-	Y	2	++	+++	+++
4Y	60	F	7	-	-	N	54	++	+	+++
5L	57	F	3	+	-	N	62	++	++	+++*
6Ca	59	M	2	+	-	N	9	+++	++	+++*
7P	93	F	4	-	NR	Y	-	+++	+++	+++*
8M	66	M	8	-	NR	N	-	+++	++	+++*
9G	65	F	6	-	NR	N	-	++	NC	+++*
10Ga	66	F	6	-	NR	Y	-	+++	+	+++*
11Cr	50	M	10	-	-	N	13	++	++	+++
12Ru	54	F	6	-	NR	N	-	+++	+	+++*
13Ot	83	M	9	-	-	N	14	NC	++	+++
14 Fr	70	M	1	+	+	N	24	++	+++	+++
15Fa	60	M	5	-	-	N	36	+++	++	+++
16N	52	F	8	-	NR	N	-	++	++	+++*
17Nn	53	F	7	-	NR	Y	-	++	++	+++*
18D	50-60	M	D	NR	-	D	Exhumación	D	D	D*
19D	55-60	M	D	NR	-	D	Exhumación	D	D	D*
20NC	70-80	F	D	NR	-	N	214	NC	NC	NC*

Las últimas tres columnas indican el grado de acidosis metabólica (AM), tenor del daño renal (DR) y grado de daño hepático (DH), clasificados como: + leve, ++ moderado, +++alto.

NR: No recibido; D: Desconocido, NC: No consignado, Y: Si, N: No; F: femenino M: masculino; #

Extraído del informe de autopsia

El DEG fue detectado en hígado y en riñón en 4 de los 20 casos totales estudiados. Estas víctimas no sobrevivieron más de cinco días desde la ingesta del tóxico, aún administrándoseles terapia etílica como antagonista y hemodiálisis (Ferrari et al., 1997).

Respecto de las 16 víctimas fatales restantes, el no haberse encontrado el agente letal no indicó su desactivación en el caso que nos ocupa, estimándose que esto podría atribuirse al alto grado de putrefacción que poseían los materiales biológicos remitidos para la pericia. Obsérvese en la Tabla 20 que todas las víctimas acusaron severo daño renal y hepático además de considerable acidosis metabólica. Todos los occisos habían ingerido jarabe de propóleos cuyo análisis demostró el alto tenor de DEG.

En cuanto a la detección de DEG en sangre, nótese que solo uno de los tres pacientes tuvo una sobrevivencia de 3 días. Esto se halla en consonancia con los informes de casos recabados en la literatura universal que admite no haber detectado este alcohol en sangre de pacientes que sobrevivieron a la intoxicación pasadas las 12 a 48 horas de hospitalización (Geiling y Cannon, 1938; Calvery y Klampff, 1939; Bowie y McKenzie, 1972; Winek et al, 1979; Lenk et al, 1989; Stoichevich de Suñol y Wamba, 1992; Mathews et al, 1991; Ferrari et al, 1997, 2005).

Sin perjuicio a lo referido precedentemente, el diagnóstico etiológico de intoxicación con DEG fue realizado originalmente sobre la base de los síntomas presentados por las víctimas y los antecedentes de ingestión del jarabe contaminado. Aunque en la mayoría de los casos se desconoció la cantidad exacta que ingirió la víctima, se estableció, mediante investigación judicial y médica, que la incorporación diaria fue entre 5 y 20 ml de jarabe. Cuando hubo evidencia de una apreciable ingestión de jarabe las manifestaciones tóxicas, principalmente la falla renal, se manifestó más temprano; caso contrario, si la incorporación estimada fue de unos 5 mililitros las manifestaciones tóxicas se produjeron entre 3 a 7 días luego de la ingesta.

11.4 Manifestaciones clínicas características halladas en esta intoxicación masiva.

Las historias clínicas de todas las víctimas fatales y de diez sobrevivientes afectados mostraron un incremento en los niveles séricos de enzimas hepáticas, como las transaminasas glutámico oxalacética (TGO), glutámico pirúvica (TGP), la gamma glutamil transpeptidasa (GGT) y la láctico deshidrogenasa (LDH), todas estas desde niveles medios a severos. Quince casos mostraron niveles significativos de creatinfosfoquinasa (CK) y progresivo incremento de leucocitos (hasta 17.000 /mm³). El hematocrito decreció hasta un mínimo de

24, (un solo caso); en todos operó en descenso. La urea y la creatinina se incrementaron hasta la aplicación de hemodiálisis y/o plasmaféresis, donde a partir de aquí comenzaron a disminuir. La oliguria se manifestó en breve lapso (2 a 12 horas posteriores a la ingestión) llegando a la anuria completa en 24 a 48 horas. Todos los casos mostraron acidosis metabólica. Esta fue una de las características sobresalientes del caso en su faz clínica y se contraponen a la opinión de algunos autores (Geiling y Gannon, 1938; Lenk et al, 1989; Wax, 1996; O'Brien et al, 1998) que sostienen que la acidosis metabólica es moderada o leve. En nuestro caso todas fueron de medianas a severas prevaleciendo ésta última condición (ver Tabla 21).

En 12 casos la temperatura corporal se elevó a 38 o 39°C, una vez comenzado el cuadro de síntomas característico. Cuatro víctimas mostraron un alargamiento del segmento QT en el electrocardiograma. Quince de las 20 víctimas fatales presentaron excitación psicomotriz y severa hipotensión.

11.5. Análisis de los parámetros bioquímicos de medio interno

La Tabla 21 presenta los resultados de 15 pacientes estudiados. Estos 15 pacientes fueron escogidos entre los 20 casos analizados, en base a la mejor disponibilidad de los datos emanados de las historias clínicas y de muestras biológicas recibidas para su estudio toxicológico en el laboratorio.

Dado que una de las características más sobresalientes de este episodio fue la acidosis metabólica, se estudiaron aquellos índices vinculados con esta patología, pH, exceso de base (EB) y GAP aniónico (GAP). Otros índices, como el osmolar GAP, no pudieron ser estudiados por no estar consignados en las historias clínicas de los pacientes afectados.

Como puede verse en la Tabla 21, las víctimas fueron clasificadas en tres grupos, de acuerdo al tiempo de supervivencia (desde el ingreso al hospital hasta su muerte).

Los tres grupos fueron definidos como sigue:

Grupo I: pacientes que sobrevivieron hasta 3 días (tres casos)

Grupo II: pacientes que sobrevivieron entre 3 y 5 días (tres casos)

Grupo III: pacientes que sobrevivieron entre 5 y 21 días (nueve casos)

En todos los casos la hemodiálisis fue aplicada entre 1 y 6 días desde la ingestión de DEG, consonante con la aparición de síntomas severos de acidosis metabólica.

Tabla 21. *Parámetros del estado ácido base y concentraciones de DEG en sangre y vísceras en los 15 casos estudiados*

Grupo	Víctima	Sexo	Peso (Kg)	Edad (años)	DEG blood (mg/L)	DEG viscera (mg/Kg)	pH	EB (mEq/L)	GAP (mEq/L)
1	1	M	77	70	0.22	0.32	7.31	-13.1	34.4
	2	M	80	59	0.20	0.31	7.21	-12.0	32.0
	3	F	76	57	0.27	0.42	7.21	-11.1	33.1
2	4	M	91	60	-	-	7.42	-12.5	29.0
	5	F	75	93	-	NR	7.32	-11.5	30.5
	6	M	76	62	-	-	7.36	-12.9	31.0
3	7	F	94	54	-	NR	7.21	-9.1	31.7
	8	F	77	60	-	-	7.24	-8.7	30.0
	9	M	74	66	-	NR	7.32	-8.9	31.5
	10	M	86	50	-	-	7.45	-8.5	29.8
	11	F	93	56	-	-	7.10	-8.0	28.6
	12	M	89	83	-	-	7.30	-8.0	27.8
	13	F	92	59	-	-	7.36	-8.8	28.0
	14	F	71	65	-	NR	NR	NR	NR
15	F	68	66	-	NR	NR	NR	NR	

NR: indica que las matrices biológicas no fueron recibidas en el laboratorio.

La Figura 49 de la página siguiente, muestra la correlación de los parámetros ácido-base internos, observándose que los pacientes clasificados en el grupo I mostraron los mayores valores de GAP aniónico y consecuentemente los valores más bajos de EB (Fig.49a), además estos expresaron las manifestaciones clínicas más severas tales como anuria, fallo respiratorio y colapso, todo ello llevando a la muerte como máximo hasta los tres días. La acidosis da lugar a la generación de ácidos orgánicos produciendo así una marcada disminución en la concentración de bicarbonato sérico y un incremento del anión GAP.

El valor normal de GAP aniónico varía entre 10 – 16 mmol/L o 12 – 16 mEq/L (Jacobsen y McMartin, 1986). Este valor proviene del cálculo en el que inciden las cargas negativas de las proteínas (albúmina, ácidos grasos y sales inorgánicas).

Los pacientes pertenecientes al grupo II presentaron valores de EB también bajos pero con menores valores de GAP aniónico, mostrando como dato clínico relevante fallo renal y alteraciones cardíacas, fundamentalmente arritmias.

En cuanto a las víctimas del grupo III, los valores de EB fueron incrementándose de modo que no se mostraron con menores niveles negativos. Aquí se hallaron los signos de disfunción hepática, como los incrementos de las concentraciones séricas de TGO, TGP, GGT y LDH, desde niveles medios a severos. Asimismo se observaron incrementos de creatinfosfoquinasa (CK) en cuatro de los nueve casos y aumento progresivo del recuento de glóbulos blancos.

La Figura 49 b muestra la correlación obtenida entre pH y EB para cada uno de los pacientes.

Los valores de r^2 fueron 0.68, 0.99 y 0.55 para los grupos I, II y III respectivamente, lo que indicaría que existen diferencias en cada grupo de acuerdo al tiempo de sobrevida y los parámetros ácido–base analizados.

A pesar de la severidad del cuadro y a la mortalidad y morbilidad que acompañan la intoxicación con dietilenglicol, son muy pocos los datos fisiopatológicos informados acerca del origen de la acidosis metabólica. Los modelos experimentales en ratas muestran una concentración apreciable de ácido etoxihidroxiacético (HEAA) en orina de intoxicados (Wiener y Richardson, 1989; Lenk et al, 1989). Sin embargo otros autores sugieren que el camino metabólico sigue la ruptura de la unión éter del DEG transformándose en dos moléculas de EG y de allí, por biotransformaciones sucesivas, mediando enzimas y NAD como cofactor, hasta el ácido oxálico que produciría las deposiciones de oxalato de calcio en los túbulos renales (Morris et al, 1942; Herbert et al, 1978).

En el presente estudio, los exámenes histopatológicos en los riñones mostraron un intenso daño tubular pero sin deposición de cristales en las paredes del túbulo (Laguens, 1992). Esto sugiere que en seres humanos el DEG seguiría un camino metabólico diferente que el EG. La ruptura del puente oxígeno de la función éter no se produciría el daño tubular procedería de la acción directa del HEAA, con severa necrosis en riñones de animales experimentales, explicando así la anuria, además de la acidosis metabólica y el daño hepático (Wiener y Richardson, 1989; Ferrari et al, 1997; Ferrari y Giannuzzi, 2005).

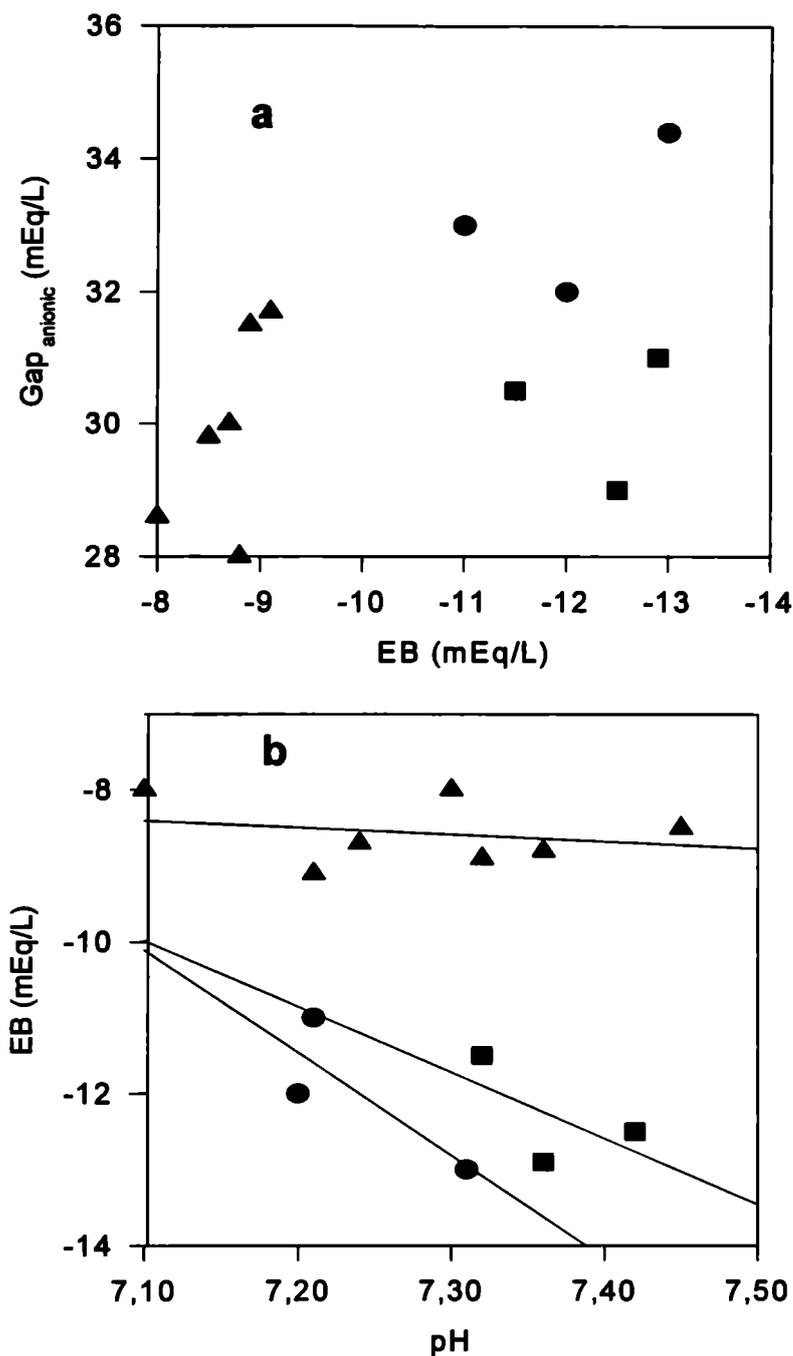


Figura 49 Correlación entre los parámetros ácido base en el episodio tóxico con DEG. a) EB vs GAP aniónico b) pH vs EB para ● grupo I, ■ grupo II, ▲ grupo III

11.6 Estimación de la dosis letal de DEG para el episodio

En la Tabla 22 se aprecia el alto porcentaje de DEG contenido en las muestras de jarabes de propóleos estudiadas en esta investigación; además presenta el valor de dosis ingerida por

kilogramo de peso corporal de cada víctima, considerando un consumo entre 5 y 20 ml de jarabe contaminado. Este último planteo surge del desconocimiento de la cantidad exacta ingerida por cada individuo intoxicado pero con la certeza de que se halla entre ambos extremos. También contamos con el peso de cada persona afectada sin haber sido necesario acudir a tablas u otros medios indirectos.

De acuerdo con el interrogatorio familiar y los datos aportados por los investigadores judiciales de la causa, la ingestión total estuvo comprendida entre 5 y 20 ml de jarabe de propóleos contaminado, aunque como fuera expresado con anterioridad la cantidad exacta es incierta. Cuando hubo presunción de una mayor ingestión de jarabe contaminado, evidenciado a través de la falla renal temprana y severidad de otros parámetros, se tomó el consumo extremo de 20 ml de jarabe de propóleos. En este caso la ingesta de DEG fue de 13,3 mg. Cuando los síntomas fueron más tardíos se tomó una ingesta teórica de 5 ml a lo que se corresponde con 4.8 mg de DEG. Se encontró así que el rango de dosis letal se halló entre 0.014 y 0.17 mg/ Kg de peso corporal.

La Fig 50 establece la relación dosis-respuesta entre DEG en mg/kg de peso corporal y el GAP aniónico determinado para cada víctima, tomando en cuenta dos extremos ciertos de consumo: 5 ml y 20 ml de jarabe contaminado.

Puede observarse una buena correlación entre la cantidad de DEG consumida y el GAP aniónico en las víctimas de los tres grupos definidos ($r^2=0.63$ para 5 ml de jarabe ingerido y $r^2=0.78$ para 20 ml.).

Este mismo gráfico también permite deducir que las víctimas pertenecientes al grupo I poseen el valor más alto de GAP aniónico independientemente de los dos extremos propuestos de dosis consumidas. Recuérdese que este grupo corresponde a individuos que sobrevivieron poco tiempo (hasta tres días) respecto de los otros dos. El grupo II contiene datos de GAP ubicados entre 29 y 31 mEq/L, es decir se encuentran en la región central del gráfico. En cambio el grupo III, cuyas víctimas sobrevivieron por más tiempo (hasta 21 días), poseen los datos más dispersados.

No debe perderse de vista que en esta intoxicación masiva las víctimas superaban en promedio los 60 años (rango: 50 – 93 años).

Nótese también que el porcentaje de DEG en los recipientes es muy alto (en la mayoría sobrepasa el 50%) comparado con los publicados en los dos episodios posteriores a nuestra intoxicación masiva: Bangladesh y Haití, donde se encontraron 20% y 14 % de DEG

respectivamente y como promedio de los recipientes contaminados en preparados oficinales de elixir de paracetamol (Hanif et al, 1995; O'Brien et al, 1998).

Tabla 22 Cálculo estimado de dosis ingerida de DEG en mg suponiendo un consumo entre 5 y 20 ml

Grupo	Victima	%DEG P/V	%PG P/V	DEG (mg) consumo: 5ml de jarabe	DEG (mg) consumo: 20ml de jarabe	DEGmg/Kg de peso corporal (consumo 5 ml jarabe)	DEGmg/Kg de peso corporal (consumo 20 ml jarabe)
1	1	55.0	32	2.7	11.0	0,0355	0,1421
	2	50.5	42	2.5	10.1	0,0316	0,1266
	3	66.5	30	3.3	13.3	0,0371	0,1746
2	4	46.0	31	2.3	9.2	0,0253	0,1011
	5	58.0	51	2.9	11.6	0,0387	0,1547
	6	56.5	33	2.8	11.3	0,0333	0,1333
3	7	59.9	34	2.9	11.8	0,0312	0,1247
	8	52.0	29	2.6	10.4	0,0338	0,1351
	9	53.5	25	2.6	10.7	0,0361	0,1444
	10	24.0	53	1.2	4.8	0,0140	0,0558
	11	54.0	42	2.7	10.8	0,0290	0,1161
	12	38.0	43	1.7	7.6	0,0191	0,0764
	13	39.0	32	1.9	7.8	0,0211	0,0844
	14	28.5	42	1.4	5.7	0,0197	0,0817
	15	29.0	32	1.4	5.8	0,0206	0,0838

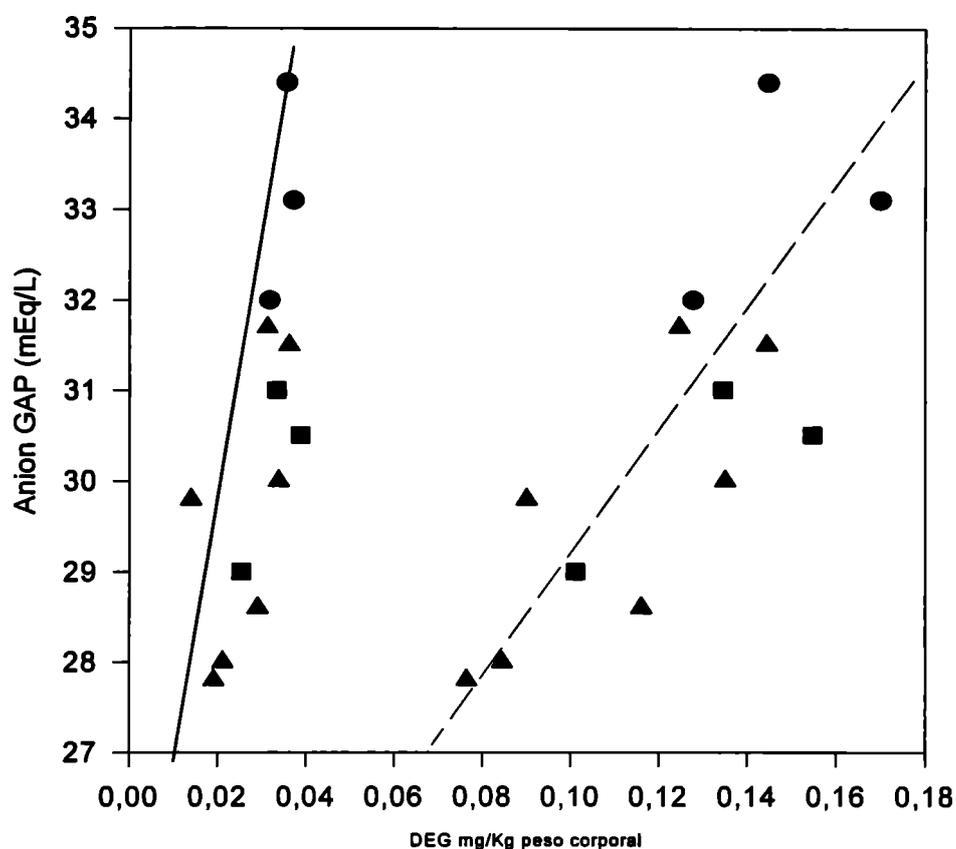


Figura 50. Relación entre dosis de DEG y GAP aniónico para 13 de las 15 víctimas estudiadas. ($r^2=0.63$ y 0.78). ● grupo I, ■ grupo II, ▲ grupo III

O'Brien et al (1998) efectuaron los estudios más completos de este tipo de episodio suministrando datos interesantes, que han sido cotejados con los obtenidos en nuestra investigación.

Los autores eligieron como muestra, niños o jóvenes menores de 18 años, pobladores residentes de Haití que ingresaban a los centros de salud con grave oliguria o anuria iniciada 24 horas antes o mayor tiempo. Tomaron, como punto de partida, el registro de ingresos en el Hospital General Universitario de Puerto Príncipe, desde noviembre de 1995 a mayo de 1996 y de 32 niños cuyas manifestaciones renales agudas no habían sido consignadas en los cinco años precedentes. En Junio de 1996 se inició una intensa investigación por parte de un equipo

integrado por más de cinco centros de investigaciones nacionales e internacionales. Para la obtención de la muestra poblacional solo se tuvieron en cuenta aquellos casos donde la historia clínica estaba completa, descartándose aquellas incompletas o cuyos parámetros clínicos o de laboratorio no eran compatibles con el cuadro epidémico. A diferencia de nuestros estudios, los autores de este episodio aplicaron HPLC/MS/MS para la identificación de DEG y en los jarabes que los familiares de algunas de las víctimas poseían como efectos, RMN. En aquellos casos donde no se disponía de recipiente se efectuó una estimación.

Lo interesante de esta publicación fue que se estimó una dosis tóxica máxima para el episodio. Un aspecto en el que disintimos con los autores es que efectuaron suposiciones sobre el peso de niños mediante el cálculo de su media, cuando el dato no era consignado en la historia clínica. Además, se asumió un porcentaje promedio de DEG en los recipientes (14.4%) aún en los casos donde no se pudo efectuar la determinación, por no tener disponible el envase del jarabe antifebril.

Asimismo, los investigadores reconocen que la posible acción hepatotóxica del acetoaminofeno podría sumarse a la del dietilenglicol y que la gastroenteritis previa pudo contribuir a la absorción del DEG y aumentar sus efectos tóxicos. Por lo tanto, en estos episodios (contemporáneos a nuestra intoxicación masiva), si bien fueron aportados datos concretos sobre el tenor de DEG en los jarabes, pocos detalles de laboratorio y otros parámetros clínicos importantes, por ejemplo medio interno, han sido ofrecidos.

Creemos relevantes los estudios efectuados en nuestro episodio, pues aportan datos novedosos en base a invalorable datos precisos que no pudieron señalarse en los informes antedichos; o bien porque los episodios más antiguos no fueron estudiados con los medios instrumentales y conocimientos avanzados de nuestros tiempos o porque los contemporáneos o posteriores solo fueron analizados mediante asociación estadística de casos con patología renal de origen dudoso y durante un lapso de tiempo relativamente largo y en forma retrospectiva.

Conclusión

Los valores más altos de GAP aniónico se obtienen en pacientes que han sobrevivido hasta 3 días. A medida que transcurren los días el GAP disminuye hasta valores que rondan los 27 mEq/L.

Los rangos de dosis letales hallados para esta intoxicación masiva son los más bajos registrados en la literatura universal, comprobándose así que la dosis letal del DEG depende del episodio considerado por lo que aún no ha podido ser establecida fehacientemente.

Los pacientes clasificados en el grupo I mostraron los mayores valores de GAP aniónico y consecuentemente los valores más bajos de EB.

La correlación obtenida entre pH y EB para cada uno de los pacientes, indicaría que existen diferencias en cada grupo de acuerdo al tiempo de sobrevida.

CAPITULO 12

COCAÍNA Y SUS PRODUCTOS DE BIOTRANSFORMACIÓN EN MATERIALES BIOLÓGICOS PROVENIENTE DE CADAVERES.

Con el objeto de analizar los resultados postmortem obtenidos en nuestro estudio es interesante incluir en la discusión los aportes recientes sobre la biotransformación de la cocaína *in vivo* e *in vitro*, ya que ello ayudará a una mejor interpretación de lo encontrado. Además, el conocimiento de las complejas transformaciones que sufre la droga en el organismo en vida, postmortem y también en circunstancias posteriores a la toma de muestra nos proporcionará un criterio más racional e inclusive permitirá evaluar como incide la vía de incorporación de la cocaína en los compuestos relacionados característicos que se generan.

Por lo tanto resulta imprescindible conocer el metabolismo del alcaloide en humores de personas vivas, en matrices diversas post mortem, en las muestras contenidas en los recipientes y por último la vía de ingreso utilizada para incorporarlo.

En los últimos años diversos estudios han permitido establecer niveles plasmáticos de la cocaína, permitiendo una interpretación más cabal respecto de las relaciones entre dosis, vías de administración y efectos, si bien se mantiene cierta incertidumbre. (Spiehler y Read, 1989; Jenkins et al, 1999; Isenschmid, 2004).

Las denominadas enzimas esterásicas desempeñan un importante papel en el proceso metabólico de la droga y tanto los seres humanos como otros mamíferos revelan elevados niveles de actividad esterásicas en diversos órganos incluyendo cerebro.

Las colinesterasas (colinesterasa plasmática, colinesterasa sérica, pseudo colinesterasas y colinesterasas específicas) desempeñan una función prominente en la degradación metabólica de la cocaína. Los individuos con baja o escasa actividad colinesterásica degradan igualmente al alcaloide aunque más lentamente. Al respecto es de señalar que la actividad enzimática puede variar en forma manifiesta en distintos individuos y entre distintas especies.

La Figura 51 muestra tres caminos metabólicos considerados fundamentales en la interpretación de consumos en individuos vivos y postmortem. Nótese que la vía señalada como 3 y que conduce a la formación de cocaetileno en presencia de etanol es tres veces más rápida que la vía que conduce a la formación de benzoilecgonina (BE), uno de los metabolitos hallados con mayor frecuencia en personas consumidoras.

Después de su absorción, la cocaína es degradada extensamente a por las esterasas hepáticas y séricas originando BE y liberando ácido benzoico y ecgonina.

La biotransformación del alcaloide genera entre otros, dos compuestos principales: benzoilecgonina y ecgonina metil éster (Inaba, 1989). Otros metabolitos menores incluyen a la norcocaína, que ha sido identificada en orina humana. (Ihang et al, 1990).

La vida media de la cocaína en plasma luego de una administración intravenosa o inhalatoria es aproximadamente de 39 minutos (Isenschmid, 1992).

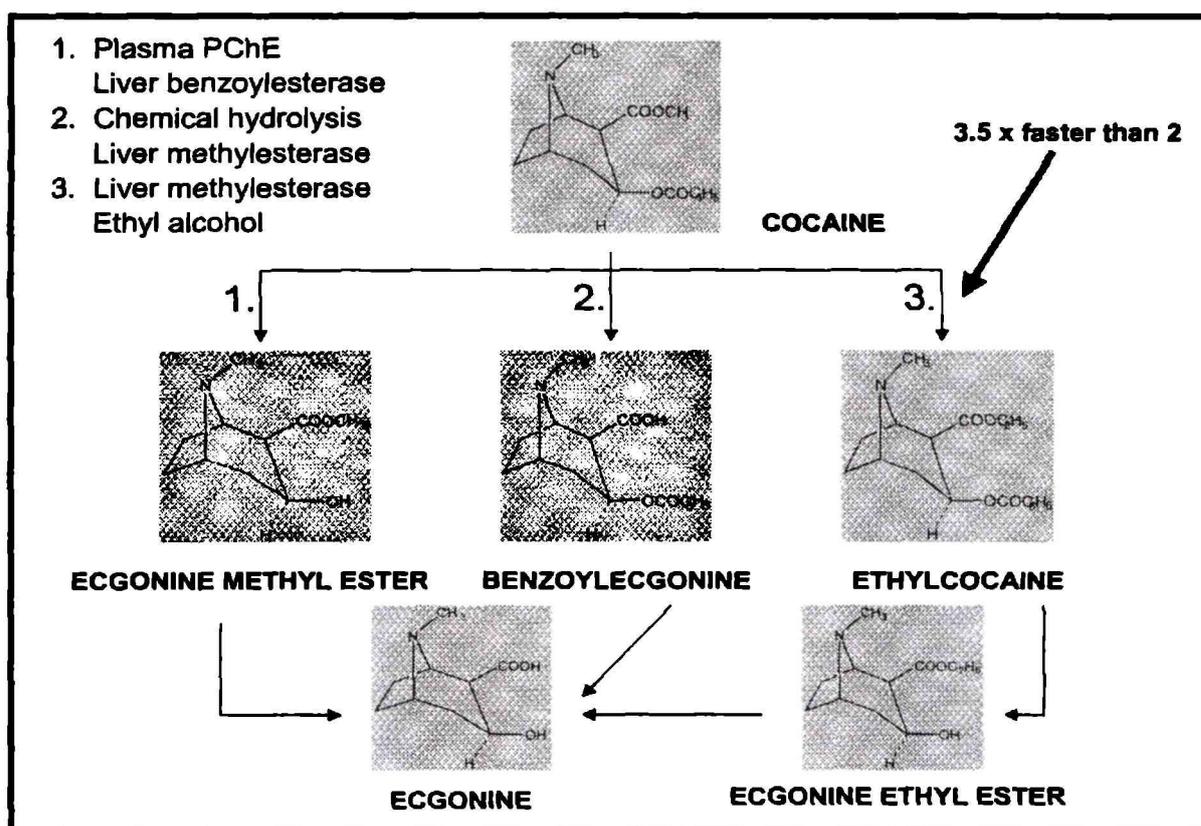


Figura 51 Camino metabólico más importante de la cocaína en tejidos humanos. Isenschmid, 2004- con permiso del Editor de la publicación del FBI)

La detección significativa de cocaína en plasma es casi inmediata luego de una administración intravenosa, intranasal e intrapulmonar. El tiempo de máximo efecto fisiológico es corto y la euforia disminuye entre los 30 a 60 minutos (20 minutos si es fumado).

Por otro lado, el hallazgo de compuestos relacionados con la cocaína proveniente del proceso de incorporación y de los metabolitos, pueden ser considerados como indicadores de las

diferentes vías de administración. Por ejemplo, por medio del fumado se generan productos de degradación térmica y compuestos provenientes de la transformación química y enzimática que pueden ser perfectamente cuantificables (vg: benzoilecgonina, etil metil ecgonina, ecgonina).

A continuación consignamos el rango de concentración en orina informado en la literatura internacional:

Ecgonina: 0 - 104 $\mu\text{g/ml}$.

Ecgonina metil éster: 0 - 177 $\mu\text{g/ml}$.

Benzoilecgonina: 0 - 107 $\mu\text{g/ml}$.

Cocaína = 0 - 122 $\mu\text{g/ml}$.

Hay también metabolitos que se generan en forma exigua y presentan ciertas dificultades en la cuantificación debido a su baja concentración. Por ejemplo: ecgonidina, ecgonidina metil éster, ecgonina metil éster, etil benzoil ecgonina, norcocaína, benzoil norecgonina, cinnamoilcocaína y cinnamoilecgonina.

En el momento de concluir este trabajo de tesis el autor ha encontrado informes muy importantes acerca de intentos de cuantificación de la norcocaína por medio de técnicas de alta resolución (HPLC-MS-MS). La importancia en la detección de la norcocaína radica en que ha sido hallada siempre como producto de metabolización endógena y nunca como compuesto de degradación externa o contaminante; por lo que hoy es considerada uno de los mejores marcadores de incorporación activa de la cocaína (Peterson et al, 1995; Isenschmid, 2004; Moffat et al, 2004).

12.1. Rutas principales de metabolización durante procesos enzimáticos

La cocaína es una droga sujeta a numerosas vías de transformación y reacciones de degradación (Stewart, 1977; Peterson et al, 1995; Isenschmid, 2004).

En la Figura 52 podemos apreciar los principales compuestos generados en la metabolización del alcaloide, apreciándose los procesos mediados por enzimas de aquellos que no las requieren.

Por otro lado, la formación de benzoilecgonina se realiza mediante la hidrólisis química del metil éster en un rango de pH entre 2.6 y 7.4.

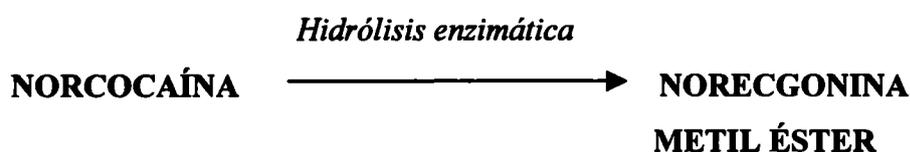
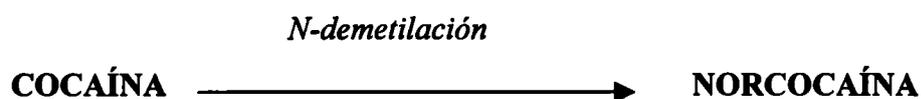


Tanto la EME como la BE han sido aisladas, identificadas y cuantificadas en consumidores de cocaína. La ecgonina es más difícil de hallar, tal vez debido a dificultades asociadas a la escasa concentración.

Las esterasas hepáticas y sanguíneas poseen menor afinidad por la benzoilecgonina, cuyo metiléster se hidroliza químicamente a pH fisiológico, motivo por el cual es razonable pensar que la mayoría de la ecgonina se forma a partir de ecgonina metil éster siguiendo la vía enzimática.

12.1.2. Vía pirolítica

Adicionalmente, otras rutas de ruptura de la cocaína resultantes de procesos pirolíticos involucran tanto al metabolismo enzimático como el hidrolítico; de ésta forma se hallarán en orina varios de los compuestos polares de cocaína como se aprecia en las siguientes reacciones:



Es decir, la cocaína sufre una N-desmetilación a pH fisiológico pasando a formar norcocaína. Dado que las enzimas hepáticas y séricas poseen similar afinidad por la norcocaína y la EME, se produce una hidrólisis enzimática generándose norecgonina metil éster. No obstante, cierta cantidad de norcocaína se formaría por vía de la hidrólisis química a partir de la cocaína.

12.1.3 Aril hidroxilación

Los grupos fenilo sobre la cocaína y benzoilecgonina sirven como sustrato para varias enzimas de hidroxilación aromática y reacciones de metoxilación. Los productos de éstas reacciones son muy difíciles de identificar en orina, tanto humana como de animal, debido a sus bajas concentraciones. Se formaría así, hidroxicocaína que fue hallada en bilis humana (Lowry et al, 1979).

12.1.4. Trans-esterificación

La etilbenzoilecgonina, comunmente denominada como etilcocaína o cocaetileno, es formada en el hígado y resulta de la transesterificación enzimática de la cocaína en presencia de etanol (Hearn et al, 1991; Dean, 1991; Isenschmid, 2004; Moffat et al, 2004).

En el hígado humano no sólo se produce la transesterificación por actividad de las isoenzimas sino también por una hidrólisis catalítica sobre la cocaína dando como producto la BE.

La formación de etilbenzoilecgonina es relevante en este contexto debido a su neurotoxicidad (Jatlow, 1991). Por otro lado es un indicador de consumo conjunto de cocaína y etanol de consecuencias importantísimas en el ámbito forense.

Análogamente, por hidrólisis química de la función etil éster, la etilbenzoilecgonina produciría benzoilecgonina y por hidrólisis enzimática, ecgonina etil éster.

En 1979 se identificaron y cuantificaron en orina humana etilbenzoilecgonina y ecgonina etil éster, pero su significado no fue conocido en ese momento (Rafla et al, 1979). Con posterioridad, los derivados de la etilbenzoilecgonina, 3'-hidroxi-4'-hidroxibenzoilecgonina etil ester y 4'-hidroxi-3'-metoxibenzoilecgonina etil ester fueron hallados en orina y analizados en forma cualitativa (Smith et al, 1984).

12.2. Otros alcaloides

Otros alcaloides fueron extraídos junto a la cocaína de las hojas de la *Erythroxylum coca* (Jacob et al, 1990; Moore et al, 1994).

De estos congéneres el más importante es la cinamoilcocaína, presente en más de la mitad de las muestras ilícitas de cocaína incautadas. La cinamoilcocaína se encuentra frecuentemente en muestras de orina provenientes de consumidores consuetudinarios de cocaína.

La hidrólisis de los derivados metil o benzoil ésteres de la cinamoilcocaína produce cinnamoilecgonina y ecgonina metil ester junto con ácido cinámico.

La hidroxilación del grupo fenilo de la cinamoilcocaína, análogo a la formación de hidroxicocaína, produce varios derivados hidroxilados.

La cinamoilcocaína por transesterificación y en la presencia de etanol produce sus etil-análogos: etilcinamoilecgonina o “cinamoilcoetileno”.

No existen evidencias que sugieran que estos compuestos, del mismo género que la cocaína, sean farmacológicamente activos o contribuyan a los efectos toxicológicos imputados al uso de la cocaína. No obstante se ha publicado que la cinamoilcocaína podría hallarse en orina como vestigio en personas consumidoras activas de cocaína por medio del fumado (Peterson et al, 1995). En nuestra experiencia, no solamente en muestras de orina, sino también en otras matrices biológicas, v.g: pelos y uñas (Arado et al, 1999; Arado y Ferrari, 2000).

Estudios de cocaína en orina de seres humanos han demostrado que si una muestra es recolectada más de 12 horas después del consumo inicial de la droga, podrá ser detectada muy poco o nada de ella. Por otro lado, si la cocaína se detecta en la orina, su administración se produjo a lo sumo 12 horas antes de la recolección de la muestra. Este período se tomó sólo como presuntivo ya que depende de numerosos factores, muchos de ellos individuales. La benzoilecgonina, el principal metabolito, puede ser detectado hasta 36 horas después de la administración de cocaína y permanece en concentraciones muy bajas hasta las 60 horas (Baselt, 2000).

Lo señalado precedentemente se ilustra en la Figura 53, que muestra el curso de eliminación de la cocaína intacta y la benzoilecgonina en el tiempo.

diagrama de eliminación de cocaína y metabolitos en orina

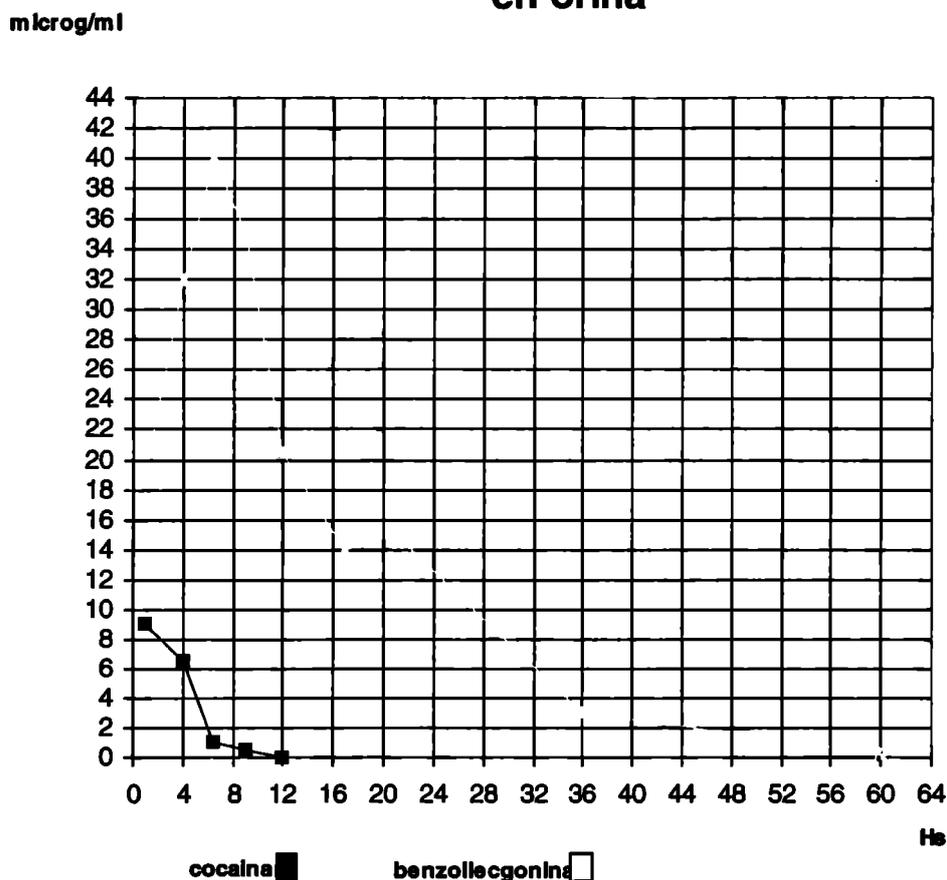


Figura.53. Concentraciones de cocaína y benzoilecgonina en función del tiempo, determinadas en orinas de consumidores

12.3. Interpretación de los resultados obtenidos del estudio de cocaína y sus productos de biotransformación en personas vivas.

En orina humana se demostró que sólo el 1-9% era eliminada sin cambios y el 35%-54% como benzoilecgonina (Baselt, 2000).

En sangre, el pico de máxima concentración se produjo alrededor de 1 hora después de ser administrada (Guatelli, 1989).

En saliva, investigaciones recientes de Cone (2001), han establecido que la cocaína puede detectarse luego de una inyección intravenosa, demostrando que la misma atraviesa las glándulas salivales, proveniente de la circulación general y no como residuo de una administración oral o nasal. La concentración de la cocaína en saliva es más alta que en

plasma. Las técnicas inmunológicas permiten detectarla tan lejos como 10 días después de su incorporación (Cone y Weddington, 1989).

12.4. Estabilidad de la cocaína y sus productos de biotransformación en diversos órganos durante el proceso postmortem

La concentración de cocaína observada en tejidos de víctimas que sucumbieron a la droga varía enormemente dependiendo, entre otros factores, de la dosis, de la vía de administración y de si existen afecciones cardíacas en el individuo.

Contrario a las creencias de unos años atrás, la cocaína ha sido hallada varios meses, inclusive un año y medio después del óbito (Nieto et al, 1999; Garrote et al, 2001; Isenschmid, 2004).

En la Tabla 23 se consignan los resultados alcanzados en nuestra investigación. Los detalles y criterios de selección de los ocho casos fueron referidos en el Capítulo 7.

Tabla 23. Cocaína y sus metabolitos en 8 casos postmortem.

<u>Víctima</u>	<i>PM-t</i> (días)	Hígado	Riñón	Cerebro	Sangre	Orina	Contenido estomacal
1*	1	---	---	CO	-	BE	---
2	15	CO, EME		CO			
3	120	CO, EME	CO, EME	CO, EME			
4	15	CO	CO	CO ^b			
5 ^c	32			CO	CO	CO	ND
6	90			CO ^b			
7	18	CO, EME, CC	CO, EME, CC	CO, EME, CC			
8	18	CO, CE	CO, CE	CO, CE	EME		ND

PM-t: tiempo postmortem, CO: cocaína, ME: metilecgonina, CE: cocaetileno, M: otros metabolitos de cocaína, CC: cinamilcocaína, - negativo, ND: no determinado, NA: datos no disponibles, --- muestra no remitida.

^a metilecgonina y (BE) benzoilecgonina, ^b en cerebro licuado, ^c cocaína positiva en hisopado nasal

^d cocaína and cinamoilcocaina en hisopado nasal, ^d cocaína positivo en hisopado anal

Obsérvese los casos 2, 3, 4, 7 y 8 donde se consigna el hallazgo en hígado de droga madre y un metabolito de transformación más complejo, como lo es la ecgonina metil éster (EME). A esta altura puede sorprender la ausencia de benzoilecgonina (BE), salvo el caso 1, como producto de biotransformación primaria. Repasando las numerosas biotransformaciones y reacciones de degradación de la cocaína, señaladas en este capítulo, se halló pronta respuesta por la vía de las esterasas hepáticas, siendo éstas enzimas las responsables de la transformación de cocaína en EME. Esta se hace extensiva a otros órganos como cerebro y riñón, aunque en menor escala.

Asimismo, recuérdese que la formación de BE a partir de cocaína sigue una ruta de hidrólisis química del metil éster en un rango de pH entre 2.6-7.4, pudiendo comprobarse en el caso 1, su hallazgo en orina.

En el caso 8 se señala el hallazgo de cocaetileno, resultante de la transesterificación enzimática de la cocaína en el hígado y en presencia de etanol. Adicionalmente, su hallazgo en riñón indicaría el camino de detoxificación que sigue la etil benzoil ecgonina para ser eliminada finalmente en orina. Téngase en cuenta que Randall (1992) y Giroud et al (1993) han informado que hallaron cocaetileno en orina, por lo que creemos que nuestra interpretación es sustentable.

Asimismo, el caso 8 refiere el hallazgo en sangre de EME, lo que reveló una alta actividad por la vía de las esterasas sanguíneas. Inclusive la misma muestra analizada 70 días después del primer análisis, mostró concentraciones de EME.

No obstante, en otro caso forense relevante pudimos determinar que la EME hallada en la sangre de un individuo se había originado en un proceso de transformación posterior a la toma de muestra y como consecuencia de la ausencia de NaF como preservante y no por una incorporación activa.

Podemos concluir entonces que la formación de EME postmortem respondería a dos rutas posibles: la metabólica de origen endógeno y la producida por acción química o enzimática en el recipiente que contiene la muestra.

En este punto, principalmente Isenschmid (2004) y con anterioridad otros autores (Garret et al, 1994; Skopp y Poetsch, 2001; Klingmann et al, 2001; Skopp et al, 2001), habían deslizado esta idea que queda plasmada en esta investigación.

Por otro lado existe en nuestro medio una situación particular, que no es consignada en bibliografía: la de existir casos en los que se sospecha un agregado *ex profeso* de cocaína a

los cuerpos o pertenencias de las víctimas. Ello complica seriamente la interpretación médico-legal sobre la incorporación sistémica y voluntaria de la droga. Por solo citar dos casos que conmocionaron a la opinión pública y tuvieron amplia repercusión periodística: los casos “María Soledad” y “Nair Mustafá”, donde estuvo en entredicho la posible contaminación de los tejidos de las víctimas con el objeto de complicar las investigaciones criminalísticas de los casos.

Los argumentos esgrimidos precedentemente nos permitieron arribar a una interpretación amplia y criteriosa para discernir esta encrucijada.

A continuación hemos analizado los hallazgos de cocaína en cerebro para los casos 1 al 8. La presencia de droga madre en este órgano, reveló su capacidad de incorporar, conservar y proteger la cocaína de las rápidas metabolizaciones ocurridas en otros tejidos. Posiblemente esto se deba a su elevado contenido en lípidos y porque en cerebro no se realiza la degradación de cocaína por vía hidrolítica.

Isenschmid (2004) ilustró bien este aspecto, retomando los trabajos de respetados investigadores y especialistas en cocaína. Los hallazgos de cocaína en cerebro de los ocho casos estudiado por nosotros coincidieron con la interpretación de Sphielier y Reed (1989), quienes expresaron que la concentración de la droga intacta en el órgano les permitía inferir los guarismos en sangre en tiempos cercanos al óbito, si el cerebro era resguardado en congelación a -20°C . Esta consideración nos resultó peculiarmente importante en los casos de exhumaciones, ya que la droga madre cocaína constituiría un parámetro fidedigno de consumos activos, más aún ante la ausencia de benzoilecgonina, dada su escasas posibilidades de generación a partir de la cocaína por vía hidrolítica. Asimismo estos autores consignan que la concentración de cocaína en cerebro excede siempre la de sangre, dato este no menor si se cuenta con ambas matrices, a la hora de evaluar incorporaciones activas o contaminaciones. Nosotros hallamos cocaína intacta en muestras no refrigeradas (casos N° 3, 4, 5 y 6) lo que permite ampliar la aplicación no solo a órganos congelados sino también a los que se encuentran resguardados a temperatura ambiente.

En base a ello propusimos ampliar estas consideraciones a casos de exhumaciones concluyendo que en estas circunstancias la presencia de cocaína y la ausencia de benzoilecgonina en cerebro serían indicación de incorporación sistémica; mientras que la existencia de benzoilecgonina alertaría sobre una posible adulteración (véase la columna correspondiente a cerebro en la Tabla 23)

Por estos motivos resulta indispensable contar con el cerebro para poder detectar la droga intacta, que sería representativa de aquella en el momento del óbito. Obtuvimos así un parámetro fidedigno de consumos activos. Recordemos que la sangre, dada su alta actividad metabólica, no ofrece dicha posibilidad.

12.3.1 Estudio de la cocaína y sus metabolitos en diversas matrices: interpretación forense

En el primer caso (caso 1), se tuvieron datos certeros que la incorporación fue por vía inhalatoria, ya que el análisis del hisopado nasal arrojó resultados positivos para cocaína y benzoilecgonina (confirmado por GC-MS). Por otro lado el hallazgo de BE en orina nos sugirió que la administración fue anterior a las 60 o 72 horas del óbito. Dado que el cerebro demostró contener cocaína intacta, su detección nos permitió confirmar su incorporación activa y descartar la contaminación. Nótese que en sangre el resultado es negativo no pudiendo elaborarse hipótesis alguna.

Por otro lado, el solo hallazgo de norcocaína marcaría la diferencia entre un ingreso pasivo y/o contaminación externa y un ingreso activo de sustancia, siendo éste un producto de biotransformación in vivo e indubitado a partir de cocaína por N-desmetilación a pH fisiológico. El producto de esta reacción es muy difícil de identificar debido a sus bajas concentraciones. (Kloss et al, 1984; Giroud et al., 2004). En nuestro laboratorio no hemos podido hasta hoy identificarla en ninguna de las matrices biológicas utilizadas en la rutina, inclusive con equipamiento de alta resolución y sensibilidad (v.g: GC-MS, HPLC-DAD). Futuras investigaciones serán necesarias para llegar a un nivel de detección óptimo y su posible aplicación como marcador indubitable de consumo activo de cocaína.

No hemos evidenciado en los casos analizados la ruptura de la molécula de cocaína a partir de un proceso pirolítico ya que la anhidroecgonina metil éster (metabolito proveniente de la pirólisis) en orina no fue detectada, por lo que dedujimos que en estas muestras la cocaína no fue incorporada por vía de fumado. Si este metabolito hubiera sido hallado podríamos haber inferido la vía de administración.

12.4. Interpretaciones forenses cuando se incorporan los datos de matrices alternativas a las tradicionales.

Como fuera dicho en la introducción, los estudios efectuados en matrices alternativas como pelo han proporcionado hallazgos sorprendentes.

Para la investigación que nos ocupa hemos estudiado cuatro casos representativos de exhumaciones, donde se vió que las matrices alternativas mejoran la interpretación médico legal de casos complejos.

En la Tabla 24 se ofrecen los resultados de dichos análisis efectuados en diversas matrices. En los cuatro fallecidos, la judicatura requirió la averiguación de la causa de muerte por motivos dudosos y a pedido de familiares.

Tabla 24. Resultados de los estudios de cocaína y metabolitos en diversas matrices alternativas y en vísceras (putrúlagos)

CASO	Identif	Tiempo: Exhumaciones	Cabello	Vello Púbico	Vello Axilar	Visceras Putrúlagos	Sangre	Orina
1	NN Masc.	7 meses	Coc/BE	Coc	NR	Negativo	NR	NR
2	NN fem.	2 meses	Coc/BE Lidocaína	Coc	Coc	Negativo	NR	NR
3	NN fem.	3 años y 4 meses	Coc/BE	Coc/BE	NR	NR	NR	NR
4	NN fem.	6 años	Coc/BE	Coc/BE	NR	NR	NR	NR

NR: muestra no recibida en el laboratorio; Coc: cocaína; BE. benzoilecgonina.

En la Tabla 24 podemos observar lo siguiente:

1. En ninguno de los casos aquí estudiados se hallaron disponibles muestras de orina y sangre. En putrúlagos (denominamos así a las vísceras que se hallaban disgregadas, en estado indiferenciado) dos de los cuatro casos arrojaron resultados negativos para los análisis señalados. Se consignó además, el tiempo transcurrido entre la muerte y la autopsia luego de la exhumación.
2. En todos los casos el análisis del cabello mostró la presencia de cocaína y benzoilecgonina, pudiéndose evidenciar en el caso 2 una sustancia que normalmente es utilizada como adulterante o corte (lidocaína)
3. En vello púbico los primeros dos casos señalaron la presencia de cocaína, mientras que los dos restantes acusaron además la presencia de benzoilecgonina.
4. El caso 2 evidencia únicamente la cocaína en vello axilar.

Es importante destacar que estos hallazgos postmortem en tiempos largos, indicarían una incorporación activa por parte de la víctima en forma mediata, que no reflejaría lo ocurrido en momentos próximos al óbito.

Por otro lado la concentración de cocaína madre en pelo pericraneal se mantuvo, al menos en dos casos, en niveles superiores que en vello pubiano, oponiéndose este resultado a la postura de algunos investigadores que señalaron la inversión de la relación concentración de cocaína en pelo pericraneal/vello pubiano postmortem (Offidiani, 1993; Moeller, 1996; Tsatsakis, 1997). En nuestra opinión no habría razones de peso para pensar que la droga pudiera concentrarse por algún mecanismo luego de la muerte y que elevara la concentración en el vello pubiano. Por tanto consideramos a la inversión de relación de concentraciones de cocaína en pelo pericraneal versus vello pubiano no determinante.

Además, observamos que los líquidos de lavado fueron negativos para cocaína y benzoilecgonina en los cuatro casos analizados, por lo que podemos descartar una contaminación externa mediante la investigación de estos.

En base a este razonamiento nosotros tomamos al líquido de lavado como un factor fundamental para discutir una incorporación activa de una contaminación.

Por otro lado, si el líquido de lavado hubiera arrojado resultados positivos, habríamos sospechado una contaminación pasiva con posible daño capilar y el consiguiente ingreso a la matriz por parte de la droga madre e inclusive metabolitos que se hubieran formado por hidrólisis química fuera de este ámbito.

Asimismo, hemos tomado la relación cocaína/benzoilecgonina mayor a 1 para presumir que la cocaína proviene de incorporaciones activas, ya que si la relación fuera invertida indicaría que la droga madre sufrió procesos de transformación fuera del contexto capilar, sospechándose así la posible adulteración de la muestra.

No encontramos en las referencias bibliográficas consultadas ninguna cita que estime la concentración de benzoilecgonina por sobre la concentración de cocaína en cabello. En línea con esta postura, Wennig (2000) ha hecho hincapié en que las relaciones de cocaína/benzoilecgonina en pelo pericraneal deberían mantenerse altas (según el autor en la relación 50/1 aproximadamente).

En la Tabla 25 se muestran los valores cuantitativos, tomando como resultado positivo guarismos mayores a 0.5 ng/mg de pelo, que son los valores de corte aceptados internacionalmente (Flanagan, 1999; Wennig, 2000; Kintz, 2004). Este valor indica que la

cuantificación es dudosa pero cercana al valor de corte, teniendo valor como vestigio. Nd: significa que no fue detectada.

Como puede verse en la Tabla 25, las concentraciones de cocaína exceden siempre a las de benzoilecgonina, sin embargo la relación 50/1 citada más arriba se aleja bastante en nuestras muestras, por lo que deduciríamos que en casos de exhumaciones la relación señalada no se cumple con tanto rigor como en casos de personas vivas que cita la bibliografía. Sin embargo la cocaína intacta permanece en valores superiores al metabolito y esta sería la propuesta desde nuestra investigación: que la relación cocaína/benzoilecgonina debería ser mayor a uno, caso contrario deberíamos revisar la investigación con el propósito de descartar o confirmar una posible adulteración o contaminación de la muestra.

Tabla 25. Concentración de cocaína (COC) y benzoilecgonina (BE) en cuatro casos de exhumaciones en pelo pericraneal y púbico, expresados en ng/mg de pelo.

Caso	Cabello COC	Cabello BE	Vello púbico COC	Vello púbico BE
1	1.2	0.9	0.5	Nd
2	2.5	1.0	2.1	Nd
3	<0.5	<0.5	<0.5	<0.5
4	<0.5	Nd	<0.5	Nd

En tanto, el vello axilar constituye otra matriz alternativa pasible de investigación para consumos de cocaína previo a la muerte, principalmente ante la ausencia de pelo pericraneal y/o púbico. La moda actual de rapado de cabeza entre los jóvenes justificaría el estudio de este tipo de vello.

Investigaciones más profundas deberían encararse en el futuro para elucidar con más claridad y precisión el hallazgo de otros metabolitos, que por su baja concentración, no pueden detectarse en la actualidad (v.g: norcocaína, único compuesto que determina un consumo activo) con los métodos analíticos. El avance tecnológico seguramente permitirá llegar a niveles debajo del picogramo y revelar muchas sustancias que serían tenidas por marcadores de incorporación activa.

En estas consideraciones sienta sus bases la propuesta que se hace desde esta investigación en la necesidad de contar con la **mayor cantidad y diversidad de matrices tradicionales y no tradicionales para una mejor interpretación médico-legal de los hallazgos en el laboratorio.**

CONCLUSIONES

I. Acido cianhídrico y monóxido de carbono en incendios de goma espuma de poliuretano.

- A través del estudio estadístico hemos podido establecer una correlación entre las concentraciones de HCN y CO en este episodio, accediendo a una expresión matemática, que hemos denominado "IL" (índice de letalidad), que permite efectuar comparaciones con las concentraciones de los gases tóxicos en sangre, generando un gráfico con cuatro zonas bien definidas, en las que en cada una de ellas puede predecirse la prevalencia de uno u otro, o bien ambos tóxicos en la causa de muerte.
- Mediante el estudio de materiales biológicos pudimos inferir que la combustión de poliuretano generó atmósferas de alta concentración de ácido cianhídrico como para provocar la muerte casi inmediata de las personas expuestas en un ambiente reducido, teniendo poca o ninguna influencia el monóxido de carbono en la intoxicación; conclusión que se halla en línea con la temperatura que alcanza la combustión del polímero, mucho más elevada que la necesaria para escindir el grupo funcional ciano del mismo; además el corto tiempo en que la descomposición transcurre, justificando así la liberación masiva de HCN y el escaso guarismo de CO registrado en la sangre de las 35 víctimas estudiadas.

II. Factores físicos y químicos que afectan la integridad del alcohol etílico en casos postmortem y post toma de muestra.

- En respuesta al planteo de los objetivos citados, hemos podido comprobar que las pérdidas de etanol en sangre operan mayoritariamente por factores físicos, y químicos (oxidación del etanol por el oxígeno del aire) y en un grado que depende de la cámara de aire que existe en el recipiente de la muestra hemática contenida en él. Los productos de putrefacción parecen no incidir en las pérdidas y/o generación del analito, cuando este es analizado por metodología de cromatografía gaseosa con detector de ionización de llama. Otros métodos basados en reacciones redox coloreadas podrían sufrir modificaciones por el carácter reductor de alguno de los componentes provenientes de la putrefacción.
- La preservación de la sangre entera a bajas temperaturas, con el agregado de NaF y sin cámara de aire ofreció un resultado repetitivo a través del tiempo, al menos hasta los

30 días. La conservación de muestras de sangre entera a temperatura ambiente provocó importantes pérdidas llegando hasta el 100% en el caso de 65% de cámara de aire en el envase. .

- Mediante el estudio de la cinética de decaimiento de la concentración de etanol en sangre entera se demostró que la velocidad de decaimiento del etanol aumenta en función del incremento del porcentaje de cámara de aire y de la temperatura. Para el almacenamiento a -10°C se predijo que el etanol disminuye en recipientes sin cámara de aire a la mitad a los 909 días, mientras que a 25°C esa disminución se logró a los 100 días. Sin embargo, con 35% de CA en el envase la concentración de etanol en la muestra disminuyó a la mitad a los 21 días a 4°C y solo 9 días a 25°C .

III. Factores físicos, químicos y biológicos que deben tenerse en cuenta en las intoxicaciones con alcohol metílico. Rol del ácido fórmico como principal metabolito tóxico.

- El metanol no puede ser considerado como un parámetro fidedigno en el pronóstico de sobrevida, principalmente cuando han transcurrido entre 36 a 48 horas y menos aún tomarse el dato emanado del informe analítico para aseverar que el mismo sea o no el causante del óbito en un análisis post mortem con fines forenses. Por lo que debemos considerar al ácido fórmico, más bien que el metanol, como el agente tóxico más importante. Por tanto, un estudio exhaustivo de la distribución del ácido fórmico en los órganos de cada víctima se impuso para este fin.
- La concentración de ácido fórmico en sangre correlaciona bien con la concentración en cerebro ($r^2=0.86$) e hígado ($r^2=0.69$) y poco para sangre vs. pulmón ($r^2=0.56$). La mejor correlación entre órganos fue hallada para pulmón vs riñón para cada grupo definido, con $r^2=0.91$, 0.84 y 0.87 para los grupos 1, 2 y 3 respectivamente. Esto último resultó muy importante porque, transcurridos dos o tres días de la intoxicación y con ausencia de alcohol metílico en sangre, la relación entre órganos, principalmente pulmón/ riñón, permitiría efectuar una mejor interpretación sobre el causal de óbito en estas intoxicaciones.
- La expresión matemática que fue definida para LI (índice de letalidad) ayuda a la interpretación del grado de toxicidad del episodio considerado y permite asociar dicho guarismo a las concentraciones de ácido fórmico en distintos órganos de las víctimas

(v.g: hígado, pulmón, cerebro y riñón), teniendo en cuenta el tiempo de sobredosis y el tipo de terapia aplicada; comprobándose así que el modelo predictivo solo es válido para pacientes sometidos a terapia etílica y no a hemodiálisis.

- La introducción del índice de letalidad, IL, y las relaciones de concentración de ácido fórmico entre órganos permite arribar a la conclusión del causal de óbito, además de presentar una buena correlación con la suma de concentraciones de ácido fórmico en hígado, pulmón, cerebro y riñón ($r^2 = 0.80$).
- Las concentraciones de ácido fórmico correlacionaron bien con los efectos clínicos y con la severidad del cuadro clínico en seres humanos, corroborando las investigaciones de Liesivuori y Savolainen (1991) efectuadas en especie animal.

IV. Factores que inciden en la detección y estabilidad del dietilenglicol

- Cuando el extracto metanólico obtenido en el aislamiento, es resguardado en heladera a temperaturas entre 2 – 4°C, se observó una sustancia semicristalina adherida a las paredes del recipiente que hizo negativo el ensayo analítico. El fenómeno fisicoquímico es relevante a la hora de evaluar la existencia del tóxico en el extracto proveniente del aislamiento.

Pudo demostrarse la existencia de ácidos grasos, principalmente ácido palmítico, ácido esteárico y ácido oleico en un 57 % y fosfolípidos, tal como la fosfatidiletanolamina y esfingomiélin en un 37%; el 4% restante se halló constituido por esteroides. En base a la composición lipídica de la fracción que se formó por enfriamiento del extracto metanólico obtenido en el proceso de aislamiento del DEG del material biológico, fue posible plantear un posible mecanismo de retención del dietilenglicol por formación de una fase mesomórfica, dada la cantidad de fosfolípidos presentes, los que retendrían al dietilenglicol por interacciones de tipo polar, formándose al mismo tiempo una solución sólida con los ácidos grasos libres presentes y que producirían un resultado falsamente negativo en la fase analítica.

- Las dosis letales calculadas para el episodio descrito se hallaron en un intervalo de 0.017 a 0.14 mg DEG/ Kg de peso, guarismos estos muy inferiores a los informados en otras intoxicaciones masivas, por lo que la dosis letal del DEG no puede ser deducida de modelos animales experimentales sino de cada episodio considerado.

- Se ha verificado la correlación entre varios parámetros ácido-base internos, observándose que los pacientes clasificados en el grupo I mostraron los mayores valores de GAP aniónico y consecuentemente los valores más bajos de EB, además estos manifestaron los síntomas clínicos más severos tales como anuria, fallo respiratorio y colapso; todo ello llevando a la muerte como máximo hasta los tres días, produciendo una marcada disminución en la concentración de bicarbonato sérico y un incremento del anión GAP.
- La correlación entre la dosis letal para ambos extremos de consumo (5 ml y 20 ml de jarabe de propóleos) y el anión GAP fue buena, mostrando un $r^2=0.63$ y $r^2=0.78$ respectivamente.

V. Interpretación sobre hallazgos de cocaína en casos de exhumaciones

- El cerebro constituye el órgano de elección en el estudio de casos post mortem, principalmente exhumaciones, ya que demostró contener cocaína intacta en los ocho casos analizados, permitiéndonos confirmar su incorporación activa y descartar la contaminación.
- En exhumaciones, la presencia de cocaína y la ausencia de benzoilecgonina en cerebro serían indicativas de incorporación sistémica; mientras que la presencia de benzoilecgonina alertaría sobre una posible adulteración.
- La formación de EME en sangre respondería a dos rutas posibles: la metabólica de origen endógeno y la producida por acción química o enzimática en el recipiente que contiene la muestra, por lo que es difícil emitir una opinión definitiva ante su hallazgo en casos postmortem.
- La relación de inversión de cocaína en pelo pericraneal respecto del vello pubiano en casos post mortem citada por varios autores no se pudo constatar en nuestros casos analizados.
- Podemos descartar una contaminación externa mediante la investigación en los líquidos provenientes del lavado previo a la extracción tomándolo como un factor fundamental para discutir una incorporación activa (líquidos de lavado negativo) o una contaminación (líquidos de lavado positivos).
- La relación de concentración cocaína/benzoilecgonina debería ser mayor a 1 para presumir que la cocaína proviene de incorporaciones activas. En situación de invertirse la relación debería revisarse el caso para descartar contaminaciones dolosas.

- **La mayor diversidad de matrices (tradicionales y alternativas) ofrecen las mejores posibilidades en la interpretación de los hallazgos post mortem de cocaína, permitiendo descartar contaminaciones dolosas, vías de ingreso utilizadas por el occiso y una mejor comprensión médico legal del óbito.**

Esta tesis ha dado lugar a las siguientes publicaciones, previo referato:

- Hydrogen cyanide and carbon monoxide in blood of convicted dead in polyurethane combustion: a proposition for the data analysis. L.A.Ferrari et al, *Forensic Science International* 121(2001)140-143.
- Postmortem analysis of formic acid disposition in acute methanol intoxication. L.A. Ferrari et al, *Forensic Science International* 133(2003) 152-158.
- Clinical parameters, postmortem analysis and estimation of lethal dose in victims of a massive intoxication with diethylene glycol. L.A. Ferrari & L. Giannuzzi. *Forensic Science International* (en prensa), 2005.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

Abel J. C. Alcohol. *Proc. Exp. Biol. P.med.* 34, 346 (1936).

Abolin C, Mc Rae M and Tosseland G. Gas Chromatographic head space assay of formic acid and methyl formate in biological fluids. *Biochem.Med.* 23: 209-218 (1980).

Alarie Y. Toxicity of fire smoke. *Crit. Rev. Toxicol.* 32 (4) 259-289 (2002).

Allen D.L, Scott K.S and Oliver J.S. Comparison of solid-phase extraction and supercritical fluid extraction for the analysis of morphine in whole blood. *J. Anal. Toxicol.* 23: 216-218 (1999).

Anderson R.A., Thomson I. and Harland W.A. The importance of cyanide and organic nitriles in fire fatalities. *Fire mater.* 3, 91-99 (1979).

Apple F.S. and Bandt C.M. Liver and blood postmortem tricyclic antidepressant concentration. *Am. J. Clin Pathol* 89, 794-796 (1988).

Anthony R.M., Sutheimer C.A. and Sunshine I. Methods for determination of alcohol by gas chromatography and flame ionization detector. *J Anal Toxicol* 4, 43-46 (1980).

Arado M.G. y Guatelli M.A. en L.A. Ferrari "Manual de Toxicología General y Ambiental." Ed. Edumor; Cap. 12. (1998).

Arado M. G. Informe Pericial Q-49029, Archivo del Laboratorio Forense de la Asesoría Pericial de Tribunales, La Plata (2004).

ATSDR: TP-88/12. Toxicological profile for cyanide. U.S. public health service in collaboration with U.S Environmental Protection Agency, Dec. (1989).

Backer R.C. and Poklis A. Forensic Toxicology: A broad overview of general principles. In General and applied Toxicology. Ballantyne & Marris (Eds), 2nd Ed. Pp. 1489-1508 (1999).

Balazs T., Jackson B. and Hite M. Nephrotoxicity of ethylene glycol, cephalosporins and diuretics. *Monog. Appl. Toxicol.* 1, 487-497 (1982).

Ballantyne B. "The Forensic Diagnosis of Acute Cyanide Poisoning". Proceedings of a Symposium Held at the Chemical Defense Establishment. Ed. Wright Bristol pp.99-113 (1974).

Barlett G.R. Combustion of ^{14}C labeled methanol in intact rat and its isolated tissues. *Am. J. Physiol.* 163, 614 (1950).

Baselt R.C. Disposition of toxic drugs and chemicals in man. Chemical Toxicology Institution, Foster City, fifth edition, (2000).

Baselt R.C. and Cravey R.H. Disposition of toxic drugs and chemical in man, 4th Edition, Chemical Toxicology Institution., Foster City, pp. 519-521 (1995).

Baselt R.C. Analytical Procedures for Therapeutic Drug Monitoring and Emergency Toxicology, Biomedical Publications, Davis, California, pp. 114-115 (1980).

Baumgartner W.A, Hill V.A. and Blahd W. Hair analysis of drugs of abuse. *J. Forensic Sci.* 34, 1433-1453 (1989).

Bennet I., Cari F.H., Mitchel G.L, and Cooper M. Acute methyl alcohol poisoning: a review based on experiences in an outbreak of 323 cases. *Medicine* 32, 431-463 (1953).

Birky M.M., Paabo M. and Brown J. Correlation of autopsy data and material involved in Tennessee jail fire. *Fire Safe J.* 2, 17-22 (1980).

Birky M.M. and Clarke F.B. Inhalation of toxic products from fires. *Bull N.Y. Acad. Med.* 57, 997-1013 (1981)

Blume P. and Lakatua D.J. The effect of microbial contamination of the blood sample on the determination of ethanol levels in serum. *Am J. Clin. Pathol.* 60: 700-702 (1973).

Bogusz M.J. and Wu M. Standardized HPLC/DAD system based on retention indices and spectra library applicable for systematic toxicological screening. *J. Anal. Toxicol.* 15, 188-197 (1991).

Bogusz M.J., Maier R.D., Kruger K.D., Web K.S., Romerill J. and Miller M.L.. Poor reproducibility of in source collision atmospheric pressure ionization mass spectra of toxicologically relevant drugs. *J. Chromatogr. A* 844, 409-418 (1999).

Bogusz M.J. New analytical technologies in Forensic Science –between novelty and reliability. Proceedings 38th TIAFT Meeting, University of Helsinki. Ed. by Ransanen. pp.4-12 (2001).

Bost R.O. and Sunshine I. Ethylene glycol analysis by gas chromatography. *J. Anal. Toxicol.* 4: 102-103, (1980).

Bove K.E. Ethylene glycol toxicity. *Am. J. Clin. Path.* 45: 46-50 (1966).

Bowen D.A.L., Minty P.S.B. and Sengupta A. Two fatal cases of ethylene glycol poisoning. *Med. Sci. Law* 18: 102-107 (1978).

Bowie M.D. and Mc.Kenzie D. Diethylene Glycol poisoning in children. *South African Med. Journal* 46: 931-934 (1972).

Briglia E.J., Bidanset J.H. and Dal Cortivo L. A. The distribution of ethanol in postmortem blood specimens. *J. Forensic Sci.* 37, 991-998 (1992).

Brown D.J., Jain N.C. and Forney R.B. Gas chromatographic assay of glycol-ethanol combinations in biological materials. *J. Forensic. Sci.* 13: 537-543 (1968).

Cadnapaphornchai P.S., Taher D. and Bhatena A. Ethylene glycol poisoning: diagnosis based on high osmolal and anion gaps and crystalluria. *Ann. Emerg. Med.* 10: 94-97 (1981).

Calabrese E. y Astolfi E. Toxicología. Editorial Kapelusz, Buenos Aires (1978).

Calvery H.O. and Klampp T.G. The toxicity for human beings of diethylene glycol with sulphaniamide. *Southern. Med. J.* 32, 1105-1109 (1939).

Canfield D.V. Author response to letter. *J. Forensic Sci.* 39, 600 (1994).

Cassarett and Doull's Toxicology. Ed. by Klaassen, C. Mc. Millan Publisher. (1986).

Castro G.D., Delgado de Layño A.M.A., Costantini, M.H. and Castro J.A. Cytosolic Xanthine oxidase mediated bioactivation of ethanol to acetaldehyde and free radical in rat breast tissue. Its potential role in alcohol promoted mammary cancer. *Toxicology* 160, 11-18 (2001).

Chen X.H., Franke J.P. and de Zeeuw R.A. Lot to lot reproducibility of bond elut certified and clean screen DAU Mixed mode solid phase extraction column in extraction of drugs from whole blood. Contribution to Forensic Toxicology. Edited by Molina Press, Leipzig University. Deutschland. pp. 138-147 (1994).

Clarke's Isolation and identification of drugs in pharmaceuticals and biological samples. Ed. By Moffat A. et al, Pharmaceutical Press, London (1986).

Coloccia E. y Argeri N. Alcoholemia: Interpretación Legal y su determinación por el método de microdifusión. *Acta Bioq. Clín. Latinoam.* 3: 96-110 (1969).

Coe J.I. Postmortem Chemistry Update: Emphasis on Forensic Application. *The Amer. J. For. Med and Pathol.* 14: 91-117 (1993).

Cone E.J., Holicky B.A., Grant T.M., Darwin D.E. and Goldberger B.A. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of intranasal "snorted" heroine. *J. Anal. Toxicol.* 17(6) 327-337 (1993).

Cone E. Mechanism in drug incorporation into hair. *Ther. Drug Monit.* 148, 438-443 (1996).

Cook D.S., Braithwaite R.A. and Hale K.A. Estimating antemortem drug concentrations from postmortem blood samples: the influence of postmortem redistribution. *J. Clin. Pathol.* 53: 282-285 (2000).

Cooper N.M., Mitchell G.N., Bennett I.L. and Cary F.N. Methyl alcohol poisoning: an account of the 1951 Atlanta epidemic. *J. Am. Med. Assoc.* 141: 48-51 (1952).

Cowan D.A. and Houghton E. Drug abuse in sport in Moffat A.C., Osselton M.D., Widdop B. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons 2004. Pharmaceutical Press, London, Tome I pp 134-142 (2004).

Cravey R. and Baselt R. Introduction to Forensic Toxicology. Biomedical Publications. Davis California (1981).

Cheng J.T., Beysolow T.D. and Kaul B. Clearance of ethylene glycol by kidneys and hemodialysis. *Clin. Tox.* 25: 95-108 (1987).

Cummings K.C. and Jatlow P.I. Sample preparation by ultrafiltration for direct gas chromatographic analysis of ethylene glycol in plasma. *J. Anal. Toxicol.* 6: 324-326 (1982).

Curry A. Poison detection in Human organs. 3rd Edition, Thomas Publisher, (1976)

Dawling S. Gas Chromatography in Moffat A.C., Osselton M.D., Widdop B. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons 2004. Pharmaceutical Press, London, Tome I, pp. 392-424, (2004).

De Zeeuw R.A. Screening for barbiturates by capillary electrophoretic techniques. Proceedings SOFT-TIAFT Meetings. Edited by Spiehler, California, pp 585-600 (1998).

Dean R.A., Christian C.D., Sample R. and Bosron W.F. Human liver cocaine esterases ethanol mediated formation of ethylcocaine. *FASEB J.* 5, 2735-2739 (1991).

Deinl I., Angermaier L., Franzelius C. and Machbert G. Simple High liquid chromatographic column switching technique for the on lineimmunoaffinity extraction and analysis of flunitrazepam and its main metabolites in urine. *J. Chromatog. B* 704, 251-258 (1997).

Dubowski K. M. Absorption, distribution and elimination of alcohol: Highway safety aspects. *S. Stud. Alcohol. suppl.* 10: 98-108 (1985).

Durand A., Auzepi P., Hebert J. and Trieu T.C. Study of mortality and urinary excretion of oxalate in male rats following acute experimental intoxication with diethylene glycol. *Eur. J. Intens. Care Med.* 2, 143-146 (1976).

Drummer O.H. Stability of drugs postmortem: a review. Proceedings 35th TIAFT meetings. University of Padova, pp. 13-18 (1997).

Drummer O. H. Chromatographic screening techniques in systematic toxicological analysis. *J.Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 733, 27-45 (1999).

Drummer O.H. Toxicology: Methods in analysis postmortem. In Encyclopedia of Forensic Science. San Diego, CA, Academic press; pp 1404-1409 (2000).

Drummer O.H. and Gerostamoulos J. Postmortem drug analysis: Analytical and Toxicological aspects. *Ther. Drug Monit.* 24: 199-209 (2002).

Drummer O. H. Pharmacokinetics of drugs. In Moffat AC, Osselton MD and Widdop B. (Eds.) Clarke's Analysis of Drugs and Poisons 2004. Pharmaceutical Press, London, Tome I pp. 172-188 (2004).

Eells J.T, Salzman M.M., Lewandowski M.F. and Murray T.G. Formate induced alterations in retinal function in methanol intoxicated rats. *Toxicol. Appl Pharmacol.* 140 (1) 58-69 (1996).

Elliot C.T., Baxter G.A, Hewitt S.A., Arts C., van Baak M., Hellenas H. and Johansson B Use of biosensors for rapid drugs residue analysis without sample deconjugation of clean up a possible way forward. *Analyst* 123, 2469-2473 (1998).

Eriksen S.P. and Kulkarni A. B. Methanol in normal human breath. *Science* 141: 639-640 (1963).

Fabre R. y Truhaut R. Toxicología. Editorial Paraninfo, Tomo II, p. 273 (1976).

Fassi A. M. Método de extracción continua de alcaloides, glucósidos y barbitúricos por agotamiento. Nuevo Aparato. Modificación a la marcha extractiva de Stas –Otto-Ogier-Kohn Abarest. *Rev. Asoc. Bioq. Argent.* 92: 78-84 (1954).

Feldman M., Van Horne K.C., Liu Z., Bennett P. and Kuntz D. J. Ethylglucuronide analysis in urine by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Justice & Health*, Sep, p.149 (2004).

Feldstein N. and Klendshoj N. C. Microdiffusion techniques. *J. Forensic Sci.* 2, 39-46 (1957).

Ferrari L.A., Wamba Z. y Laguens R. M. Dietilenglicol: Aspectos bioquímicos, toxicológicos e histofisiopatológicos en una intoxicación masiva. *Acta Toxicol. Argent.* 5, 99-101 (1997).

Ferrari L.A, Nieto R.R., Arado M. G. and Wamba Z. Blood and tissue distribution of metanol and Formic acid in victims of masive intoxication due to the ingestion of adulterate wine. Proceedings XXXV TIAFT World Congress. Ed. By University of Padova, Italy, pp. 26-32 (1997).

Ferrari L.A. y Arado M. G. Pelos y uñas como herramientas en el estudio de drogas de uso indebido. Actas de las 1 Jornadas Toxicológicas del Interior. Ed. por Colegio Bioquímico de Córdoba, pp. 35-39 (2000).

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

Ferrari L.A., Giannuzzi L., Nardo C.A., Arado M.G. and Nieto R.R. Formic acid in tissue as indicator parameter in methanol intoxication: a proposition of index. *Annales de Toxicologie Analytique* 14, 310 (2002).

Ferrari L.A., Arado M.G., Nardo C.A. and Giannuzzi L. Post-mortem analysis of formic acid disposition in acute methanol intoxication. *Forensic Sci. Int.* 133: 152-158 (2003).

Ferrari L. A. Alcohol etílico: Aspectos toxicológicos forenses, cálculos retrospectivos y modificaciones postmortem. *Bol. Assoc. Toxicol. Argent.* 63, 9-15 (2004).

Ferrari L. A, Arado M. G, Nardo C. A, Mirson, D. J. E., Garrote I.V. and Nieto R. R. Carbon monoxide and ethanol in five victims of a fire fatality. *Justice & Health* 35, 370 (2004).

Ferrari L.A. and Giannuzzi L. Clinical parameters, postmortem analysis and estimation of lethal dose in victims of a massive intoxication with diethylene glycol. *Forensic Sci. Int.* (in press), (2005).

Flanagan B. Hair today. *Bull Int. Assoc. For. Toxicol.* 29 (4) 9-11 (1999).

Fraser A.D. and Mc Neil W. Gas chromatographic analysis of methyl formate and its application in methanolpoisonin cases. *J. Anal. Toxicol.* 13, 73-76 (1989).

Friedrman E. A., Greenberg, J. B., Merrill J. P. and Dammin G. J. Consequences of ethylene glycol poisoning. *Am. J. Med.* 32: 891-902 (1962).

García Fernández J. C., Patiño C. M., Vázquez Fanego H., García M.R, Manes Marzano B. y Guinle A. E. Consideración acerca del empleo del humor vítreo para la determinación post mortem de alcohol etílico y drogas de uso ilícito. *Medicina Forense Argentina* 33: 2-7 (1994).

Garnica López C. Investigación de aminoácidos en la hoja de coca. Tesina para optar al título de Licenciatura en Bioquímica y Farmacia. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, Bolivia. (1988).

Garret R.A, Eberst K. and Maruhn D. Prediction of stability in pharmaceuticals preparations XXI: The analysis and kinetics of hydrolysis of a cocaine degradation product, ecgonine methyl ester, plus the pharmacokinetics of cocaine in the dog. *J. Pharm. Sci.* 83, 269-272 (1994).

Garrote I.V., Krbavcic I.; Nardo C.A., Arado M.G., Nieto R.R., Colangelo C.H and Ferrari L.A. Alcohols and cocaine postmortem stability in human organs and blood. Proceedings 38th TIAFT Meetings, University of Helsinki. Ed. by Ransanen. pp. 263-270 (2000).

Garriott J. Medico-legal aspects of alcohol. Edited by J. Lawyers and Judges Publish. Company, (1996).

Geilling E.M.K. and Cannon P.R. Pathologic effects of elixir of sulfanilamide in (diethylene glycol) poisoning. *J. Am. Med Assoc.* 111, 919-926 (1938).

Gessner P. K., Parke D. V. and Willians R.T. Studies in detoxication. The metabolism of ¹⁴C-labelled ethylene glycol. *Biochem. J.* 79: 482-489 (1991).

Giroud C., Michaud K., Sporkert F., Eap C., Augsburger M., Cardinal P. and Mangin P. A fatal overdose of cocaine associated with co ingestion of marijuana, buprenorphine and fluoxetine. Body fluid and tissue distribution of cocaine and its metabolites determined by hydrophilic interaction chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS). *J. Anal. Toxicol.* 28: 464-474 (2004).

Godolphin W., Meagher E.P., Sanders H.D. and Frohlich J. Unusual calcium oxalate crystals in ethylene glycol poisoning. *Clin. Tox.* 16: 479-485 (1980).

Goldaracena C.A., Piaggio O.L., Raffo A., Gasparovic A.M. y Taus M.R. Estudio estadístico sobre alcoholemia en conductores que circulan por una ruta nacional de elevado tránsito. *Acta Toxicol. Argent.* 9 (1) 46-47 (2001).

Gordon H.L. and Hunter J.M. Ethylene glycol poisoning. *Anaesthesia* 37: 332-338 (1982).

Guatelli M.A. Metanol: Estudio Clínico (nociones) y analítico-toxicológico. Editado por la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires (2000).

Guatelli M.A. Ácido Cianhídrico y cianuros alcalinos: analítica toxicológica. Monografía, Cátedra de Toxicología y Química Legal, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires (1992).

Guatelli M.A. The Toxicity of Cyanides. In *Methods of Forensic Science*. Vol III. Edited by Curry A.S. Academic Press. pp. 233-265 (1964).

Gupta R.N. Eng F. and Gupta M.L. Liquid-chromatographic determination of ethylene glycol in plasma. *Clin. Chem.* 28: 32-33 (1982).

Hanif M., Reaz Mobarak M., Ronan A., Rahman D., Donovan J.J. and Bennish M.L. Fatal renal failure by diethylene glycol in paracetamol elixir: The Bangladesh epidemic. *British Med. Journ.* 311: 88-91 (1995).

Hansch C. and Leo A. *Substituent constants for correlation analysis in chemistry and biology*. J. Wiley and Sons, N. York (1979).

Hantson P., Haufroid V. and Mahieu P. Determination of formic acid tissue and fluid concentration three fatalities due to methanol poisoning. *Am. J. Forensic Med and Pathol.* 21(4)335-338 (2000).

Harger R.N. and Forney R.B. A simple method for detecting and estimating ethylene glycol in body materials; analytical results in six fatal cases. *J. Forensic Sci.* 4: 136-143 (1959).

Harger R.N., Johnson S.L. and Bridwell E.G. Detection and estimation of methanol with results in human cases of methanol poisoning. *J. Biol. Chem.* 123: 1-11 (1938).

Hearn W., Keran E., Wei H. and Hime G. Site dependent postmortem changes in blood cocaine concentration. *J. Forensic Sci.* 36(3) 673-684 (1991).

Helander A. and Beck O. Mass spectrometric identification of ethyl sulphate in humans. A new ethanol metabolite and a biomarker of acute alcohol intake. *Justice & Health*, Sept. pp. 150 (2004).

Henderson G.L. Mechanism of drug incorporation into hair. *Forensic Sci. Int.* 63, 9-8 (1993).

Herbert J.L., Fabre M., Auzepy P., Paillas J. and Durand A. Acute experimental poisoning by DEG: Acid base balance and histological data in male rats. *Toxicol. Eur. Res.* 1, 289-294 (1978).

Hewlett T.P., Ray A.C. and Reagor J. C. Diagnosis of ethylene glycol (antifreeze) intoxication in dogs by determination of glycolic acid in serum and urine with highpressure liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 66: 276-283 (1983).

Hewlett T.P., McMartin K.E., Lauro A.J and Ragan F.A. Ethylene glycol poisoning. The value of glycolic acid determinations for diagnosis and treatment. *Clin. Tox.* 24: 389-402 (1986).

Hilberg T., Rogde S. and Morland J. Postmortem drug redistribution-Human cases related to result in experimental animals. *J. Forensic Sci.* 44: 3-9 (1999).

Hoja H., Marquet P. and Verneuil B. Application of liquid chromatography-mass spectrometry in analytical toxicology: a review. *J. Anal. Toxicol.* 21, 116-126 (1997).

Honey D., Caylor C., Luthi R. and Kerriga S. Interpretation of postmortem alcohol concentration. Presentation as resume of complete paper in poster presentation at 42nd TIAFT Meeting at Washington DC, (2004).

Ihang J., Jue J. and Foltz R. L. Cocaine metabolism in man: identification of four previously and reported cocaine metabolites in human urine. *J. Anal. Toxicol.* 14, 201-205(1990).

Inaba T. Cocaine: pharmacokinetics and biotransformation in man. *Can J. Pharmacol.* 67, 1154-1157 (1988).

Isenschmid D., Levine B. S. and Caplan Y. A comprehensive study of stability of cocaine and metabolites. *J. Anal. Toxicol.* 13, 250-256 (1989).

Isenschmid D., Fischman M.W., Foltin R.W. and Caplan Y.H. Concentration of cocaine and metabolites in plasma of humans following intravenous administration and smoking of cocaine. *J. Anal. Toxicol.* 16, 311-314 (1992).

Isenschmid D. Cocaine. FBI Laboratory Symposium on Forensic Toxicology. Washington DC, pp. 322-332 (2004).

Ishii A., Seno H., Watanabe Suzuki O., Suzuki K. and Kumazawa T. Determination of cyanide in whole blood by capillary gas chromatography with cryogenic oven trapping. *Anal Chem.* 70, 4873-4876 (1998)

Jacob P., Lewis R., Elias Baker B.A. and Jones R.T. A pyrolysis product, anhydroecgonine methyl ester (methylecgonidine) is in the urine of cocaine smokers. *J. Anal. Toxicol.* 14, 353-357 (1990).

Jacobsen D. and Mc Martin K. E. Methanol and ethylene glycol poisoning mechanism of toxicity: clinical course, diagnosis and treatment. *Medical Toxicol.* 1: 309-334 (1986).

Jain J. N. Propyleneglycol and ethyleneglycol type B procedure in CRC Manual of Analytical Toxicology. Pp. 157-159 (1979).

Jatlow P., Elsworth C.W., Bradberry G., Winger J.R., Taylor R. and Russel R. Cocaethylene: a neuro - pharmacologically active metabolite associated with concurrent cocaine ethanol ingestion. *Life Sci.* 48, 1787-1794 (1991).

Jenkins A.J., Levine B., Titus J. and Smialek J.E. The interpretation of Cocaine and Benzoilecgonine concentrations in postmortem cases. *Forensic Sci. Int.* 101: 17-25 (1999).

Jones G. R. and Pounder D. J. Site dependence of drug concentration in postmortem blood-a case study. *J. Anal. Toxicol.* 11: 184-190 (1987).

Jones G. R. Postmortem Toxicology. In Moffat A.C., Osselton M.D., Widdop B.: *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons 2004*. Edited by Pharmaceutical Press, London, Tome I pp 94-107 (2004).

Jones A. W. Forensic science aspect of ethanol metabolism. In *Forensic Science Progress*. Vol .5. Springer Verlag Edit. pp. 30-90 (1991).

Jones A.W. and Holmgren P. Uncertainty in estimating blood alcohol by analysis of vitreous humor. *J. Clin. Pathol.* 54: 699-702 (2001).

Kane R.L., Talbert W. and Jarlan J. A methanol poisoning outbreak in Kentucky. *Arch. Env. Health* 17, 119-129 (1968).

Kawai F. Bacterial degradation of glycol ethers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44: 532-538 (1995).

Kinoshita H., Ijiri I., Ameno S., Tanaka N., Kubota T., Tsujinaka M., Watanabe R. and Ameno K. Combined toxicity of methanol and formic acid: two cases of methanol poisoning. *Int. J. Legal Med.* 111: 334-335 (1998).

King L. C. Acute methanol poisoning: a case study. *Heart Lung* 21: 260-264 (1992).

Kintz P. Interlaboratory comparison of quantitative determinations of drugs in hair samples. *Forensic Sci. Int.* 70,105-109 (1995).

Kintz P. Hair analysis. In Moffat AC, Osselton MD and Widdop B (Eds). *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons 2004*. Pharmaceutical Press, London, Tome I pp 124-133 (2004).

Klingmann G., Skoop G. and Aderjan R. Analysis of cocaine, benzoilecgonine, ecgonine methyl ester and ecgonine by high pressure liquid chromatography API mass spectrometry

and application to short term degradation study of cocaine in plasma *J. Anal. Toxicol.* 25, 189-193 (2001).

Kloss M.W., Rosen G.M. and Rauckman E. J. Cocaine mediated hepatotoxicity. A critical review. *Biochem Pharmacol.* 33,169-173 (1984).

Koves E.M. and Wells J. Evaluation of photodiode array/HPLC based system for the detection and quantization of basic drugs in postmortem blood. *J. Forensic Sci.* 37, 42-60 (1992).

Koves E. M. Use of high performance liquid chromatography-diode array detection in forensic toxicology. *J. Chromatogr A.* 692, 103-119 (1995).

Kupiec T., Slawson M., Pragst F. and Herzler M. High Performance liquid chromatography. In Moffat A.C., Osselton M.D. and Widdop B. (Eds.). *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons 2004.* Pharmaceutical Press, London, Tome I pp. 500-534 (2004).

Laguens M., Arado M.G., Wamba Z., Nardo C. y Ferrari L.A. Drogas de abuso en pelo: B) Mecanismo de incorporación de droga al pelo. XI Congreso Argentino de Toxicología. p. 101 (1999).

Lee C.W., Tam J.C.N., Kung L.K. and Yim L.K. Validity of CO-oximetric determination of carboxihaemoglobine in putrefying blood and body cavity fluid. *Forensic Sci. Int.* 132: 153–156 (2003).

Leikin J. B. and Watson W.A. Postmortem toxicology: What the dead can and cannot tell us. *J. Toxicol. Clin. Toxicol* 41: 47-56 (2003).

Lenk W., Lohr D. and Sonnenbichler J. Pharmacokinetics and Biotransformation of diethylene glycol and ethylene glycol in the rat. *Xenobiotica* 19 (9) 961-979 (1989).

Levine B., Smith M.L., Smialek J.E. and Kaplan Y.H. Interpretation of low postmortem concentrations of ethanol. *J. Forensic Sci.* 38, 663-667 (1993).

Lieber C. Metabolism and metabolic effect of alcohol. *Med. Clin N. Am.* 68: 3-33 (1984).

Liesivuori J. and Savolainen H. Methanol and formic acid toxicity: Biochemical mechanism. *Pharmacol. & Toxicol.* 69: 157-163 (1991).

Logan B.K., Stafford D.T., Tebett I.R. and Moore C.M. Rapid screening of 100 drugs and metabolites in urine using cation exchanged solid phase extraction high performance liquid chromatography with diode array detection. *J. Anal Toxicol.* 14, 154-159 (1990).

Logan B. K. and Peterson K.L. The origin and significance of ecgonine methyl ester in blood samples. *J. Anal. Toxicol.* 18: 124-125 (1994).

Lowry W.T., Juarez L., Petty C.S. and Roberts B. Studies of toxics gas production during actual structural fires in the Dallas area. *J. Forensic Sci.* 30, 59-72 (1985).

Lowry W.T., Lomonte J.N, Hatchette D. and Garriot J. C. Identification of two novel cocaine metabolites in bile by gas chromatography and gas chromatography /mass spectrometry in a case of acute intravenous cocaine overdose. *J. Anal. Toxicol* 3, 91-95 (1979).

Lundquist P., Rammer L. and Sorbo B. The role of hydrogen cyanide and carbon monoxide in fire causalities: a prospective studies. *Forensic Sci. Int.* 43, 9-14 (1989).

Madea B. and Mushoff F. Postmortem Toxicology. *Forensic Sci. Int.* 142: 71-73 (2004).

Maes R. A. A. Current choice analytical methods in Toxicology. In *Klinisch-toxicologische analytische Gegenwärtiger stand und forderungen für die zukunft.* VCH Verlagsgesellschaft. pp. 17-26 (1987).

Mahieu P., Hassoun R. and Lawerys R. Predictors of methanol intoxications with unfavorable outcome. *Hum. Toxicol.* 8, 135-137 (1989).

Makar A.B., Thephly T.R., Sahin G. and Osweiler G. Formate metabolism in young swine. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 105, 315-320 (1990).

Malebranche R., Hecldivert C., Lassegue A., Victor S., Derosena R., Denerville K., St.Amand C.H., Severe D., Compas E., Cleophat P., Buteau J.H., Fabien D., Colimon J., Verdier R.I., Cayemitte M., Placide M.F., Hospedales J., Lewis M., Diouf M.A. and Garcia S. Fatalities associated with ingestion of diethylene glycol contaminated glycerin used to manufacture acetaminophen syrup-Haiti, November 1995-June 1996. *New Eng. J. Med.* 45, 649-650 (1996).

Manhoff D.T, Hood I., Caputo F., Perry J., Rosen S. and Mirchandani H.G. Cocaine in decomposed human remains. *J. Forensic Sci.* 36: 1732-1735 (1991).

Margot P. and Romolo S. Identification of gunshot residue. A critical review. *Forensic Sci. Int.* 119, 195-211 (2001).

Marko V., Soltes L. and Novak I. Selective solid phase extraction of basic drugs by C-18 silica. Discussion of possible interactions. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 8: 297-301 (1990).

Marquet P. and Lachâtre G. Liquid chromatography-mass spectrometry: potential in forensic and clinical toxicology. *J. Chromatogr. B* 733, 93-118 (1999).

Marquet P., Saint Marcoux F., Gamble T.N. and Leblanc J. C. Comparison of a preliminary procedure of the general unknown screening of drugs and toxic compounds using a quadrupole linear ion trap mass spectrometer with a liquid chromatography-mass spectrometry reference technique. *J. Chromatogr. B* 789, 9-18 (2003).

Marshall T.C. Ciark C.R. and Clellan R.O. Pharmacokinetics of ethylene glycol in the rat following intravenous administration. Presented at the 19th annual Society of Toxicology Meeting, Washington, D.C. March 9-13, (1980).

Masini A., Ceccarelli D. and Gallesi D. Lipide hydroperoxide induced mitochondrial dysfunction following acute ethanol intoxication in rats. *Biochem Pharmacol.* 47: 217-224. (1994).

Mathews J.M., Parker M.K. and Mathews H.E. Metabolism and disposition of diethylene glycol in rat and dog. *Drug Metabolism y Dispos.* 19: 1066-1070 (1991).

Maurer H. H. Review. Liquid chromatography mass spectrometry in forensic and clinical toxicology. *J. Chromatogr.* 713, 3-25 (1998).

Maurer H. H. Systematic toxicological analysis procedures for acidic drugs and/or metabolites relevant to clinical and forensic toxicology and/or doping control. *J. Chrom. B* 733, 3-25 (1999).

Maurer H.H., Peters F.T., Paul L.D. and Kraemer T. Validated gas chromatographic-mass spectrometric assay for determination of antifreezes ethylene glycol and diethylene glycol in human plasma after microwave-assisted validation. *J. Chromatog. B*, 754: 401-409 (2001).

Mayes R.W. The postmortem production of ethanol and other volatiles. In G.R. Jones y PP Singer (eds.): Proceedings of the 24 International TIAFT Meeting, Edmonton, Alberta Society of clinical and forensic toxicologists, pp. 94-100 (1988).

McCurdy H.H. and Solomons E.T. An improved procedure for the determination of ethylene glycol in blood. *J. Anal. Toxicol.* 6: 253-254 (1982).

McMartin K.E, Ambre J.J. and Tephly T. R. Methanol poisoning in human subjects: role of formic acid accumulation in the metabolic acidosis. *Am. J. Med* 68, 414-418 (1980).

Mellone G. Tesina de licenciatura. Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad de Morón (2001).

Meola J.M, Rosano T.G. and Swift T.A. Fluorometry of ethylene glycol in serum. *Clin. Chem.* 26, 1709 (1980).

Moeller M.R. and Eser H.P. The analytical tools for hair testing. In Kintz Ped. Drug testing in Hair. 1st edition. Boca Raton, Florida CRC press (1996).

Moizeszowicz J. *Psicofarmacología psicodinámica*. Editorial Paidós, p.35-65 (1998)

Moffat A.C., Osselton M.D. and Widdop B. In Moffat AC, Osselton MD and Widdop B (Eds). *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons 2004*. Pharmaceutical Press, London, Tome I pp. 80-93 (2004).

Montgomery M.R. and Reasor M. J. Retrograde extrapolation of blood alcohol data. *J. of Toxicol. and Envir. Health* 36: 281-192 (1992).

Moore J.M., Casale J. F, Klein R. F, Cooper Daand Lydon J. Determination and in depth chromatographic analysis of alkaloids in South American and greenhouse cultivated coca leaves. *J. Chromatogr.* 659,163-175 (1994).

Moriya F. and Hashimoto Y. Redistribution of basic drugs into cardiac blood from surrounding tissues during early-stages postmortem. *J. Forensic Sci.* 44: 10-16 (1999).

Morris H.J., Nelson A.A. and Calvery H.O. Observations on the chronic toxicities of propylene glycol, ethylene glycol and diethylene glycol. *J. pharmacol.Exp. Ther.* 74, 266-273 (1942).

Müller R. K. *Toxicological Analysis*. Ed. By Verlag Molina Press, Leipzig, pp. 200-201 (1995).

Müller R. K and Giebelmann R. Extraction from aqueous phase. In Müller RK. *Toxicological Analysis*. Ed. By Verlag Molina Press, Leipzig pp. 66-90 (1995).

Müller R. K. Laboratory Guidelines for toxicological analysis. TIAFT Committee on Systematic toxicological analysis and guidelines. *Bull. Int. Assoc. For. Toxicol.* 31 (4) 23-26 (2001).

Ministerio de Salud: Documento sobre guía de toma de muestras. Res. 650/02, Ministerio de Salud de la Nación Argentina (2002).

Nakahara Y., Kikura R., Yasuhara M. and Mukai T. Hair analysis for drug abuse XIV. Identification of substances causing acute poisoning using hair root. I. Methamphetamine. *Forensic Sci. Int.* 84, 157-164 (1997).

Nieto R. R., Patroni E., Alvarez J., Chaumeil A., Ramirez A., Wamba Z. y Ferrari L. A. Investigación de cocaína en ausencia de sangre y orina en muertes por sobredosis. Comunicación Libre. XI Congreso Argentino de Toxicología La Plata. p. 98 (1999).

O'Brien K.L., Selanikio J.D., Hecdivert C., Placide M.L., Louis M., Barr D.B, Barr, Hospedales J.R., Lewis J., Schwartz M.J., Phillen B., Suzelle M.L., Espindola S.M., Needham J., Denerville, K. Epidemic of pediatric deaths from acute renal failure caused by diethylene glycol poisoning. *J. Am. Med. Assoc.* 279, 1175- 1180 (1998).

Offidiani C., Strano Rossi S. and Chiarotti M. Drug distribution in the head, axillary and pubic hair of chronic addicts. *Forensic Sci. Int.* 63, 105-108 (1993).

Ojänperä I., Rasanen I. and Vuori E. Excerpts from TIAFT 2000 selected papers from the 38th meetings of The International Association of Forensic Toxicologists, Helsinki, Finland. *Forensic Sci Int.* 121, 1 (2001).

Okuongae H.O., Ighogboja I.S., Lawson J.O. and Nwana A. J. Diethylene glycol poisoning in Nigerian children. *Ann. Trop. Pediatr.* 12, 235-238 (1992).

O'Neal C. and Poklis A. Postmortem production of Ethanol and factors that influence interpretation. A critical review. *The Am. J. For. Med and Pathol.* 17, 8-20 (1996).

Ovrebo S., Jacobsen D. and Sejersted O.M. Determination of ionic metabolites from ethylene glycol in human blood by isotachopheresis. *J. Chrom.* 416, 111-117 (1987).

Parsons B. Blood Alcohol question. *The TIAFT Mailing list* (2002).

Parrini A. Incendio en dicoteca. *REDARTOX List serv.* (2005)

Parry M.F. and Wallach R. Ethylene glycol poisoning. *Am. J. Med.* 57: 143-150 (1974).

Patiño C. M. Estudio de las modificaciones de las drogas en el cadáver. *Medicina Forense Argentina* 32: 2-8 (1993).

Pawliszyn J. Solid Phase microextraction: Theory and practice. Wiley Publisher, New York (1997).

Pawliszyn J. Theory of solid phase microextraction. *J. Chromatographic. Sci.* 38: 270-278 (2000).

Pecllet C., Rousseau M., Ponton G. and Rousseau J. J. Carbon monoxide and cyanide inhalation. *Can. Forensic Sci. J.* 15, 81-86 (1982).

Peterson C. D, Collins A. J, Himes J.M. Ethylene glycol Poisoning. *New Eng. J. Med.* 304: 21-23 (1981).

Peterson R.L. and Rodgerson D. O. Gas chromatographic determination of ethylene glycol in serum. *Clin. Chem.* 20: 820-824 (1974).

Peterson K., Logan B.K. and Christian G.D. Detection of cocaine and its polar transformation products and metabolites in human urine. *Forensic Sci. Int.* 73, 183-196 (1995).

Pfleger K., Maurer H.H., Weber A. Mass spectral and GC data of drugs, poisons, pesticides, pollutants and their metabolites. Second edition. VCH, Weinheim (1992).

Pichini S., Altieri I., Zuccaro P. and Pacifici R. Drug monitoring in nonconventional biological fluids and matrices. *Clin. Pharmacokint.* 30: 211-228 (1996).

Pla A., Hernández A.F., Gil F., Garcia Alonso M. and Villanueva E. A fatal case of oral ingestion of methanol. Distribution in post mortem tissue and fluid including pericardial fluid and vitreous humor. *Forensic Sci. Int.* 49: 193-196 (1991).

Plowman T. The Ethnobotany of coca. (*Erythroxylum* spp. Erythroxilaceae) in Ethnobotany in Neotropics. G.T. Prance y J.A. Kallunki Advance in economic Botany. The New York Botanical Garden. pp 62-111 (1984)

Polettini A. A simple automated procedure or the detection and identification of peaks in gas chromatography- continuous scan mass spectrometry. Application to systematic toxicological analysis of drugs in whole human blood. *J. Anal. Toxicol.* 20: 579-586 (1996).

Polettini A. Toxicological analysis with HPLC-MS. *J. Chromatogr. B* 733, 47-56 (1999).

Poole C. Thin layer Chromatography. In Moffat AC, Osselton MD and Widdop B (Eds). Clarke's Analysis of Drugs and Poisons 2004. Pharmaceutical Press, London, Tome I pp. 392-424 (2004).

Pounder D. J. Postmortem drug redistribution- a toxicological nightmare. *Forensic Sci. Int.* 35: 572-579 (1990).

Pounder D. J. and Smith D. R. Postmortem diffusion of alcohol from the stomach. *The Am J. For. Med. Pathol.* 16: 89-96 (1995).

Pounder D. J, Adams E., Fuke C. and Langford A. M. Site to site variability of post-mortem drug concentration in liver and lung. *J. Forensic Sci.* 41: 927-932 (1996).

Pöstch L. Observation about ultrastructure and chemistry of human hair. *2nd International Meeting on hair analysis*, Genova, (1994).

Prouty R.W. and Anderson W. H. The forensic science implications of site and temporal influence on postmortem blood-drug concentrations. *J. Forensic Sci.* 35: 243-270 (1990).

Porter W.H. and Avansakul A. Gas chromatographic determination of ethylene glycol in serum. *Clin. Chem.* 28: 75-78 (1981).

Purser D.A., Grimshaw K. and Pberil K. R. Intoxication by cyanide in fires: a study in monkey using polyacrylonitrile. *Arch. Environ. Health* 39: 394-400 (1984).

Quattrocchi O.A., Abeleira S.I. and Laba R. F. Introducción a la HPLC Aplicación y práctica. pp. 212-217 (1992).

Rafla F.K. and Epstein R.L. Identification of cocaine and its metabolites in human urine in the presence of ethyl alcohol. *J. Anal. Toxicol.* 3, 59-63 (1979).

Ramsey J.D. and Flanagan R. J. Detection and identification of volatile organic compounds in blood headspace gas chromatography as an aid to the diagnosis of solvent abuse. *J. Chromatography.* 50: 423-442 (1982).

Randall T. Cocaine, alcohol mix in body to form even longer lasting more tethal drug. *J. Am. Med. Assoc.* 267, 1043-1044 (1992).

Repetto M. Toxicología Avanzada. Editorial Díaz de Santos, España (1995).

Repetto M. Toxicología Fundamental. Editorial Díaz de Santos, España (1997).

Repetto M y Martinez M. Presencia de cianuro en sangre de las víctimas de fuego de materiales plásticos. *Medicamenta* 63, 193-195 (1974).

Roine R. P. Effect of concentration of ingested ethanol on blood alcohol levels. *Alcoholism* 15 (4) 734-739 (1991).

Raekallio J.A., Jaaskelainen J. and Makinen P. L. The simple demonstration of calcium oxalate crystals in kidneys of victims of ethylene glycol poisoning. *J. Forensic Sci.* 12: 238-140 (1987).

Robinson D.W. and Reive D. S. A gas chromatographic procedure for quantitation of ethylene glycol in postmortem blood. *J. Anal. Toxicol.* 5, 69-72 (1981).

Robinson C.A., Scott J.W. and Ketchum C. Propylene glycol interference with ethylene glycol procedures. *Clin. Chem.* 28: 727 (1982).

Rumack B.H. and Levejoy F.H. Clinical toxicology. In MO Amadur, J.Doull, CD Klaassen (Eds). Casarett and Doull's: Toxicology the basic science of poisons, Pergamon Press, N.York. 4th Edition, pp. 933-946 (1991).

Saint Feliu F. El fenómeno droga. Ediciones Salvat, Barcelona, España (1984)

Sala G y Mandrile E. Propoleos. Guía teórica y práctica de la Cátedra de Farmacognocia. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata (1993).

Scalzo A. J. Diethylene glycol toxicity revisited: the 1996 Haitian epidemic. *J. Toxicol. Clin. Toxicol* 34, 513-516 (1996).

Schmitt G., Droenner P., Skoop G. and Aderjan R. Ethyl glucuronide concentration in serum of human volunteers, teetotalers and suspected drinking drivers. *J. Forensic Sci.* 42, 1099-1102 (1997).

Schmitt G., Droenner P., Skoop G. and Aderjan R. Blood sample containing 1.44 per mille ethanol doesn't contain ethylglucuronide: case report. *Blutalkohol* 34: 371-378 (1997).

Scrimgeour E. M. Outbreak of methanol and isopropanol poisoning in New Britain, Papua New Guinea. *Med. J. Aust.* 2: 36-38 (1980).

Shanagian S., Robinson V. and Jennison T. A. Formate concentrations in a case of methanol ingestion. *Clin. Chem.* 30, 1413-1414 (1984).

Shepherd M.F., Lake K.D. and Kamps M. Post-mortem changes and pharmacokinetics: Review of the literature and case report. *The Annals of Pharmacother.* 26: 510-514 (1992).

Simpson G. Medicolegal alcohol determination: Implication and consequences of irregularities in blood alcohol concentration VS time curves. *J. Anal. Toxicol.* 16: 270-271 (1992).

Skopp G. and Poetsch L. A simple approach to detect cocaine in forensic drug analysis. Proceedings 39th meeting of The International Assoc. For. Toxicologists, Prague, pp.151-155 (2001).

Skoop G. Preanalytical aspects in postmortem toxicology. *Forensic Sci. Int.* 142: 75-100 (2004).

Smith R. M. Arylhydroxi metabolites of cocaine in the urine of cocaine users. *J. Anal. Toxicol.* 20, 463-467 (1984).

Sörbo B. Enzymatic conversion of cyanide to thiocyanate. Proceedings 1st. International pharmacological Meeting, Stockholm. pp. 121-127 (1962).

Spiehler V. and Reed D. Brain concentration of cocaine and benzoylecgonine in fatal cases. *J. Forensic Sci.* 30, 1003-1011 (1985).

Spiehler V. Immunoassays. In Moffat AC, Osselton M.D and Widdop B (Eds) Clarke's Analysis of Drugs and Poisons 2004. Pharmaceutical Press, London, Tome I pp. 301-312 (2004).

Sporkert F. and Pragst F. Use of headspace solid phase microextraction (HS-SPME) in hair analysis for organic compounds. *Forensic Sci. Int.* 107: 129-148 (2000).

Sreerama L. and Hardin G. G. Improper sealing caused by the Styrofoam integrity seals in leak proof plastic bottles lead to significant loss of ethanol in frozen evidentiary urine samples. *J. Forensic Sci.* 48 (3) 672-676 (2003).

Standefer J. Immunological methods. In Müller RK (Eds). Toxicological Analysis. Verlag Molina Press, Leipzig pp. 153-165 (1995).

Staub C. Supercritical fluid extraction of selected pharmaceuticals from water and serum. *J. Chromatog. B* 688, 291-302 (1997).

Stewart R. and Stollman R. Toxicology. Academic press. London. Tome II. pp.104 (1960).

Stewart D. J, Inaba T., Tang B. and Kalow W. Hydrolysis of cocaine in human plasma by cholinesterase. *Life Sci.* 20, 1557- 1564 (1977).

Stewart D.J., Inaba T., Lucassen M. and Kalow W. Cocaine metabolism: cocaine and norcocaine hydrolysis by liver and serum esterases. *Clin Pharmacol. Therap.* 25, 464-468 (1979).

Stimpfl T., Demuth W., Varmuza K. and Vycudilic W. Systematic toxicological analysis: computer assisted identification of poisons in biological materials. *J. Chromtog. B* 789, 3-7 (2003).

Stokes J.B. and Aueron F. Prevention of organ damage in massive ethylene glycol Ingestion. *J. Am. Med. Assoc.* 243: 2065-2066 (1980).

Stoichevich de Suñol M. y Wamba Z. Informe Q-1220. Biblioteca de la Asesoría pericial de Tribunales (1992).

Symington I.S., Anderson R.A., Thomson I., Oliver J.S., Harland W.A. and Kerr JW. Cyanide exposure in fires, *Lancet* 2, 91-92 (1978).

Tanaka E., Honda K., Horiguchi H. and Misawa S. Postmortem determination of the biological distribution of formic acid in metanol intoxication. *J. Forensic Sci.* 36: 936-938 (1990).

Tagliaro F., Smith FP, Turrina S, Equissetto V and Marigo M. Capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 735: 227-235 (1996).

Tedeschi L. Detection of methanol impurities in body fluids by headspace SPME and GC-MS to identify the source of exposure in two fatalities involving methanol. Proceedings 36th TIAFT meeting. V. Sphieler Edition. pp 298-305 (1998).

Terril B.J., Montgomery R.R. and Reinhardt C.F. Toxic gases from fires. *Science* 200, 1343-1347 (1978).

Theodoridis G., Papadoyannis I., Tsoukali Papadoupoulos H. and Vasilikiotis G. A comparative study of different solid phase extraction procedures for analysis of forensic interest in biological fluids by RP/HPLC/DAD. *J. of Liq. Chromatog.* 18 (10) 1973-1995 (1995).

Tonkabony S. E. H. Post mortem blood concentration of methanol in 17 cases of fatal poisoning from contraband vodka. *J. Forensic Sci.* 6: 1-3 (1975).

Toseland P.A. Progress in Forensic Science. *Bull. The Int. Assoc. For. Toxicol.* 29: 10-12 (1999).

Tsatsakis A.M., Michalodimitrakis M.N. and Patsalis A.N. MDEA related death in Crete: a case report and literature review. *Vet. Hum. Toxicol.* 39, 241-244 (1997).

Uges D. Hospital Toxicology. In Moffat AC, Osselton MD and Widdop B. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons 2004. Pharmaceutical Press, London, Tome I pp. 3-36, (2004).

Underwood F. and Bennett W.M. Ethylene glycol intoxication. *J. Am. Med. Assoc.* 226: 1453-54, (1973).

United Nations, Narcotics Drugs. Recommended methods for the detection and assay of heroin, cannabinoids, cocaine, amphetamine, metamphetamine and ring substituted amphetamine derivatives in biological specimens. Manual for use by national laboratories. ST/NAR/27. pp.1-4 (1995).

Van Horne K. C. Sorbent Extraction. Ed. by Technology Analytichem International Inc., Harbor City, California (1985).

Von Oettingen V. F. Ethylene glycol. *U.S. Public Health Bull.* 281: 166-174 (1943).

Wacker E.C.W., Haynes H. and Druyan R. Treatment of ethylene glycol poisoning with ethyl alcohol. *J. Am. Med. Assoc* 194: 1231-1233 (1965).

Walsh D.W., O'Brien D.J. and Arnold J. L. Cyanide Poisoning: Not Just a HAZMAT Issue. *Fire EMS Journal, Web site: WWW. Jems.com/free-resource.html/ . Sep.* (2004).

Wamba Z., Ferrari L.A., Nieto R.R., Arado M.G., Colangelo C.H., Nardo C., Sredcoff N. and Stoichevich S.. Incidence of drugs of abuse and alcohol in suicides occurred in the province of Buenos Aires in 1994,1995 and 1996. Proceedings of 35th. TIAFT World Congress. University of Padova. Pp.638-641 (1997).

Ward M.E. and Meyerhein R.F. Diethyl ether, a chemical asphyxiate used as a prelude to homicide: A report of three cases. *J. Forensic.Sci.* 42: 344-348 (1997).

Warner A. and Norman A. B. Mechanisms of cocaine hydrolysis and metabolism in vitro and in vivo: A clarification. *J. Ther. Drug Monit.* 22: 266-270 (2000).

Watson W.A. and Mc Kinney P. E. Necrokinetics: The practical aspects of interpreting postmortem drug concentration. EAPCCT International Congress, USA. Abstract book, p. 213 (2004).

Wax P. M. It's happening again-Another diethylene Glycol mass poisoning. *Clin. Tox.* 34 (5) 517-520 (1996).

Wennig R. Potential problems with the interpretation of hair analysis result. *Forensic Sci. Int.* 107: 5-12 (2000).

Wetherell H. R. The occurrence of cyanide in the blood of firevictims *J. Forensic Sci.*11, 167-173 (1966).

Wiener H.L. and Richardson KE. Metabolism of diethylene glycol in male rats. *Biochem. Pharmacol.* 38: 539-541 (1989).

Wiley F.H., Heper W.C., Bergen D. and Blood F.R. The formation of oxalic acid from ethylene glycol and related solvents. *J. Ind. Hyg. Toxicol.* 20, 269-277 (1938).

Winek T., Winek C.L. and Wahba W. The effect of storage at various temperatures on blood alcohol concentration. *Forensic Sci. Int.* 78: 179-185 (1996).

Winek C.L., Wahba W., Winek C. L.Jr and Balzer T. Drug and chemical blood level data 2001. *Forensic Sci. Int.* 122: 107-123 (2001).

Winek C. L. Ethylene glycol poisoning. Presented at the 27th annual meeting of the American Academy of Forensic Sciences, Chicago, February 19, (1975).

Winek C. L., Shingleton D. P. and Shanor S. P. Ethylene and diethylene glycol toxicity. *Clin. Tox.* 13: 297-324 (1978).

Winek C.L., Shingleton D.P. and Shanor S. P. Ethylene glycol and diethylene glycol toxicity. In *Toxicology Annual*. Marcel Dekker (Eds). Vol III pp.297-324 (1979).

Winek C. L. In AW Jones (Eds). *Human metabolism of alcohol*. Vol I. CRC Press, (1989).

Winek C. L., Winek T and Wahba WW. The effect of storage at various temperatures on blood alcohol concentration. *Forensic Sci. Int.* 78: 179-185 (1996).

Witheley H. R. The distribution of formate activating enzyme involving tetrahydrofolic acid in animal tissue. *Comp. Biochem. Physiol.* 1, 222-247 (1960).

Woolf A. D. The Haitian Diethylene glycol poisoning tragedy. A dark wood revisited. *JAMA* 279, 1215-1216 (1998).

Wordley E. Diethylene glycol poisoning: Report on two cases. *J. Clin. Pathol.* 1: 44-46 (1947).

Wu Chen N.B. and Donaghue E. R. Methanol intoxication: distribution in postmortem tissue and fluid, including vitreous humor. *J. Forensic Sci.* 30: 213-216 (1985).

Yamazaki M. and Wakasugi C. Postmortem changes in drug metabolizing enzymes. *Forensic Sci.Int.* 67: 155-168 (1994).

Yeoh M.J. and Braitberg G. Carbon monoxide and Cyanide poisoning in fire related death in Victoria, Australia. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 42 (6) 855-863 (2004).

Zamecnik J. and Tam J. Cyanide in blood by gas chromatography with NP detector and acetonitrile as internal standard. Application on air accident fire victims. *J. Anal Toxicol.* 11, 47-48 (1987).

Zaremski P. M. and Hodgkinson A. Plasma oxalic acid and calcium levels in oxalate poisoning. *Clin. Path.* 20: 283-285 (1967).

ANEXO

I. Calibración del integrador C-R4A para la determinación de etanol utilizando isopropanol como Standard Interno

Para llevar a cabo la calibración se utilizó el **método de standard interno** y el ajuste de la curva para el cálculo de concentraciones se efectuó por **cuadrados mínimo**

Esquema de trabajo:

1) Se prepararon 10 réplicas de 5 concentraciones distintas de etanol: 1, 2, 3, 4 y 5 g ‰ (50 muestras totales). Cada patrón se preparó en un frasco hermético conteniendo:

1 ml de etanol patrón correspondiente.

1 ml de isopropanol 1 g. ‰.

1 ml de solución saturada de K_2CO_3

2) Se corrieron los cromatogramas correspondientes usando la calibración preexistente: E221096.

3) Se calculó el promedio de los 10 replicados de cada concentración de etanol utilizada.

Para llevar a cabo el promedio de los replicados de cada concentración se descartaron aquellos valores que se consideraron “sospechosos”, utilizando un ensayo t:

n = número de replicados sin contar el dato sospechoso.

\bar{X} = promedio de replicados sin el dato sospechoso.

σ = varianza calculada sin el dato sospechoso.

\square , grados de libertad = $n-1$.

$\square_x = \square/n$

Entonces,

$$t_{exp} = (X_{sosp} - \bar{X})/\sigma_x$$

Se comparó el t_{exp} con la **t de student**, obtenido de la tabla, para los grados de libertad y el nivel de confianza deseado.

En ese caso se descartaron los valores sospechados que dieran un $t_{exp} > t_{97\% \text{ confianza}}$. De modo que los puntos considerados para obtener el promedio fueron aquellos que, con un 97% de confianza correspondían a la concentración considerada.

- 4) Se llevó a cabo la calibración tomando los cromatogramas cuyos valores de concentración de etanol fueran los más cercanos los promedios obtenidos en

Tabla I valores de etanol emanados de los cromatogramas de muestras patrones inyectadas por sextuplicado y cálculo de promedio

Conc. patrón	conc. medida	Cromatograma	Conc. promedio	Concentrac. seleccionada	Cromatograma seleccionado
0.5 o/oo	0.5526	CA3/2/98 - C4		0.5190	CA3/2/98 - C05
	0.5190	CA3/2/98 - C05			
	0.4940	CA3/2/98 - C0			
1 o/oo	0.9854	C23/12 - C13	1.0362	1.0458	CA2/1 - C02
	0.9922	C23/12 - C14			
	1.0473	C23/12 - C15			
	1.026	C23/12 - C16			
	1.0458	CA2/1 - C02			
	1.0734	CA2/1 - C03			
2 o/oo	2.3058	C23/12 - C3	2.098	2.0474	CA2/1 - C04
	2.2462	C23/12 - C4			
	2.1598	C23/12 - C5			
	2.0473	C23/12 - C7			
	2.0474	CA2/1 - C04			
	1.9653	CA2/1 - C05			
3 o/oo	3.5192	C23/12 - C08	3.3084	3.233	CA2/1 - C09
	3.4148	C23/12 - C011			
	3.5193	C23/12 - C12			
	3.233	CA2/1 - C09			
	3.1552	CA2/1 - C17			
	2.9974	CA2/1 - C16			
4 o/oo	4.4938	CA26/12 - C11	4.2133	4.3386	CA29/12 - C01
	4.5953	CA26/12 - C14			
	4.3415	CA26/12 - C15			
	4.3386	CA29/12 - C01			
	4.4348	CA29/12 - C02			
	4.3415	CA29/12 - C15			
	4.0958	CA2/1 - C12			
	3.865	CA2/1 - C18			
	4.0459	CA2/1 - C19			
5 o/oo	5.8626	CA29/12 - C05	5.5177	5.4884	CA2/1 - C21
	5.6792	CA29/12 - C12			
	5.5113	CA29/12 - C08			
	5.8769	CA29/12 - C07			
	5.654	CA2/1 - C13			
	4.9548	CA2/1 - C14			
	5.1145	CA2/1 - C20			
	5.4884	CA2/1 - C21			

7.5.2. Objetivo del método:

1. Seleccionar la **mejor curva de calibración** entre distintas obtenidas a partir de diferentes cromatogramas. La selección se realiza teniendo en cuenta la ecuación de una recta, □ que expresa los parámetros F1 y F2 en función de las áreas del patrón y el standard interno. La elección de la mejor curva de calibración se basa en la comparación de las gráficas obtenidas y de los coeficientes de regresión (r^2).

2. Cálculo del error Standard en la estima de la concentración de etanol de una muestra problema.

Se reordenó la ecuación que describe a F₂ en función de las áreas y las concentraciones del patrón y del standard interno. Se obtuvo la ecuación de una recta que tiene a F₁ y F₂ como pendiente y ordenada al origen.

$$F_2 = \frac{C_{\text{patrón}}}{C_{\text{stand int}}} \frac{F_1 A_{\text{patrón}}}{A_{\text{stand int}}} \quad (\text{ecuación } \square)$$

De esta ecuación se deduce:

$$\frac{A_{\text{patrón}}}{A_{\text{stand int}}} = \frac{1}{F_1} \frac{C_{\text{patrón}}}{C_{\text{stand int}}} - \frac{F_1}{F_2}$$

De modo que en una gráfica de $A_{\text{patrón}}/A_{\text{stand int}}$. Vs. $C_{\text{patrón}}/C_{\text{stand int}}$ obtenemos:

$$\begin{array}{ll} F_1/F_2 & \text{ordenada de origen} \\ 1/F_1 & \text{pendiente} \end{array}$$

En base a las áreas obtenidas en los cromatogramas utilizados en cada calibración, a través de una computadora utilizando el programa QuatroPro, se calcularon y compararon diferentes regresiones.

Tabla II. Áreas calculadas de los cromatogramas de patrones y estándares internos.
Cálculos de regresión lineal y constantes del equipo.

cromatog	Conc. patrón	Conc. stand int	Area patrón	Area stand int	A patrón/ A stan. int	Conc. patrón/ Conc. stand int	Curva patrón
	0	0			0	0	-0.03326
CA3/2 - C05	0.5	1	2339	12575	0.186004	0.5	0.169424
CA2/1 - C02	1	1	4267	11260	0.378952	1	0.372108
CA2/1 - C04	2	1	11194	15005	0.746018	2	0.777476
CA2/1 - C09	3	1	16767	14204	1.1804421	3	1.182844
CA29/12 - C01	4	1	16078	10141	1.5854452	4	1.588212
CA2/1 - C21	5	1	39530	19698	2.0068027	5	1.99358

Resultado de regresión:

Constante -0.03326
 Err estándar de est.Y 0.019362
 R cuadrada 0.9994
 Núm. de observaciones 6
 Grado de libertad 4

Coefficiente(s) X 0.405368
 Err estándar de coef. 0.004965

$A \text{ patrón}/A \text{ stand int} = -0,03326 + 0405368 \times \text{conc patrón}$

$F1 = 1/\text{coef}$ $F1 = 2.466891$

Constantes del equipo

$F2 = \text{const} \times F'$ $F2 = -0.08204$

$F1 = 2.4653$ $F2 = 0.083$

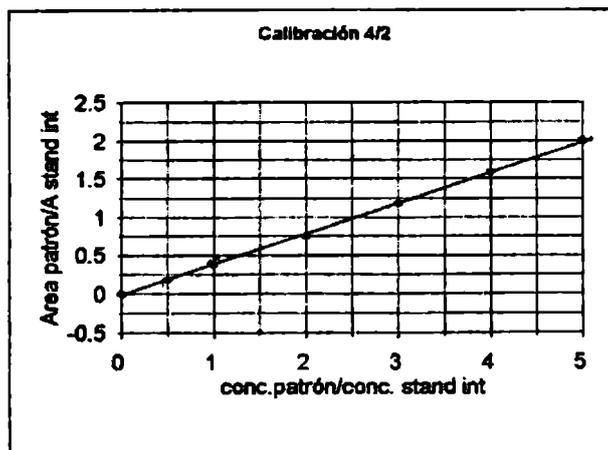


Tabla III. Datos de calibración con indicación de parámetros estadísticos.

Conc. patrón	Cromatograma	conc. medida E221096	Conc. promedio	Conc medida 04/02	Conc. promedio	desv. standard	Intervalo de confianza 95 %	limites superior inferior
0,5 o/oo				0.5239 0.515 0.4938				
1 o/oo	C23/12 - C13 C23/12 - C14 C23/12 - C15 C23/12 - C16 CA2/1 - C02 CA2/1 - C03	0.9854 0.9922 1.0473 1.028 1.0458 1.0734	1.0362	0.9634 0.9695 1.0192 1 1.0179 1.0428	1.002	0.01266	± 0.0253 2.5 %	1.027 0.977 \pm
2 o/oo	C23/12 - C3 C23/12 - C4 C23/12 - C5 C23/12 - C7 CA2/1 - C04 CA2/1 - C05	2.3058 2.2462 2.1598 2.0473 2.0474 1.9653	2.098	2.1562 2.1023 2.0242 1.9226 1.9227 1.8486	2.028	0.0506	± 0.0983 4.9 %	2.1243 1.928
3 o/oo	C23/12 - C08 C23/12 - C011 C23/12 - C12 CA2/1 - C09 CA2/1 - C17 CA2/1 - C18	3.5192 3.4148 3.5193 3.233 3.1552 2.9974	3.3064	3.2522 3.1579 3.2523 2.9937 2.9235 2.7809	3.08	0.0784	± 0.1583 5.2 %	3.218 2.902
4 o/oo	CA26/12 - C11 CA26/12 - C14 CA26/12 - C15 CA29/12 - C01 CA29/12 - C02 CA26/12 - C13 CA2/1 - C12 CA2/1 - C18 CA2/1 - C19	4.4938 4.5953 4.3415 4.3386 4.4348 4.0958 3.865 4.0459	4.2133	4.1327 4.2243 3.995 3.9925 4.0794 4.3187 3.7731 3.7731 3.728	4.03	0.0725	± 0.138 3.45 %	4.168 3.892
5 o/oo	CA29/12 - C05 CA29/12 - C12 CA29/12 - C06 CA29/12 - C07 CA2/1 - C13 CA2/1 - C14 CA2/1 - C20 CA2/1 - C21	5.8626 5.8792 5.5113 5.8769 5.654 4.9548 5.1145 5.4884	5.5177	5.3691 5.2034 5.0518 5.3821 5.1807 5.1807 4.6933	6.147	0.1041	± 0.2103 4.2 %	5.3573 4.937

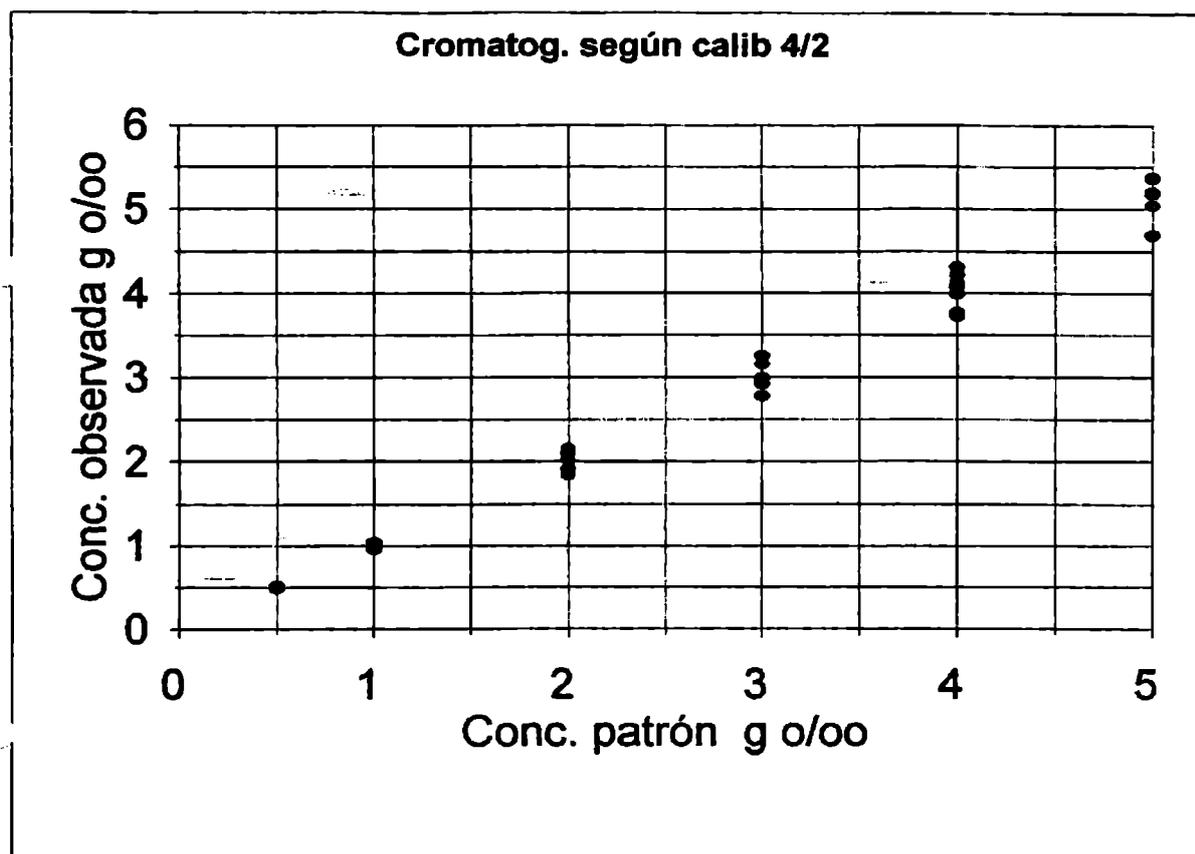


Figura I. Respuesta de las determinaciones de concentración de etanol con los patrones preparados y la concentración observada a través de los resultados cromatográficos.