

## MEMORIA DESCRIPTIVA DE ACCIONES DE INNOVACIÓN DOCENTE

### UNIVERSIDAD DE GRANADA

#### DATOS IDENTIFICATIVOS Título de la acción

Apoyo multimedia a la enseñanza práctica de la Toxicología.

#### Resumen de la acción

La *idea original* de realizar el presente proyecto surge de la necesidad de introducir una experiencia piloto, innovadora, para alumnos de diferentes licenciaturas (Farmacia, Ciencias Ambientales, Medicina y Ciencia y Tecnología de los alimentos) y de diferentes enseñanzas de Postgrado (Escuela Profesional de Medicina del Trabajo y Escuela Profesional de Medicina Legal y Forense adscritas al Dpto. de Medicina Legal y Toxicología, Doctorado en Prevención de Riesgos Laborales -Ciencias del Trabajo- y Master en Prevención de Riesgos Laborales y Gestión de la Calidad en la UGR) que comparten y conllevan una formación práctica en Toxicología. Con objeto de aprovechar la tendencia de los alumnos a utilizar las nuevas tecnologías de la información y comunicación pensamos que el diseño de este tipo de instrumento multimedia podría resultar atractivo y útil para los alumnos facilitando la comprensión de las prácticas programadas y aumentando en número ostensible la existencia de otras muchas. Hay que tener en cuenta que en numerosos casos es imposible la realización de determinadas prácticas debido a que se trata de instrumentación costosa y voluminosa, ensayos muy específicos, material de rutina a disposición del Servicio de Toxicología del Hospital, etc.... De este modo se pone a disposición de los alumnos contenidos prácticos muy útiles para complementar las clases teóricas con enseñanza práctica real y algunas prácticas de no ser mediante el presente proyecto sería enormemente difícil que las pudieran contemplar.

El *objetivo* del presente proyecto de innovación docente ha sido diseñar una interfaz gráfica para la enseñanza práctica de la Toxicología con integración de todos los contenidos (textos, esquemas, imágenes, gráficos, tablas, videos, etc.) en formato html dentro del sitio Web del Departamento de Medicina Legal y Toxicología ([http://www.ugr.es/~dpto\\_legaltoxicops/](http://www.ugr.es/~dpto_legaltoxicops/)) y más concretamente en la página (<http://www.ugr.es/~fgil>). Se ha introducido un acceso con identificación al objeto de facilitárselo exclusivamente a los alumnos o a quién se considere oportuno y se ha incluido un contador de visitas para el control de la entrada. Las claves de acceso son:

- USUARIO: giltox
- CONTRASEÑA: 1988

Dicho interfaz es totalmente interactivo. El proyecto está estructurado en una página de inicio ("homepage") que da acceso a las diferentes áreas de la Toxicología que pretenden abordarse con matiz práctico: Alimentaria, Clínica, General, Industrial y Ambiental.

Esta página web, con sus contenidos, pretende captar la atención de los alumnos, mejorar su enseñanza práctica, complementar su formación teórica y motivarles al estudio mediante la innovación que suponen las nuevas tecnologías tratando de introducir un plus en la formación integral del alumno cumpliendo los objetivos en cada una de las licenciaturas y enseñanzas de postgrado citadas anteriormente.

**Componentes del grupo**

Nombre y apellidos	Área de Conocimiento	Departamento
<b>Coordinador/a:</b> Fernando Gil Hernández	Toxicología	Medicina Legal, Toxicología y Psiquiatría

**Componentes:**

Antonio Pla Martínez	Idem	Idem
Antonio F. Hernández Jerez	Idem	Idem
Lourdes Rodrigo Conde-Salazar	Idem	Idem
Olga López Guarnido	Idem	Idem

**Ámbito de actuación de la acción**

Área de conocimiento  Departamento  Titulación  Centro

**Asignaturas afectadas**

Nombre de la asignatura	Área de Conocimiento	Titulación/es
Toxicología	Toxicología	Farmacia
Toxicología Ambiental	Toxicología	Ciencias Ambientales
Medicina Legal y Toxicología	Medicina Legal y Forense	Medicina
Toxicología Alimentaria	Toxicología	Ciencia y Tecnología Alimentos
Toxicología Industrial	Toxicología	E.P. Medicina del Trabajo
Toxicología Industrial	Toxicología	Master Postgrado y Doctorado

## MEMORIA DE LA ACCIÓN

- La Memoria debe contener un mínimo de 10 páginas y un máximo de 15 páginas y debe contener los apartados señalados.. Escriba el texto dentro de los recuadros correspondientes.
- En el caso de que durante el desarrollo de la acción se hubieran producido documentos o material dignos de reseñar (CD, páginas web, revistas, vídeos, etc.) se aconseja incluir como anexo una copia de buena calidad de los mismos a efectos de evaluación.

### 1. Introducción (Justificación del trabajo, contexto, experiencias previas...)

La idea original de realizar este proyecto de innovación docente surgió de la necesidad de introducir una experiencia piloto, innovadora, para alumnos de diferentes licenciaturas que comparten una formación en Toxicología, permitiéndoles la posibilidad de visualizar prácticas *on-line*.

El proyecto se dirige a las áreas de ciencias experimentales y las titulaciones (así como a las asignaturas) beneficiarias del mismo y que son las siguientes: FARMACIA ("Toxicología", asignatura troncal de 4º curso), MEDICINA ("Medicina Legal y Toxicología", asignatura troncal de 6º curso), CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS ("Toxicología alimentaria", asignatura troncal de 1º curso y "Residuos de Medicamentos en Alimentos", asignatura optativa de 2º curso), CIENCIAS AMBIENTALES ("Toxicología ambiental", asignatura troncal de 3º curso). También se beneficia la asignatura de postgrado "Toxicología Industrial" que se imparte en la ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA DEL TRABAJO, de MEDICINA LEGAL Y FORENSE, así como en el MASTER de Postgrado en PREVENCIÓN DE RIESGOS LABORALES, MEDIOAMBIENTE Y GESTIÓN DE LA CALIDAD, del que es coordinador de Higiene Industrial el investigador principal del presente proyecto de innovación, así como del DOCTORADO EN PREVENCIÓN DE RIESGOS LABORALES ofertado por la Facultad de Ciencias del Trabajo de la Universidad de Granada.

Con objeto de aprovechar la tendencia de los alumnos a utilizar las nuevas tecnologías de la información y comunicación pensamos que el diseño de un instrumento multimedia podría resultar atractivo y útil para los alumnos facilitando la comprensión de las prácticas programadas y aumentando en número ostensible la existencia de determinadas prácticas debido a que se trata de instrumentación costosa y voluminosa, ensayos muy específicos, material a disposición del Servicio de Toxicología del Hospital, etc...De este modo, se pone a disposición de los alumnos contenidos prácticos muy útiles para complementar las clases teóricas con enseñanza práctica real así como algunas prácticas que de no ser mediante el presente proyecto sería enormemente difícil que las pudieran contemplar.

Existía experiencia previa por parte del Área de conocimiento, pero tan sólo en el abordaje de la Toxicología básica. Este aspecto al no integrar imágenes y vídeos de forma simultánea requiere sin duda una menor complejidad.

### 2. Objetivos (Concretar qué se pretendió con la experiencia)

\* Promover una nueva forma de enseñanza y aprendizaje de la "Toxicología Práctica", útil en numerosas licenciaturas en las que el Área de Conocimiento imparte docencia en la Universidad de Granada, la mayoría de ellas de reciente implantación (en los últimos 8 cursos académicos).

\* Promover una nueva forma de enseñanza y aprendizaje de la "Toxicología Práctica", útil en numerosos cursos de postgrado (Doctorado) y master de especialización, así como en las Escuelas Profesionales de Medicina del Trabajo y Medicina Legal y Forense, adscritas ambas al Departamento de Medicina legal y Toxicología y en las que se imparte Toxicología Industrial.

\* Facilitar a los alumnos el acceso a la información necesaria para cumplir los objetivos docentes de cada licenciatura y poder evidenciar el desarrollo de las prácticas programadas antes de llevarlas a cabo en el laboratorio, con el avance en tiempo y en comprensión de las mismas que ello supone.

\* Complementar la formación teórica apoyándose en imágenes y videos que permitan una visión práctica y real.

\* Aprovechar las nuevas tecnologías para captar un mayor interés por parte de los alumnos hacia nuestra materia.

\* Facilitar el trabajo a los alumnos en un futuro inmediato, cuando entren en vigor los nuevos planes de estudio de acuerdo con los criterios del Espacio Europeo de Educación Superior.

### 3. Descripción de la experiencia (Exponer con suficiente detalle lo realizado en la experiencia)

Todas las asignaturas mencionadas anteriormente presentan una parte práctica de interés en cada una de las licenciaturas (Medicina, Tecnología de los Alimentos, Ciencias ambientales) o enseñanzas de postgrado ya mencionadas. Para ello se han seleccionado varias prácticas en cada una de las siguientes áreas de la Toxicología:

1) Toxicología Alimentaria: Determinación Colorimétrica de Nitratos en Productos Cárnicos y Determinación de Clembuterol en Muestras de Hígado.

2) Toxicología General: Fraccionamiento de un extracto y Procedimientos de Mineralización: Digestión Húmeda (microondas); Digestión Húmeda (caliente) y Calcinación.

3) Toxicología Clínica: Determinación de Etanol en sangre: Método Químico y Cromatografía de Gases, Identificación de productos sospechosos: Cannabis y Cocaína, Determinación de colinesterasa en sangre, Supuesta intoxicación medicamentosa (sistema Toxi - Lab®), Determinación de paracetamol mediante HPLC, Determinación de metales pesados por absorción atómica: Llama, Horno de grafito y generador de hidruros y Determinación de Drogas de Abuso mediante sistema Triage®.

4) Toxicología Ambiental: Determinación de estricnina y Determinación de amoniaco

5) Toxicología Industrial: Detección de contaminantes químicos industriales (Equipos portátiles de lectura directa -tubos colorimétricos- y Bombas de muestreo personal) y Determinación de metales en aire (Plomo), Determinación de disolventes en aire (Tolueno), y Detección de gases y vapores tóxicos.

Para ello se han preparado previamente presentaciones en Power-Point con los textos, gráficos, etc...de cada una de las prácticas relacionadas anteriormente y sobre un esquema de cada una de las presentaciones se ha elaborado un guión con la ubicación de las secuencias de imágenes y vídeos. Toda esta información ha sido procesada por la empresa "Área Binaria" quién ha sido la encargada de transformar dichas presentaciones en página Web. En todo momento se ha tratado de que los textos fueran claros, concisos y lo suficientemente explicativos, y las imágenes y vídeos ilustrativos de la práctica de tal forma que permitan al alumno el estudio de la materia y su fácil comprensión a través de esquemas y/o imágenes.

El proyecto está estructurado en una página de inicio ("homepage") en cuya cabecera aparece el acceso a las prácticas correspondientes a las 5 grandes áreas de la Toxicología. En la página de inicio aparece el título del proyecto, referencia a la UGR (Departamento implicado, Vicerrectorado de Innovación) y los profesores que han participado en la elaboración del mismo. Se ha instalado un contador de visitas para tener constancia del número de alumnos que consultan el proyecto. Asimismo, se hace un breve listado de la bibliografía más relevante.

A continuación se describen las prácticas llevadas a cabo en el Proyecto de Innovación (únicamente una pequeña introducción y su fundamento):

## **1) TOXICOLOGÍA ALIMENTARIA**

### **1.A) DETERMINACIÓN COLORIMÉTRICA DE NITRATOS EN PRODUCTOS CÁRNICOS**

El nitrato está presente de forma natural en el medio ambiente como consecuencia del ciclo del nitrógeno. Además está ampliamente distribuido en los alimentos, siendo las principales fuentes de exposición los vegetales y el agua de bebida. En general, el contenido en nitritos de los alimentos es poco relevante.

Por otra parte, las sales sódicas y potásicas de nitratos y nitritos se utilizan como conservantes (*aditivos alimentarios*), especialmente en los productos cárnicos (charcutería), donde el nitrito impide eficazmente el desarrollo de las esporas de *Clostridium botulinum* y por tanto la formación de la toxina botulínica. Asimismo, contribuyen al desarrollo del aroma y a la estabilización del color característico de este tipo de productos.

La toxicidad del nitrato viene determinada por su conversión a nitrito, ya que puede originar metahemoglobinemia por oxidación del  $Fe^{++}$  de la hemoglobina. Altas concentraciones de metahemoglobina pueden dar lugar a efectos tóxicos e incluso a la muerte. Este efecto es especialmente importante en los lactantes. Sin embargo, el riesgo más importante para la salud se debe a que el nitrito puede reaccionar con aminos o amidas para formar "nitroso-compuestos" muchos de los cuales son potentes carcinógenos. Las reacciones de nitrosación pueden tener lugar durante la maduración o el procesado de los alimentos o bien en el tracto gastrointestinal.

El objetivo ha sido identificar y cuantificar los nitratos en un producto cárnico. Su relevancia radica en la enorme toxicidad de los nitratos y nitritos por lo que es enormemente importante que ningún producto cárnico rebase los niveles permitidos.

**Fundamento:** al reaccionar en medio sulfúrico los nitratos con la brucina, se produce una coloración marrón-amarillenta, cuya intensidad es proporcional al contenido en

nitratos presentes, lo que permite su valoración colorimétrica o espectrofotométrica a 410 nm.

### **1. B) DETERMINACIÓN DE CLEMBUTEROL EN MUESTRAS DE HÍGADO**

El clenbuterol es un fármaco con actividad simpático-mimética  $\beta_2$ . En Veterinaria se ha utilizado como broncodilatador en el tratamiento de afecciones pulmonares (por ejemplo, en caballos).

Además de los efectos farmacológicos citados, en los animales tiene un efecto "repartidor" capaz de reducir el contenido graso y aumentar la masa muscular, con la consiguiente ganancia de peso. Aunque este uso como "*promotor del crecimiento*" está prohibido, en ocasiones se emplea de forma fraudulenta, por lo que se requiere un control analítico de aquellos productos animales que puedan ser consumidos por la especie humana.

Actualmente se encuentra sometido a "evaluación toxicológica" para determinar su posible utilización como promotor del crecimiento. Mientras tanto no concluya dicho proceso, su empleo no está autorizado, lo que justifica la necesidad de disponer de herramientas analíticas (laboratorio de Toxicología) que nos permitan detectar su presencia fraudulenta.

**Fundamento:** una vez preparada la muestra de tejido hepático procedente del animal, se procede a una extracción líquido - líquido del clenbuterol con acetato de etilo en medio alcalino. A continuación se realiza una cromatografía en capa fina (CCF). La visualización del clenbuterol se consigue mediante un revelado específico con una mezcla de nitrito sódico y naftil etilendiamina que origina un azo-compuesto coloreado.

## **2) TOXICOLOGÍA GENERAL**

### **2. A) EXTRACCIÓN DE TÓXICOS ORGÁNICOS DE UNA MUESTRA DE ORINA. FRACCIONAMIENTO DEL EXTRACTO**

Los tóxicos orgánicos constituyen el grupo más numeroso entre las diferentes sustancias tóxicas. Ello implica una gran complejidad desde el punto de vista analítico y requiere una metodología amplia que permita abarcar la mayor parte de las necesidades analíticas. Esa gran variedad determina que, en el caso de los tóxicos orgánicos, la extracción -primera fase de todo análisis toxicológico-, sea realmente de la máxima importancia. En función del tipo de análisis que se vaya a realizar (estudio específico de un determinado tóxico o bien un *screening* general) habrá que utilizar unas condiciones concretas para la extracción. Por ello, el objetivo es la investigación general de tóxicos orgánicos utilizando procedimientos de extracción generales, ya que cuando comenzamos un análisis toxicológico, en principio, no sabemos qué tipo/s de toxico/s podría/n estar presente/s en la muestra.

**Fundamento:** Como norma general, los tóxicos orgánicos se extraen con disolventes orgánicos. Entre los más frecuentes para una extracción general se encuentran: éter etílico, cloroformo, diclorometano, etc. En este proceso es fundamental el pH del medio en el que se realiza la extracción, ya que el fundamento de la extracción líquido - líquido consiste en la diferente solubilidad que cada sustancia tiene en agua y/o disolventes orgánicos en función del grado de disociación que sufre dependiendo del pH del medio (sin olvidar el efecto de la mayor o menor liposolubilidad de acuerdo al coeficiente de

partición). Los tóxicos en medio acuoso (como es el caso de las muestras biológicas) se comportan como ácidos, bases o sustancias neutras.

Los ácidos débiles se extraen con disolventes orgánicos en medio ácido, mientras que las bases débiles se extraen en medio básico. Las sustancias neutras se extraen con disolventes orgánicos independientemente del pH del medio.

## **2. B) PROCEDIMIENTOS DE MINERALIZACIÓN: DIGESTIÓN HÚMEDA (MICROONDAS), DIGESTIÓN HÚMEDA (CALIENTE) Y CALCINACIÓN**

Las sustancias tóxicas se encuentran en el organismo firmemente unidas a albúmina, lípidos o glúcidos, siendo requisito indispensable la destrucción de la materia orgánica para abordar su análisis.

La destrucción de la materia orgánica y la consiguiente liberación del tóxico se consiguen mediante el proceso conocido como mineralización, del cual existen dos grandes modalidades:

a) Vía Seca o calcinación

b) Vía Húmeda:

- Clásica: emplea oxidantes energéticos (por ejemplo, la mezcla sulfo - nitro -perclórica)
- Sistema cerrado bajo presión: utiliza la energía de las microondas.

Además, la extracción de algunos metales (As, Pb, Cu, etc,...) se puede realizar a través de la formación de un complejo que posteriormente se separa con un disolvente orgánico (por ejemplo metil-isobutil-cetona). Los aniones pueden analizarse a partir de la diálisis o la cromatografía de intercambio iónico.

### **2.B.a) Digestión Húmeda (microondas)**

**Fundamento:** La acción de un horno de microondas reside en que el agua contenida en cualquier sustancia orgánica o inorgánica absorbe con rapidez energía de las ondas. La frecuencia de las microondas abarcan desde  $10^9$  hasta  $10^{12}$  Hz. El campo eléctrico de una microonda puede hacer girar una molécula de agua en virtud de la carga eléctrica en su interior. Los electrones, de carga negativa, asociados a los átomos de hidrógeno, se desplazan hacia el átomo de oxígeno instados por la fuerte atracción que sienten hacia los ocho protones, cargados positivamente, que tiene el oxígeno. Este desplazamiento hace negativo el lado de la molécula correspondiente al oxígeno y positivo el del hidrógeno. Una carga así distribuida constituye un dipolo eléctrico.

De este modo, aunque la molécula, en su conjunto, sea eléctricamente neutra, forma un campo eléctrico a su alrededor y puede girar por efecto de un campo eléctrico exterior. El momento dipolar es el producto de la carga neta en cada extremo por la separación entre ambas. Usualmente, los momentos dipolares del agua están orientados al azar. No obstante, si aparece un campo eléctrico se crea un momento de giro en cada molécula, obligándola a rotar para que coloque su momento dipolar paralelamente al campo.

Constantemente, cada molécula de agua se ve agitada por el movimiento térmico aleatorio de las circundantes. Dicho movimiento estocástico, llamado a veces movimiento browniano, está relacionado con la temperatura del agua. El calor comunica a las moléculas más energía cinética, de tal suerte que, en su movimiento aleatorio, colisionan con mayor violencia unas con otras produciéndose así un aumento de la temperatura.

Sin duda posee dos grandes ventajas: de una parte, su rapidez (se digieren 8 muestras en 30 minutos) y por otra parte, al ser un sistema cerrado, evita la pérdida de elementos volátiles.

#### **2. B. b) Digestión Húmeda (en caliente)**

**Fundamento:** Aprovecha la energía calorífica producida por los ácidos ayudados además del calor proveniente de una placa calefactora a 80-90 °C. Normalmente utiliza ácidos fuertes (nitrógeno, clorhídrico, sulfúrico, perclórico). También es frecuente la combinación de éstos (mezcla sulfo - nitro - perclórica). También es frecuente la adición de agua oxigenada. Entre sus inconvenientes se encuentran el tiempo requerido para la mineralización, así como la posibilidad de volatilización de determinados elementos.

#### **2. B. c) Calcinación:**

**Fundamento:** trata de aprovechar la energía calorífica producida en el interior de un horno de mufla para destruir la materia orgánica. Usualmente, para la destrucción completa de la materia orgánica se requiere un tiempo aproximado de 4.5 horas y una temperatura de 450 a 500 °C. Entre sus inconvenientes se encuentra el tiempo requerido para la mineralización, así como la posibilidad de volatilización de determinados elementos.

### **3) TOXICOLOGÍA CLÍNICA**

#### **3. A) DETERMINACIÓN DE ETANOL EN SANGRE (ALCOHOLEMIA)**

El alcohol plantea una problemática importante no sólo desde el punto de vista clínico (intoxicaciones agudas, crónicas y toxicomanías) sino también desde el punto de vista médico-legal (accidentes laborales, criminalidad, accidentes de tráfico, etc...). En el BOE del 6/11/98 se recogen las tasas permitidas de alcohol en sangre referidas a la conducción de vehículos a motor. También resulta interesante la correlación entre niveles de alcoholemia y porcentaje de individuos con clínica de intoxicación.

##### **3. A. a) Método Químico**

**Fundamento:** se emplea la técnica de Truhaut - Boudene que incluye: 1) destilación del alcohol en sangre; 2) reducción del reactivo nitro-crómico por el alcohol; y 3) titulación del reactivo anterior mediante tiosulfato mediante yodometría.

##### **3. A. b) Cromatografía de Gases**

**Fundamento:** una muestra de sangre total a la que se le adiciona un estándar interno (n-propanol) es equilibrada en un vial cerrado herméticamente a temperatura constante. El alcohol vaporizado de la muestra es posteriormente analizado por cromatografía de Gases (técnica espacio de cabeza) y detectado con ionización de llama.

#### **3.B) IDENTIFICACIÓN DE PRODUCTOS SOSPECHOSOS: CANNABIS Y COCAÍNA**

La Toxicología Forense requiere del análisis toxicológico para:

- Identificar un producto desconocido que pudiera ser una droga de abuso y/o determinar su pureza, así como identificar/cuantificar posibles contaminantes y/o adulterantes.



- Identificar y/o cuantificar la droga en los fluidos biológicos de un determinado individuo (usualmente sangre y orina; también saliva y cabellos).

Las cuestiones planteadas en la relación a las drogas de abuso en el campo de la Toxicología Forense suelen ser:

- Informar sobre la inclusión o no de una sustancia en alguna de las listas de "estupeficientes" o "psicotropos" o bien si se considera que es una droga tóxica o nociva para la salud.
- Informar sobre la identidad, cantidad y pureza de una sustancia intervenida.
- Informar sobre:
  - a. Si un individuo ha consumido una determinada droga de abuso.
  - b. Si estaba en estado de intoxicación plena o bajo los efectos de una droga o del síndrome de abstinencia cuando cometió un delito.
  - c. ¿Cuáles son los efectos que produce una determinada sustancia sobre la conciencia y la voluntad o sobre el comportamiento (Imputabilidad del sujeto)?

La respuesta a todas las cuestiones requiere del trabajo del Laboratorio de Toxicología

### 3. B. a) Cannabis

La droga (*Cannabis sativa*) según la farmacopea es la "sumidad florida femenina más o menos fructificada con resina y sin las hojas más grandes". Su componente psico-activo es el delta 9- tetrahidrocannabinol ( $\Delta^9$  THC). En función del contenido (de menor a mayor) en  $\Delta^9$  THC, los productos del Cannabis se clasifican en: cáñamo textil, grifa o marihuana, polvo o hachish, resina y aceite.

#### Fundamento:

- Los cannabinoides presentes en la muestra son solubles en disolventes orgánicos como el éter de petróleo.
- Existe una reacción colorimétrica que permite detectar la presencia de cannabinoides.
- La cromatografía en capa fina (CCF) permite detectar la presencia de los 3 cannabinoides principales (Cannabidiol,  $\Delta^9$  THC y Cannabinol). El revelado de la placa se hace con un reactivo de coloración (azul sólido B) que reacciona con los cannabinoides de forma diferente, proporcionando diferente color. Por tanto, la identificación de dichos cannabinoides se realiza en base a su Rf y la coloración (permitiendo detectar la presencia o ausencia de  $\Delta^9$  THC).

### 3. B. b) Cocaína

La cocaína es una de las drogas de abuso más utilizadas en la actualidad. Además puede contener impurezas, adulterantes e incluso otras drogas como la heroína, de ahí que resulte indispensable determinar su pureza.

**Fundamento:** puede identificarse colorimétricamente por medio de un reactivo: el tiocianato de cobalto, dando un color azul turquesa en caso afirmativo. Además puede confirmarse mediante espectrofotometría UV ya que posee máximos a 233 y 275 nm con un espectro característico que no se altera por la presencia de contaminantes y/o adulterantes.

### 3.C) DETERMINACIÓN COLORIMÉTRICA DE LA ACTIVIDAD COLINESTERASA ERITROCITARIA.

La determinación de la actividad colinesterasa eritrocitaria tiene como doble objetivo:  
1) Valor diagnóstico en la intoxicación por compuestos anticolinesterásicos (organofosforados y carbámicos); y  
2) Biomarcador de exposición y/o efectos causados por los agentes anticolinesterásicos (organofosforados y carbámicos).

**Fundamento:** la actividad acetilcolinesterasa se determina colorimétricamente mediante el método de Ellman. La tasa de formación del anión amarillo puede seguirse espectrofotométricamente a 410nm.

### **3. D) SUPUESTA INTOXICACIÓN MEDICAMENTOSA. SISTEMA TOXI-LAB®**

Los tóxicos orgánicos son el grupo de tóxicos más numeroso y el que con mayor frecuencia está implicado en las intoxicaciones. Ello supone una dificultad añadida desde el punto de vista analítico, ya que se necesita cubrir un amplio grupo de sustancias, a veces, con importantes diferencias en sus propiedades físico-químicas.

Para el screening inicial, tras la extracción con disolvente, se pueden utilizar técnicas como la cromatografía en capa fina (CCF), clásicamente la técnica de elección en razón a reunir características de sencillez, rapidez, bajo coste, capacidad de detección simultánea de sustancias presentes en una muestra y requerimientos mínimos en cuanto a instrumental.

Los valores de relación frontal (Rf) en combinación con un revelado secuencial, permiten detectar e identificar por medio de patrones los componentes de los principales grupos terapéuticos de interés (barbitúricos, antidepresivos, benzodiacepinas, etc.).

Aunque el screening de tóxicos orgánicos puede abordarse también por técnicas instrumentales (cromatografía de gases -CG-, cromatografía líquida de alta resolución -CLAR-), la cromatografía en capa fina (CCF) representa una alternativa válida y asequible a cualquier laboratorio.

**Fundamento:** para el screening inicial de una muestra, vamos a utilizar una combinación de varios tests colorimétricos en una primera fase y a continuación la cromatografía en capa fina (CCF). El método descrito de CCF es el que se utiliza habitualmente en el laboratorio de Toxicología del Servicio de Análisis Toxicológicos del Hospital Universitario San Cecilio de Granada, adscrito al Departamento de Medicina Legal y Toxicología de la Universidad de Granada. Emplea un kits comercial (TOXI-LAB®) diseñado, en principio, para suero, orina y/o contenido gástrico.

### **3. E) DETERMINACIÓN DE PARACETAMOL MEDIANTE CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)**

El paracetamol es un analgésico y antipirético que se metaboliza a sulfo y glucurono-conjugados a dosis terapéuticas en su mayor parte, a excepción de un 8% aproximadamente, que se transforma en un metabolito intermedio, muy tóxico (n-acetil-imidoquinona), que es inactivado en el hígado por medio de su conjugación con el glutatión, siendo excretado por la orina como conjugado de cisteína y ácido

mercaptúrico. Sin embargo, a dosis tóxicas, la generación de cantidades importantes del metabolito tóxico agota las reservas de glutatión, lo que implica que la n-acetil-imidoquinona se fije a las macromoléculas de los hepatocitos, causando su necrosis.

El paracetamol produce signos de hepatotoxicidad tardíos, siendo rara su manifestación antes de las 12-18 h, de ahí que tenga especial trascendencia el control analítico y cuantificación en supuestas intoxicaciones. Así, la ictericia se manifiesta a las 48-72 h y la necrosis masiva se hace aparente al 4º día, precedida usualmente de un cuadro de insuficiencia hepática. Por este motivo es fundamental conocer cuáles son las dosis tóxicas y valorarlas mediante el análisis toxicológico.

**Fundamento:** la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR o HPLC) se caracteriza porque el eluyente es impulsado por medio de una bomba a través de la columna a presiones elevadas. Por lo demás, presenta en común con la cromatografía de gases la columna permanente y reutilizable de alta eficacia (en especial, las capilares), el sistema de termostatación (no imprescindible en CLAR), la circulación continua del eluyente, la detección continua y la visualización gráfica del resultado (cromatograma), siendo la precisión mayor en la CLAR.

Posee la gran ventaja de poder aplicarse a aquellas sustancias susceptibles de alterarse químicamente. Además no destruye la muestra, requiere una mínima preparación de la misma y suele emplear pequeñas cantidades de ésta. Un ejemplo muy significativo de gran interés en Toxicología Clínica lo constituye la cuantificación de paracetamol en plasma mediante CLAR o HPLC.

La CLAR en "fase reversa" (fase estacionaria apolar / fase móvil polar) permite la resolución de la mayor parte de problemas en Toxicología Analítica donde se opta por la cromatografía líquida (analgésicos, antidepresivos, ansiolíticos, anticonvulsivantes, antihipertensivos, diuréticos, etc,...). Entre los detectores más empleados encontramos el ultravioleta y el de fluorescencia.

### **3.F) DETERMINACIÓN DE METALES POR ABSORCIÓN ATÓMICA: Llama, Horno de Grafito y Generación de Hidruros.**

El empleo de la espectrofotometría de absorción atómica (EAA) es el método analítico de elección para el análisis de trazas de metales pesados y metaloides en diversas matrices (fluidos biológicos, alimentos, filtros de captación ambiental, etc....). Esta técnica, por tanto, permitirá valorar el grado de contaminación medioambiental, la exposición a determinados tóxicos industriales en un colectivo de trabajadores, el nivel de metales en un alimento, etc....

Para el análisis concreto de cada uno de los contaminantes se emplean diferentes técnicas analíticas:

- EAA con Llama (Ejemplos.: Cu, Zn)
- EAA con Horno de Grafito (Ejemplos.: Pb, Cd)
  
- EAA con Generador de Hidruros:
  - sin llama (Técnica de Vapor Frío) (Ejemplo.: Hg)
  - con llama (Ejemplos.: As, Se)

**Fundamento:** al suministrar una determinada cantidad de energía a un átomo cualquiera en estado fundamental ( $E_0$ ), ésta es absorbida por el átomo de tal forma que se

incrementará el radio de giro de sus electrones de la capa externa llevando al átomo a un nuevo estado energético ( $E_1$ ) que llamamos excitado. Cuando éste vuelve a su estado fundamental, cede una cantidad de energía cuantitativamente idéntica a su energía de excitación, emitiendo radiaciones a longitudes de onda determinadas.

Cuando los átomos en estado fundamental se encuentran con las mismas radiaciones que ellos mismos son capaces de emitir, se produce una absorción de las mismas, desplazándose el equilibrio hacia la izquierda y pasando los átomos del estado fundamental al excitado. El fenómeno de absorción de radiaciones a determinadas longitudes de onda en el caso particular en que el medio absorbente sean los átomos en estado fundamental, se conoce como Espectroscopía de Absorción Atómica.

### **3. G) DETERMINACIÓN DE DROGAS DE ABUSO- SISTEMA TRIAGE®**

Se trata de un procedimiento inmunoquímico patentado. Es pues un inmunoensayo competitivo en el cual derivados de drogas químicamente marcadas (conjugado de drogas), compiten en una muestra con las moléculas de droga hipotéticamente presentes y capaces de ocupar los sitios de unión de los anticuerpos.

**Fundamento:** tras una breve incubación en la cámara de reacción (fase líquida), la mezcla de reacción se transfiere al campo de detección (fase sólida). Como resultado de la unión específica de los anticuerpos a las moléculas de droga, en la muestra permanece un conjugado de drogas libre, capaz de unirse a anticuerpos monoclonales inmovilizados sobre la membrana en el campo de detección.

Después de un proceso de lavado para eliminar el conjugado de drogas no unido y aclarar el fondo, se visualizan los resultados. Una *muestra es positiva* para una o varias clases de drogas cuando se visualiza una o varias *bandas violetas* en las correspondientes zonas de detección denominadas con el nombre abreviado de la clase de drogas.

## **4) TOXICOLOGÍA AMBIENTAL**

### **4. A) DETERMINACIÓN DE AMONIACO EN EL AIRE**

El amoníaco se utiliza en la producción de sulfato y nitrato amónico que se emplean como fertilizantes. También se usa para la oxidación de ácido nítrico, en la producción de hidróxido sódico, de urea sintética y para la preparación de soluciones acuosas usadas en la industria química y farmacéutica. Igualmente se emplea en refrigeración para producir temperaturas por debajo del punto de congelación y para la producción de hielo artificial.

En el ambiente industrial es más frecuente la intoxicación aguda comportándose como un irritante del tracto respiratorio superior cuando la concentración supera los 100 mg/m<sup>3</sup>. Las salpicaduras oculares son especialmente peligrosas pudiendo llegar a ocasionar perforación corneal.

**Fundamento:** el amoníaco en unión al ácido sulfúrico forma sulfato amónico que al adicionarle el reactivo de Nessler forma un complejo de color amarillo-marrón. La concentración de amoníaco se determina leyendo la absorbancia de la solución coloreada a 440 nm y comparándola con una curva estándar.

#### 4. B.) DETERMINACIÓN DE ESTRICNINA EN MUESTRAS DE HÍGADO

La estricnina es un alcaloide que procede de ciertas plantas exóticas de la familia de las loganiáceas (*Strychnus nux vomica* y *Strychnus ignatii*) que se cultivan en Asia tropical. La mayor riqueza alcaloidea se encuentra en las semillas (nuez vómica y habas de San Ignacio) y en la corteza (falsa angostura).

Tiene una estructura química muy compleja, con un núcleo indólico cuya fórmula empírica es  $C_{21}H_{22}N_2O_2$ . El alcaloide -en estado de base-, es un polvo blanco, cristalizante y de sabor muy amargo. Es prácticamente insoluble en agua y bastante soluble en éter, benceno, alcohol amílico pero, sobre todo, en cloroformo. Con los ácidos minerales y algunos derivados orgánicos forma sales solubles en agua (sobre todo las primeras).

Las intoxicaciones se producen con diversas preparaciones como el arseniato de estricnina, ciertos polvos y cebos matarratas, cebos para zorros y lobos, etc..., que contienen estricnina en proporciones del 1 al 5 % lo que los hacen muy peligrosos a nivel ambiental y ecotoxicológico.

También se han producido algunos accidentes tóxicos en niños al ingerir pastas matarratas o cebos que imprudentemente se dejaron en lugares accesibles. Asimismo podrían darse intoxicaciones en los supuestos de ingesta de vísceras de animales capturados con cebos impregnados con estricnina (práctica prohibida).

**Fundamento:** La estricnina puede extraerse a partir de una solución alcalina de la muestra. Una alícuota del concentrado del extracto se enfrenta al reactivo de Mandelin, dando origen a unos cambios característicos de color. En el caso de la cromatografía en capa fina (CCF), se emplea el extracto clorofórmico que se evapora a sequedad y se redisuelve en cloroformo para purificarlo. Unas manchas de color violeta intenso a un  $R_f$  de 1,20 en Toxi-Lab® se corresponden con la estricnina.

#### 5) TOXICOLOGÍA INDUSTRIAL

##### 5. A) DETECCIÓN DE CONTAMINANTES QUÍMICOS: EQUIPOS PORTÁTILES DE LECTURA DIRECTA (SISTEMA DRÄGER Y TUBOS COLORIMÉTRICOS) Y BOMBAS DE MUESTREO PERSONAL

Uno de los principales aspectos de la Toxicología Industrial se centra en el conocimiento de las concentraciones de tóxicos en el ambiente de trabajo. Ello permitirá poder comparar los resultados obtenidos con los valores de referencia que se emplean como criterios de toxicidad y que de acuerdo con el RD 374/2001, en nuestra normativa son el VLA-ED (Valor Límite Ambiental de Exposición Duradera) y el VLA-EC (Valor Límite Ambiental de Corta Exposición).

La presencia de un contaminante en el aire ambiente puede valorarse mediante técnicas de muestreo pasivo (a través de sólidos adsorbentes o sólidos impregnados con reactivos específicos) o de muestreo activo, siendo sin duda estas últimas las más frecuentemente utilizadas.

Entre las técnicas de muestreo activo encontramos los instrumentos que permiten una medida directa, así como aquellas que permiten el muestreo sobre soportes. La toma de muestras sobre soportes incluye tres posibilidades: soluciones absorbentes (un ejemplo serían los impingers o frascos lavadores -ver Toxicología Ambiental, -determinación de Amoniaco-), membranas porosas o filtros y sólidos adsorbentes.

La toma de muestras sobre membranas porosas se realiza usualmente sobre filtros de 37 mm de diámetro y con un tamaño de poro que oscila entre 0.45 y 5 micras. La composición de dichas membranas es variable. Las más frecuentes suelen ser de celulosa aunque también existen de nitrocelulosa, acetato de celulosa, fibra de vidrio, policarbonato, PVC, teflón y nylon.

Respecto al muestreo sobre sólidos adsorbentes, se emplean tubos de vidrio rellenos de carbón activo. En relación al procedimiento de aspiración, existen dos modalidades:

\* Sistema Dräger: sistema portátil de lectura directa

\* Bombas de Muestreo Personal : para muestreos de larga duración

Los tubos colorimétricos (acoplados al sistema Dräger), probablemente sean los más empleados para la medición y comprobación de contaminantes en aire de forma rutinaria. Para mediciones a corto plazo (medición puntual) hay disponibles un número considerable de tubos (más de 150). Algunas casas comerciales (como por ejemplo Dräger) dispone del Dräger CMS® que es un sistema de detección digital mediante chips, siendo en la actualidad uno de los métodos de detección más exactos y fiables.

#### **5. A. a) Equipos Portátiles de Lectura Directa (Sistema Dräger y Tubos Colorimétricos)**

**Fundamento:** los aparatos colorimétricos de lectura directa se valen de las propiedades químicas de un contaminante que producen una coloración determinada al entrar en contacto con un agente químico. El indicador colorimétrico o tubo detector está constituido por sílice gel, alúmina o piedra pómez impregnados con una sustancia química que reacciona con el contaminante e indicará la concentración del gas o vapor a través del cambio o viraje de color, pudiendo visualizarla directamente en la escala graduada impresa sobre el tubo reactivo. Por lo general, la unidad de medida está indicada en ppm (partes por millón).

#### **5. A. b) Bombas de Muestreo Personal: Determinación de Metales en Aire (Plomo)**

**Fundamento:** la muestra se recoge haciendo pasar un volumen conocido (entre 200 y 1200 l) de aire contaminado a través de un filtro de ésteres de celulosa mediante una bomba de muestreo personal. Una vez captada la muestra, se trata con ácido nítrico para destruir la matriz orgánica y disolver el metal presente en la misma. El plomo contenido en la muestra se analiza mediante Espectrofotometría de Absorción Atómica con horno de grafito a una longitud de onda de 283,3 nm lo que permite su cuantificación.

#### **5. A. c) Bombas de Muestreo Personal: Determinación de Disolventes en Aire (Tolueno)**

**Fundamento:** la muestra se recoge haciendo pasar una cantidad conocida de aire contaminado a través de un tubo de relleno de carbón activo, mediante una bomba de muestreo personal, quedando los vapores orgánicos adsorbidos sobre el carbón. Posteriormente se desorben con sulfuro de carbono (método 1) o bien con carbonato de etileno (método 2) y se analiza la disolución resultante en un cromatógrafo de gases equipado con un detector de ionización de llama.

### **5. B) DETECCIÓN DE GASES Y VAPORES TÓXICOS**

En muchas aplicaciones industriales se utilizan sistemas móviles o portátiles de detección de gases para el control de la seguridad. Los peligros pueden tener distintos

orígenes. Entre ellos señalamos el escape de gases tóxicos (metano o  $CH_4$ , sulfhídrico o  $SH_2$ , monóxido de carbono o  $CO$ , entre otros), la falta o el exceso de oxígeno u  $O_2$ , el aumento de dióxido de carbono o  $CO_2$ , etc...

Si estos peligros se detectan precozmente, el sistema de alarma puede iniciar contramedidas para proteger a los trabajadores, sus puestos de trabajo y por tanto, a las industria en general.

Han sido concebidos para medir en depósitos de basura, en fábricas, en canalizaciones, en canales de aguas residuales, plataformas, en barcos y en cualquier lugar en el que exista un riesgo elevado de exposición a gases y vapores susceptibles de medida directa.

La pantalla LCD del medidor de gas ofrece una iluminación de fondo automática que permite su lectura incluso en condiciones adversas. Existen además pilotos de aviso que actúan a modo de alarmas visibles.

Lo ideal sería llevar el medidor de gases como protección personal pegado al cuerpo (por ejemplo, enganchado al cinturón), siendo útil al recorrer canalizaciones subterráneas y muy especialmente, en la industria química.

**Fundamento:** los equipos de detección de gases están basados en distintas tecnologías de sensores. Dependiendo de la aplicación y de la sustancia a detectar se utilizan distintos sensores como físicos infrarrojos, catalíticos o electroquímicos.

#### 4. Material y métodos (Describir la metodología seguida y, en su caso, el material utilizado)

\* Preparación de las presentaciones correspondientes a cada práctica, en formato Power-Point. Éstas incluían:

a) Una base de texto, suficiente como para facilitar el seguimiento de la práctica pero sin llegar a ser prolijo.

b) Imágenes y tablas escaneadas elaboradas a partir de información bibliográfica existente en el Departamento de Medicina Legal y Toxicología u obtenidas a través de Internet en relación con cada práctica.

c) Grabación de Videos de cada práctica.

d) Selección de las secuencias más representativas de los vídeos.

e) Reportaje fotográfico de las prácticas.

f) Diseño de la interfaz gráfica, con integración de todos los contenidos (texto, imágenes, gráficos, tablas y vídeos) por la empresa "Área Binaria".

g) Inclusión de los contenidos del proyecto en el espacio Web reservado.

#### 5. Resultados obtenidos y disponibilidad de uso (Concretar y discutir los resultados obtenidos y aquellos no logrados, incluyendo el material elaborado y su grado de disponibilidad).

Finalmente se ha elaborado una página Web, ubicada dentro del Web del Departamento de Medicina legal y Toxicología, disponible para aquellos usuarios que lo deseen. Así, se ha informado a los alumnos del curso 2007-2008 de la ubicación y de sus claves para

que puedan acceder a la misma desde sus domicilios, ordenadores de bibliotecas de la UGR, red inalámbrica del Campus virtual de la UGR, e incluso desde las propias aulas de docencia.

#### **6. Utilidad de la experiencia (Comentar para qué ha servido la experiencia y a quienes o en qué contextos podría ser útil).**

La experiencia de momento ha sido útil para los profesores involucrados en la misma. En el curso académico que está apunto de comenzar, hemos recibido opiniones muy favorables por parte de los alumnos de Licenciaturas que ya han sido convocados a las prácticas y que disponen de la posibilidad de visualizarlas con antelación. El presente proyecto también se hará extensivo a los alumnos de postgrado de los diferentes Master que oferta la UGR (tanto de enseñanza presencial como virtual). Se ha implantado también en las dos Escuelas Profesionales de la Universidad adscritas a nuestro Departamento (Medicina Legal y Forense y Medicina del Trabajo).

#### **7. Observaciones y comentarios (Comentar aspectos no incluidos en los demás apartados)**

Se adjunta como anexo un DVD con el proyecto de innovación. Esta experiencia se ha presentado como Ponencia al XVII Congreso de la Asociación Española de Toxicología, que se celebró en Santiago de Compostela durante los días 26 a 28 de Septiembre de 2007. Asimismo se incluyó una Comunicación que ha recibido el premio a la mejor Comunicación en la Mesa Docencia en Toxicología exequo con la presentada por el Prof. Hernández Jerez sobre la enseñanza básica de la Toxicología, también de la UGR.

#### **8. Autoevaluación de la experiencia (Señalar la metodología utilizada en la evaluación y los resultados de la experiencia)**

Se ha instalado un contador de visitas, sin embargo aún no se ha evaluado la experiencia en grado al ser éste el primer año en el que se implanta el Proyecto. En postgrado (Escuelas Profesionales) el 94,5 % de los que contestaron a la encuesta manifestaron que conocían la página Web, y el 80% la ha utilizado alguna vez, aunque prácticamente la totalidad la empleó menos de 5 veces. Este aspecto variará enormemente en las enseñanzas de postgrado donde han de consultar al menos 5 prácticas como mínimo. En general, la respuesta ha muy sido satisfactoria con la implantación del Proyecto.

#### **9. Bibliografía**

Villanueva Cañadas, E.  
Gisbert Calabuig. Medicina Legal y Toxicología  
Editorial Masson, Barcelona, 2004; páginas 759-769

Klaassen CD.  
Casarett and Doull's Toxicology. The basic science of poisons.  
5ª ed., MacGraw Hill, New York, 1996