

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

**"VALIDACION DE METODO ESPECTROFOTOMETRICO, COMO  
METODOLOGIA ALTERNA, PARA LA MEDICION  
DE ALCOHOL EN SANGRE"**

**INFORME DE TESIS**

**PRESENTADO POR  
BARBARA JANNINE TOLEDO CHAVES**

**PARA OPTAR EL TITULO DE:  
QUIMICA FARMACEUTICA**

**GUATEMALA, JULIO DE 2000**

**PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
Biblioteca Central**

## JUNTA DIRECTIVA

### FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

DECANA: Licda. Hada Marieta Alvarado Beteta

SECRETARIO: Lic. Oscar Federico Nave Herrera

VOCAL I: Dr. Oscar Manuel Cobar Pinto

VOCAL II: Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda

VOCAL III: Lic. Rodrigo Herrera San José

VOCAL IV: Br. César Alfredo Flores López

VOCAL V: Br. Manuel Anibal Leal Gómez

DL

06

+ (2093)

## DEDICATORIA

**A DIOS:** SER SUPREMO QUE ME HA DADO LA VIDA

**A MIS PADRES:** GERARDO ARTURO TOLEDO Y BÁRBARA CHAVES DE TOLEDO POR GUIARME EN TODO MOMENTO Y POR EL AMOR INCONDICIONAL QUE ME HAN DADO SIEMPRE.

**A MIS HERMANOS:** PABLO FRANCISCO Y GERARDO SAMUEL POR EL APOYO QUE ME HAN OFRECIDO.

**A MIS ABUELOS:** POR SU EJEMPLO Y SABIDURIA

## AGRADECIMIENTOS

A LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA, EN ESPECIAL A LA FACULTAD DE CIENCIA QUIMICAS Y FARMACIA, POR SER MI CASA DE ESTUDIOS.

A MI ASESORA LICDA. MIRIAM OVALLE DE MONROY, POR SUS ENSEÑANZAS Y AMISTAD.

AL PERSONAL DEL LABORATORIO QUIMICO SECCIÓN DE TOXICOLOGIA DEL MINISTERIO PUBLICO, POR SU COLABORACION PARA REALIZAR ESTE TRABAJO.

A NESTOR ELIAS CHAJON ALVARADO POR SU AYUDA, APOYO Y AMOR BRINDADO SIEMPRE.

## INDICE

01.RESUMEN.....	01
02.INTRODUCCION.....	03
03.ANTECEDENTES.....	04
04.JUSTIFICACION.....	10
05.OBJETIVOS.....	11
06.HIPOTESIS.....	12
07.MATERIALES Y METODOS.....	13
08.RESULTADOS.....	20
09.DISCUSION DE RESULTADOS.....	28
10.CONCLUSIONES.....	31
11.RECOMENDACIONES.....	32
12.REFERENCIAS.....	33
13.ANEXOS.....	35

## 1. RESUMEN

Es importante que dentro de un Laboratorio de Análisis Químico, todos los métodos que se utilicen, sean validados con el fin de asegurar que éstos proporcionen resultados confiables, precisos, reproducibles y exactos.

Por lo anterior, se procedió a realizar el trabajo de validación del método espectrofotométrico para cuantificar los niveles de alcohol en sangre, basándose en el objetivo primordial de poder contar con un método alternativo al de cromatografía de gases con detector de llama FID que actualmente se utiliza para dicha cuantificación; esto en caso que dicho equipo presente alguna falla y que su reparación tome un período largo de tiempo atrasando así el análisis de muestras urgentes o bien se desee emplearlo como procedimiento básico en laboratorios regionales en un futuro.

El método propuesto, tiene como fundamento que al someter a calentamiento la muestra, los vapores de etanol que son liberados de la misma, al ponerse en contacto con la mezcla sulfocrómica (reactivo que se utiliza), provoca la reducción del cromo +6 de color amarillo a cromo +3 de color verde. Se mide entonces, la variación en intensidad de color, la cual será proporcional a la cantidad de etanol presente en la muestra.

La hipótesis del estudio plantea que la determinación cuantitativa de alcohol etílico en sangre por el método espectrofotométrico proporciona datos reproducibles y confiables por lo que el mismo puede implementarse como metodología alterna.

Inicialmente se efectuó la calibración con patrones acuosos de etanol de concentración entre 0.5 y 4.0 g/L. Estos resultados, se sometieron a la evaluación

estadística, la cual indicó que el método no posee la linealidad necesaria para reportar datos precisos, exactos y reproducibles.

Complementariamente se analizaron 50 muestras por triplicado en donde también se observó que los datos que se reportaban no eran congruentes con los que el método de cromatografía de gases señalaba.

## 2.INTRODUCCION

La importancia que tiene el alcohol etílico desde el punto de vista toxicológico y médico-legal, radica en el amplio consumo de bebidas que lo contienen en proporciones variables, por lo que producen un estado de embriaguez en los consumidores, estado que es causa principal de muchos delitos ( 21).

Debido a que en Guatemala, el consumo de alcohol es bastante alto, se hace necesario establecer el grado de alcoholismo en individuos que han ingerido bebidas de este tipo para resolver casos legales o en los casos de fallecimiento para esclarecer si la sustancia en mención pudo ser la causante directa o potencializadora del suceso.

En virtud de lo anterior y como alternativa a las limitantes que pudiera presentar la cromatografía de gases, se pretendió validar un método espectrofotométrico para cuantificar los niveles de alcohol en sangre -alcoholemia-. Para ello se utilizaron muestras de sangre obtenidas de cadáveres, (desconociendo antecedentes e historia), para establecer por medio de una reacción colorimétrica (detectada en la región visible del espectro) la cantidad de alcohol presente en la muestra.

Lo anterior, también basaba su importancia en la necesidad de contar con un método alterno y confiable que proporcione datos reproducibles y reales, para el Laboratorio Químico Sección de Toxicología del Ministerio Público, en caso que el método que actualmente se utiliza para la cuantificación (cromatografía de gases acoplada a un detector de llama (FID) con el auxilio de un estándar interno adicionado a la muestra), llegue a fallar por alguna circunstancia o bien sea demasiada la demanda del análisis. Se tomó de referencia éste, porque es el método más moderno que existe<sup>(8)</sup>, que además involucra a un aparato cuya confiabilidad está muy cerca del 100%. Así mismo este método ha venido a sustituir al que se utilizaba anteriormente, el cual consistía en una destilación de la muestra (sangre) con ácido pícrico y posteriormente una titulación con tiosulfato de sodio<sup>(19)</sup>.



### 3.ANTECEDENTES

Se han realizado varios trabajos en relación a cuál sería el mejor método para cuantificar la alcoholemia, pero la conveniencia de un determinado método dependerá no sólo de la exactitud con que se quiere obtener los resultados sino que también de las posibilidades económicas con que se cuenten. Así por ejemplo, en la Universidad de San Carlos de Guatemala, en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, se encontraron los siguientes trabajos de tesis relacionados con el tema:

- "COMPARACION DE METODOS PARA DOSIFICAR ALCOHOL EN SANGRE", realizado por la estudiante Edna Rubio en 1981. Llegando a la conclusión que hay varios métodos que dan resultados precisos y exactos para la cuantificación de alcohol en sangre, entre ellos, el método nitrocromico, el método enzimático o el método colorimétrico con destilación propuesto por Sunshine.
- "EVALUACION DE DOS METODOS DIRECTOS DE CROMATOGRAFÍA GAS-LIQUIDO PARA LA DETERMINACIÓN DE ALCOHOL EN SANGRE", realizado por la estudiante Lys Morales Estrada en 1994. Llegando a la conclusión que el método colorimétrico con destilación propuesto por Sunshine proporciona datos exactos y precisos.

En la bibliografía, se encontraron también otros métodos que se han utilizado tanto para cuantificar como para identificar la presencia de alcohol en sangre. Estos han ido desarrollándose, dependiendo de las necesidades, a lo largo de la historia.

### **METODOS CLINICOS:**

Con estos métodos, se determina si la persona mediante su consumo de alcohol ha llegado hasta el punto de perder el control de sus facultades físicas y mentales o bien establecer si su comportamiento es debido a una condición patológica. Se recurre entonces a evaluar el olor a líquidos alcohólicos en el aliento y en las materias vomitivas de la persona así como el manejo de sus facultades. Para esto se puede recurrir al siguiente tipo de observaciones:

- Lengua seca, saburral o salivación excesiva
- Conducta general como insolencia, locuacidad, excitación o indeferencia
- Estado de los vestidos especialmente el desorden
- Perdida o confusión de la memoria
- Forma de andar, temblor, errores en la coordinación
- Caracteres de la respiración y presencia de hipo
- Estado de las pupilas y su reactividad, entre otras

Es importante tomar en cuenta que la evaluación médica previa a la realización del análisis es de suma importancia y en muchos países obligatoria en sujetos implicados en actos delictivos o accidentes de diferente tipo.

### **METODOS BIOQUIMICOS:**

Estos consisten en dosificar el alcohol en la sangre o en otros humores orgánicos de donde se pueda analizar la presencia de alcohol en el organismo.

Los métodos bioquímicos se pueden dividir en dos (1):

A) MÉTODOS INCRUENTOS-

Tienen por objeto eliminar las objeciones que se han planteado a la extracción de sangre, en especial si se realiza en contra de la voluntad de la persona. Se utiliza, para realizar estas pruebas, la orina, la saliva y el aire espirado.

B) MÉTODOS CRUENTOS-

Estos utilizan como muestra de análisis, la sangre y se dividen en dos según su fundamento.

**Métodos Inespecíficos:** Se basan en la capacidad reductora del alcohol

**Métodos Específicos.-** Que son capaces de identificar el etanol como tal y permiten su dosificación.

Las siguientes metodologías descritas, pueden ser cruentes o incruentes dependiendo del fluido empleado.

**METODO DEL DICROMATO: (cualitativo)**

En 1863 Anstie (2) reportó que el reactivo que ahora lleva su nombre (dicromato de potasio disuelto en ácido sulfúrico concentrados) cambiaba a temperatura ambiente de un color amarillo a uno azul-verdoso al hacerle pasar aire que había sido pasado por una solución acuosa diluida de alcohol. Este cambio de color muestra que el cromo redujo su valencia de +6 a +3 con la oxidación del alcohol. El alcohol es convertido en ácido acético.

**METODO DE YODURO DE ALQUILO DE GETTLER Y UMBERGER (3) : (cuantitativo)**

El dióxido de carbono en forma gaseosa, es pasado a través de la sangre o de una solución de alcohol, a 100 °C y después a través de una solución de yoduro de

hidrógeno al 70% calentada a 130 – 135 °C. El alcohol que es acarreado es convertido en yoduro de etilo que luego se hace pasar por una solución de tiosulfato y luego por un contenedor con bromuro y acetato de potasio disueltos en ácido acético glacial más un litro de agua. Se agrega un exceso de yoduro de potasio y el yoduro que se libera se titula con una solución estándar de tiosulfato.

#### **METODO DE PENTOXIDO DE YODO DE HAGGARD Y GREENBERG (4): (cuantitativo)**

El alcohol más un poco de agua de la muestra, es vaporizado y hecho pasar por un tubo que contiene pentóxido de yodo ( $I_2O_5$ ) sólido calentado a 150 °C. El alcohol es oxidado y la reacción forma una mezcla de  $I_2$  y HI que son determinados por titulación con tiosulfato seguido de una titulación con un estándar base.

El método puede aplicarse previa destilación de la muestra.

#### **METODO DE PERMANGANATO ALCALINO DE FRIEDEMANN Y KLAAS (5): (cuantitativo)**

A la muestra del material orgánico se le agrega agua, tungstato de sodio y sulfato de mercurio en ácido sulfúrico 2 N y se pone a destilar para remover la acetona. El destilado puede ser purificado al adicionar sulfato de mercurio y un exceso de hidróxido de calcio y redestilando. Una alícuota del destilado se mezcla con permanganato de potasio e hidróxido de sodio 5 N y se mantiene a 100 °C por 20 min. Se enfría, acidifica y el permanganato que no reaccionó se determina al agregar un exceso de KI y titulado con un estándar de tiosulfato.

**METODO DE PERMANGANATO ACIDO DE HARGER (6,7): (cuantitativo)**

El reactivo consiste en permanganato de potasio y ácido sulfúrico el cuál reacciona rápidamente con el alcohol, a temperatura ambiente, siendo el punto final de la reacción cuando únicamente queda una tenue coloración púrpura. En esta reacción, 1 mL de permanganato de potasio 0.05 N equivale a 0.169 mg de etanol.

\* Únicamente es aplicable combinado con previa destilación de la muestra

**METODO DE IRWING SUNSHINE (17,19): (cuantitativo)**

Este propone un método de destilación directa y porciones del destilado son leídas en el espectrofotómetro, Debiendo tomarse en cuenta que existen sustancias que interfieren en la lectura como el formaldehído, metanol, paraldehído e isopropanol

**METODO DE LA ALCOHOL DESHIDROGENASA (1, 8): (cuantitativo)**

Este es un método enzimático que fue propuesto en 1951 por Bucher y Redetzki y por Theorell y Bonischen. Se basa en que la enzima alcohol-deshidrogenasa actúa como catalizador en una reacción de transporte durante la cuál el alcohol etílico se transforma por deshidrogenación en aldehído acético, mientras se hidrogena simultáneamente un aceptor específico que es el DPN (difosfopiridín nucleótido). El  $\text{DPNH}_2$  que se forma se mide espectrofotométricamente a 340 nm. Un mol de etanol forma un mol de  $\text{DPNH}_2$ .

**CROMATOGRAFIA DE GASES (1, 19):**

Este método es bastane útil por su capacidad de separación, rapidez, especificidad, exactitud y sensibilidad además, se puede utilizar para dos fines diferentes:

1. Análisis Cualitativo-. Persigue la separación de los distintos alcoholes, basándose en los tiempos de elución de los mismos y que casi son invariables. Se establece mediante un estándar presente en la muestra analizada.
2. Análisis Cuantitativo-. Se utiliza el método del estándar interno con alcohol n-propílico con mucha frecuencia, aunque también es factible cuantificar con un estándar externo o por normalización.

#### 4.JUSTIFICACION

La importancia del presente estudio, radica en la necesidad que tiene el Laboratorio Químico Sección de Toxicología del Ministerio Público de contar con un método alternativo al de cromatografía de gases con detector de llama (FID), que proporcione datos reproducibles y confiables. El mismo sería utilizado como sustituto en caso de no contar con el método oficial por problemas técnicos, falta de insumos u otros.

Así mismo para permitir verificaciones o descartes en caso de alta demanda o en caso de querer montar laboratorios regionales en donde no se pueda hacer la inversión para obtener un cromatógrafo de gases computarizado.

## 5.OBJETIVOS

### GENERAL

Validar un método espectrofotométrico como procedimiento alternativo y de bajo costo para cuantificar alcohol en sangre.

### ESPECIFICOS

- Comparar la reproducibilidad de los valores al utilizar espectrofotometría y cromatografía de gases
- Determinar la especificidad que tiene el método espectrofotométrico
- Determinar el límite de cuantificación que tiene el método espectrofotométrico.
- Determinar la linealidad del método espectrofotométrico.
- Determinar la exactitud que tiene el método espectrofotométrico.
- Determinar el grado de precisión que tiene el método espectrofotométrico.

Todos los anteriores para cuantificar alcohol en sangre.



## 6.HIPOTESIS

La determinación cuantitativa del alcohol etílico en sangre por el método espectrofotométrico proporciona datos reproducibles y confiables por lo que el mismo puede implementarse como metodología alterna para la cuantificación de los niveles de alcohol en sangre -alcoholemia-.

## 7.MATERIALES Y METODOS

### 7.1 UNIVERSO

Método espectrofotométrico.

### 7.2 MATERIALES Y EQUIPO

- Cromatógrafo Hewlett Packard 4890
- Columna Carbowax 20 M
- Espectrofotómetro UV/Visible HP 8453
- 50 muestras de sangre, de sujetos muertos, seleccionadas al azar
- Tubos para lectura espectrofotométrica en región visible
- Balanza analítica
- Fuente de calor
- Erlenmeyer especialmente disellados con tapón esmerilado y dispositivo interno (ver anexo II)
- Balones aforados
- Pizetas
- Probetas

### 7.3 REACTIVOS

- Patrones de etanol entre 0.50 y 4.0 g/L
- Mezcla sulfocrómica: Pesar en la balanza analítica 0.1g de dicromato de potasio y disolverlo en 50 mL agua destilada. Agregar cuidadosamente 0.01 g de nitrato de plata y con enfriamiento y poco a poco 50mL de ácido sulfúrico concentrado grado analítico. Completar con agua destilada hasta 1000 mL

- Agua destilada
- Stock de acetona, etanol, isopropanol y metanol
- Standar interno de n-propanol
- Solución stock mixta de 0.5, 1.0 y 2.0 g/L

#### 7.4 METODO CROMATOGRAFICO

##### CONDICIONES DEL CROMATOGRAFO:

- Temperatura inicial del horno 68 °C
- Rampa 0
- Temperatura final del horno 68 °C
- Inyector A 100 °C
- Detector A 200 °C
- Inyector B 158 °C
- Detector B 175 °C
- Tiempo de corrida 7 minutos

##### CONDICIONES DEL CENTRO DE CONTROL (HEADSPACE)

- |  |          |
|--|----------|
| • Temperatura del vial                 | 65 °C    |
| • Temperatura de inyección             | 70 °C    |
| • Temperatura de la columna            | 85 °C    |
| • Ciclo de tiempo del GC               | 15.0 min |
| • Tiempo de inyección                  | 1.0 min  |
| • Tiempo de equilibrio de la inyección | 0.15 min |
| • Tiempo de inyección                  | 0.15 min |

- Tiempo de presurización 0.13 min
- Tiempo de equilibrio del vial 8.0 min

#### PREPARACION DE SOLUCIONES STOCK (Mantener en refrigeración)

- Stock de acetona: agregar 1.264 mL de acetona
- Stock de etanol: agregar 1.266 mL de etanol
- Stock de isopropanol: agregar 1.273 mL de isopropanol
- Stock de metanol: agregar 1.264 mL de metanol

Todos los stock se preparan en balones aforados de 10 mL, completando el volumen con agua destilada.

#### STANDAR INTERNO DE N-PROPANOL

- Pesar 66.0 g de sulfato de amonio
- Pesar 8.7 g de ditionito de sodio
- Medir 125 uL de n-propanol
- Aforar en un balón de 500 mL, etiquetar y proteger de la luz

#### PREPARACION DE LAS SOLUCIONES STOCK MIXTAS

##### SOLUCION STOCK MIXTA DE 0.5 g/L

En un balón aforado de 10 mL colocar 2 mL de agua desmineralizada luego agregar

- 50 uL del stock de etanol
- 50 uL del stock de metanol
- 50 uL del stock de isopropanol
- 50 uL del stock de acetona
- Aforar

### SOLUCION STOCK MIXTA DE 1.0 g/L

En un balón aforado de 10 mL colocar 2 mL de agua desmineralizada luego agregar

- 100 uL del stock de etanol
- 100 uL del stock de metanol
- 100 uL del stock de isopropanol
- 100 uL del stock de acetona
- Aforar

### SOLUCION STOCK MIXTA DE 2.0 g/L

En un balón aforado de 10 mL colocar 2 mL de agua desmineralizada luego agregar

- 200 uL del stock de etanol
- 200 uL del stock de metanol
- 200 uL del stock de isopropanol
- 200 uL del stock de acetona
- Aforar

PREPARACION DEL MATERIAL A INYECTAR EN EL CROMATOGRAFO:

### CONTROL NEGATIVO O BLANCO

Colocar 1 mL de estándar interno y 100 uL de agua destilada

### CONTROL DE 0.5 g/L

Agregar 1 mL de estándar interno y 100 uL de la solución stock mixta de 0.5 g/L

### CONTROL DE 1.0 g/L

Agregar 1 mL de estándar interno y 100 uL de la solución stock mixta de 1.0 g/L

### CONTROL DE 2.0 g/L

Agregar 1 mL de estándar interno y 100 uL de la solución stock mixta de 2.0 g/L

### MUESTRAS

En viales rotulados colocar 100 uL de sangre, evitando transferir coágulos, adicionar 1 mL de estándar interno, sellar el vial con su arandela.

\* Anotar secuencia de inyecciones

### 7.5 METODO ESPECTROFOTOMETRICO

- Colocar 3 mL de mezcla sulfocrómica en el fondo del erlenmeyer
- Colocar 0.5 mL de sangre en la cucharilla, tapar bien
- Colocar a 80 °C en una estufa durante 2 horas. Luego dejar enfriar
- La mezcla sulfocrómica se enrasa a 6 mL con agua destilada
- Medir la absorbancia a 590 nm contra un blanco, el cual consiste en la mezcla sulfocrómica tratada de la misma forma, sin muestra.

Con anterioridad a esto debe hacerse una calibración con patrones acuosos de etanol de concentración entre 0.50 y 4.0 g/L. Esta recta de calibración se ajusta a mínimos cuadrados y se calcula la cotangente a la recta de calibración.

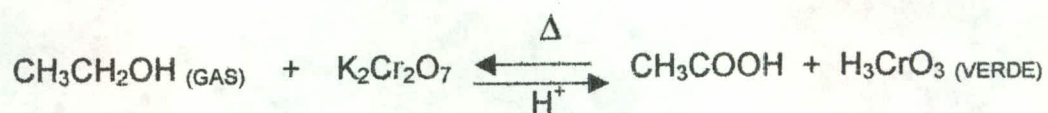
### CÁLCULOS

Para obtener la concentración de alcohol en la sangre, se multiplica la absorbancia resultante de la muestra por el valor de la cotangente calculada anteriormente.

Las muestras deben trabajarse por triplicado para luego calcularse la media.

## FUNDAMENTO DEL METODO

Los vapores del etanol que son emanados de la muestra, al ponerse en contacto con la mezcla sulfocrómica provocan la reducción del cromo +6 de color amarillo a cromo +3 de color verde. La intensidad del color será proporcional a la cantidad de etanol presente ya que a la vez que el cromo se reduce el etanol se oxida, produciéndose la siguiente reacción (10).



## 7.6 METODO DE INVESTIGACION

Según lo investigado, se determinó que el presente estudio corresponde a una validación de categoría II, es decir los métodos analíticos que determinan impurezas en las materias primas o productos de degradación en los productos farmacéuticos terminados, incluyendo valoraciones cuantitativas y pruebas de límite (22). Por lo tanto se procederá a evaluar el método de la siguiente forma:

Se utilizarán 50 muestras por triplicado midiéndoles:

**EXACTITUD:** Proximidad entre los resultados obtenidos por este método y el valor real; se expresa como un porcentaje de recuperación por medio de la valoración de cantidades conocidas agregadas de analito.

Determinación: Se cuantificará la muestra por cromatografía de gases y luego por espectrofotometría.

**PRECISION:** Concordancia de los resultados al utilizar muestras múltiples de una muestra homogénea; se expresa como la desviación estándar o la desviación estándar relativa.

Determinación: Se trabajará por triplicado cada muestra

**ESPECIFICIDAD:** Capacidad del método de medir el analito en cuestión en presencia de otros componentes en la muestra; se expresa como la desviación de los resultados obtenidos.

Determinación: Se cuantificará por cromatografía de gases FID y luego por espectrofotometría.

**LINEALIDAD:** Es la capacidad de producir resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito dentro de un intervalo dado. Se expresa en función de la varianza alrededor de la pendiente de la recta.

Determinación: Cálculo de una recta de regresión.

**RANGO:** Es el intervalo entre el nivel inferior y superior (incluyendo éstos) que son determinados con precisión, exactitud y linealidad, se expresa en porcentaje.

Determinación: Cuantificación del alcohol en muestras que tengan el analito en concentración dentro del rango y en los extremos del rango.



## 8. RESULTADOS

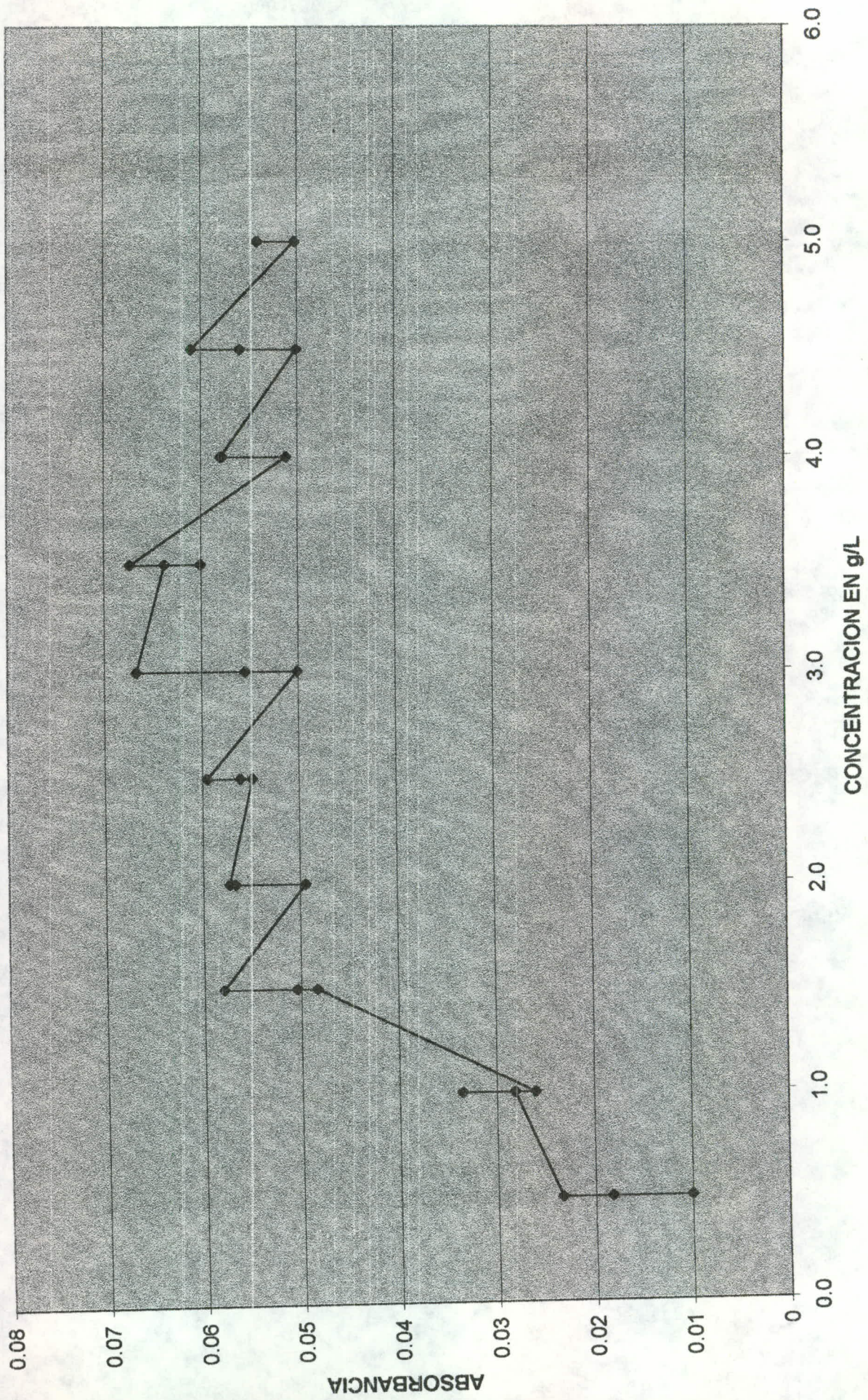
CUADRO No 1.  
8.1 ANALISIS DE REGRESION  
(Utilizando frasco con tapón de baquelita)

No.	[g/L]	ABSORBANCIA	DTOS. CORREGIDOS	RESIDUOS
1	0.5	0.0183	0.0346	-0.4999
2	0.5	0.0100	0.0346	-1.0595
3	0.5	0.0234	0.0346	-0.2516
4	1.0	0.0281	0.0379	-0.1631
5	1.0	0.0335	0.0379	0.0122
6	1.0	0.0261	0.0379	-0.2398
7	1.5	0.0484	0.0412	0.2830
8	1.5	0.0504	0.0412	0.3245
9	1.5	0.0580	0.0412	0.4644
10	2.0	0.0495	0.0446	0.2090
11	2.0	0.0567	0.0446	0.3456
12	2.0	0.0573	0.0446	0.3566
13	2.5	0.0549	0.0479	0.2167
14	2.5	0.0561	0.0479	0.2340
15	2.5	0.0595	0.0479	0.2984
16	3.0	0.0502	0.0512	0.3105
17	3.0	0.0556	0.0512	0.1333
18	3.0	0.0668	0.0512	0.3173
19	3.5	0.0638	0.0546	0.1762
20	3.5	0.0601	0.0546	0.1156
21	3.5	0.0674	0.0546	0.2304
22	4.0	0.0512	0.0579	-0.1400
23	4.0	0.0578	0.0579	-0.0182
24	4.0	0.0580	0.0579	-0.0154
25	4.5	0.0501	0.0613	-0.2556
26	4.5	0.0560	0.0613	-0.1470
27	4.5	0.0611	0.0613	-0.0603
28	5.0	0.0503	0.0646	-0.3501
29	5.0	0.0542	0.0646	-0.2750
30	5.0	0.0541	0.0646	-0.2763

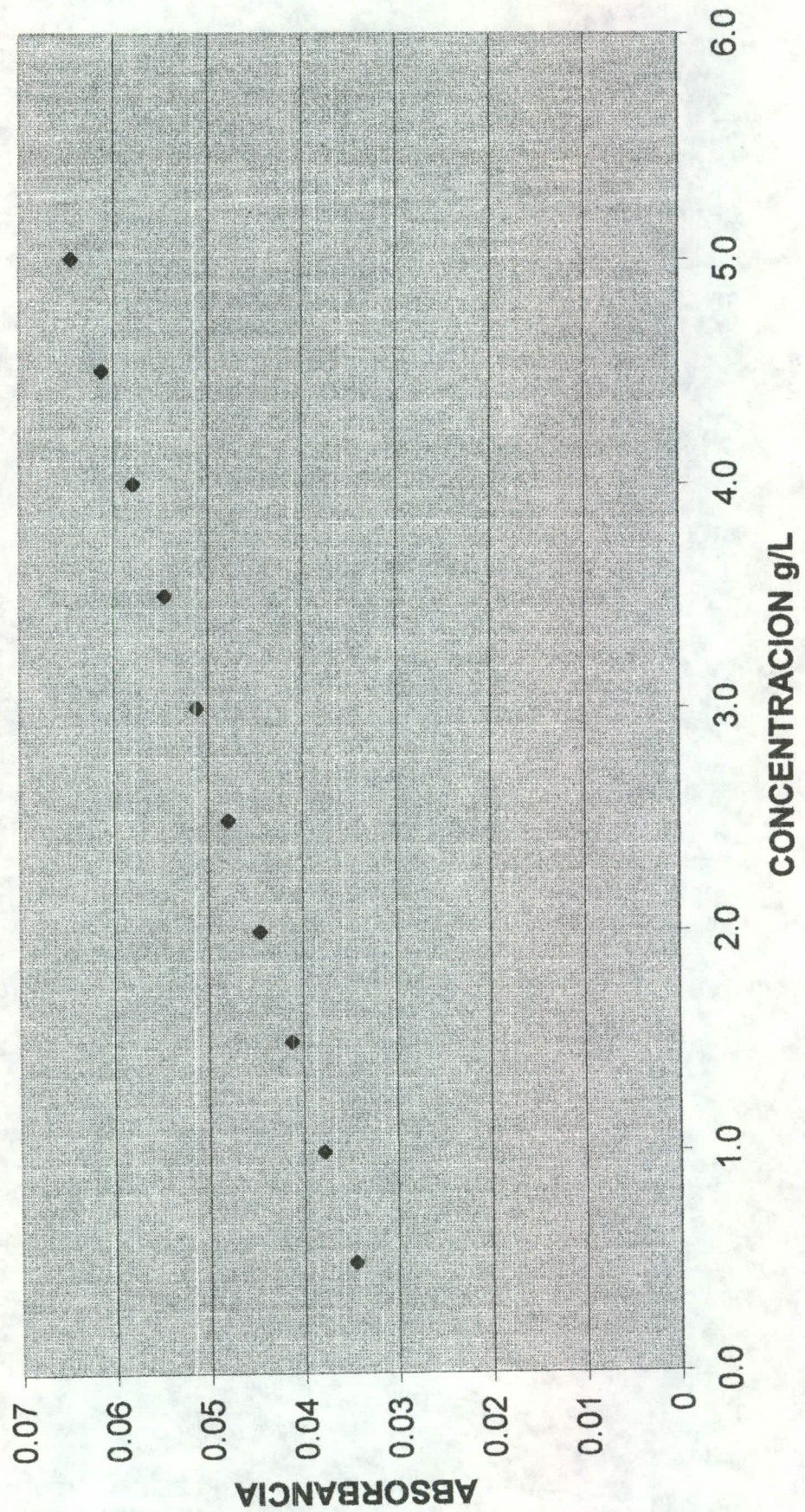
$$Y = 0.03123 + 0.00667 X$$

COEF. DE DETERMINACION: 0.4485

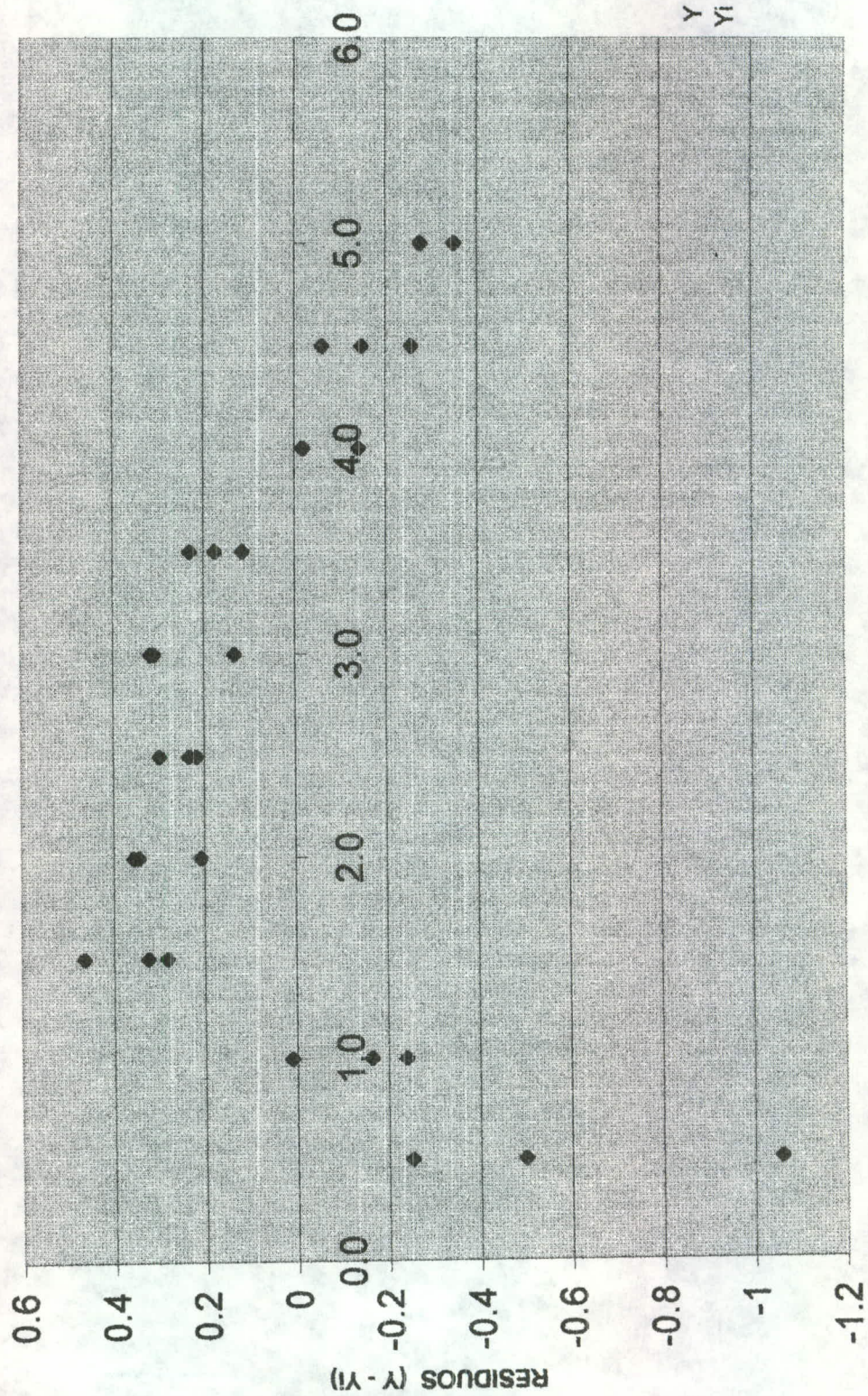
**GRAFICA No. 1**  
**LINEALIDAD**  
**(Utilizando frasco con tapón de baquelita)**



**GRAFICA No. 2**  
**LINEA RECTA CORREGIDA**  
**(Utilizando frasco con tapón de baquelita)**



**GRAFICA No. 3**  
**ANALISIS DE RESIDUALES**  
 (Utilizando frasco con tapón de baquelita)



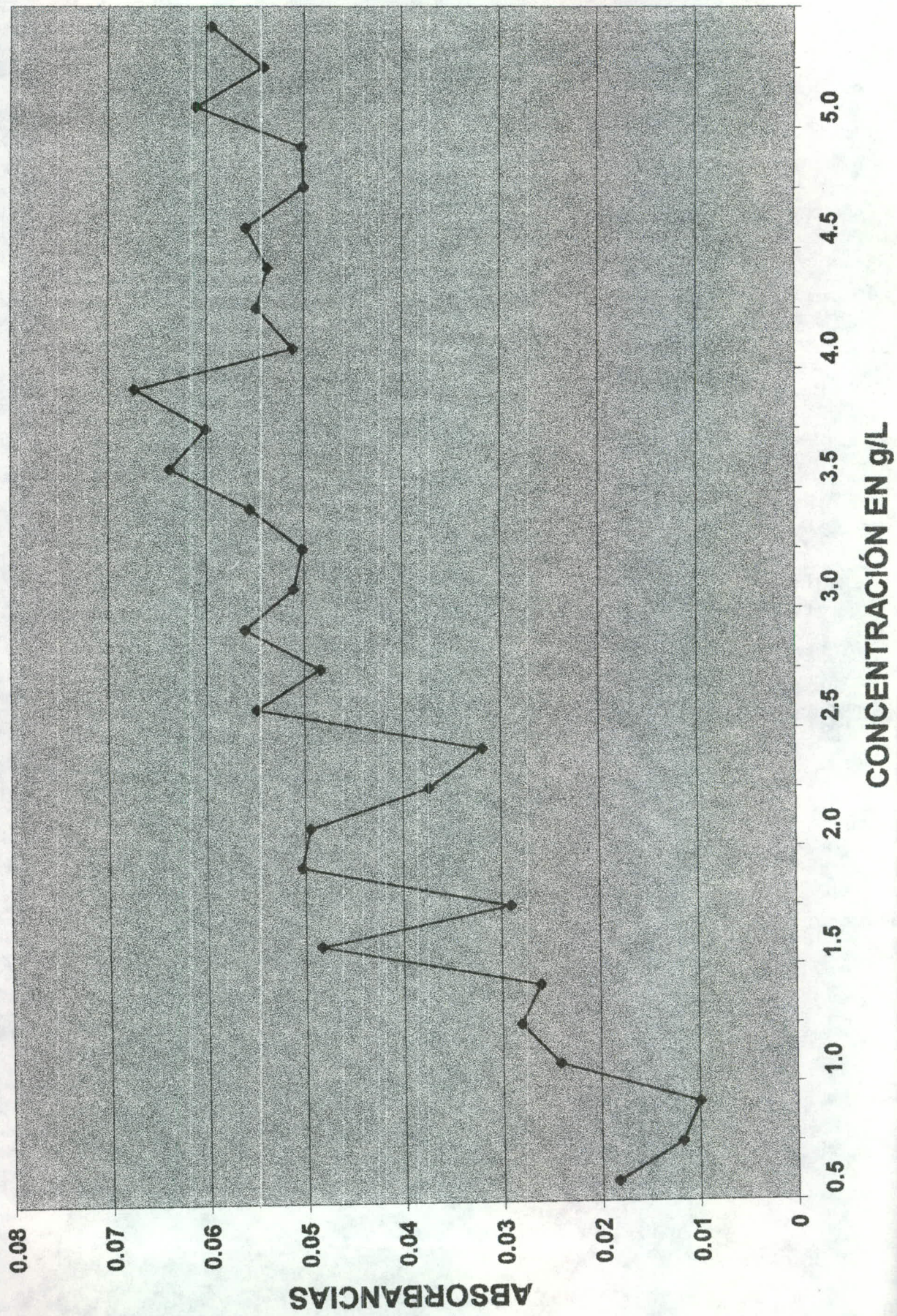
**CUADRO No. 2**  
**8.2 ANALISIS DE REGRESION**  
 (Utilizando frasco con tapón esmerilado)

No.	[g/L]	ABSORBANCIA	DTOS. CORREGIDOS	RESIDUOS
1	0.5	0.0183	0.0261	-0.0077697
2	0.5	0.0118	0.0261	-0.0142697
3	0.5	0.0100	0.0261	-0.0160697
4	1.0	0.0242	0.0304	-0.00617939
5	1.0	0.0281	0.0304	-0.00227939
6	1.0	0.0261	0.0304	-0.00427939
7	1.5	0.0484	0.0347	0.01371091
8	1.5	0.0291	0.0347	-0.00558909
9	1.5	0.0504	0.0347	0.01571091
10	2.0	0.0495	0.0390	0.01050121
11	2.0	0.0374	0.0390	-0.00159879
12	2.0	0.0319	0.0390	-0.00709879
13	2.5	0.0549	0.0433	0.01159152
14	2.5	0.0484	0.0433	0.00509152
15	2.5	0.0561	0.0433	0.01279152
16	3.0	0.0511	0.0476	0.00348182
17	3.0	0.0502	0.0476	0.00258182
18	3.0	0.0556	0.0476	0.00798182
19	3.5	0.0638	0.0519	0.01187212
20	3.5	0.0601	0.0519	0.00817212
21	3.5	0.0674	0.0519	0.01547212
22	4.0	0.0512	0.0562	-0.00503758
23	4.0	0.0549	0.0562	-0.00133758
24	4.0	0.0538	0.0562	-0.00242758
25	4.5	0.0560	0.0605	-0.00454727
26	4.5	0.0501	0.0605	-0.01044727
27	4.5	0.0503	0.0605	-0.01024727
28	5.0	0.0611	0.0647	-0.00375697
29	5.0	0.0542	0.0647	-0.01065697
30	5.0	0.0595	0.0647	-0.00535697

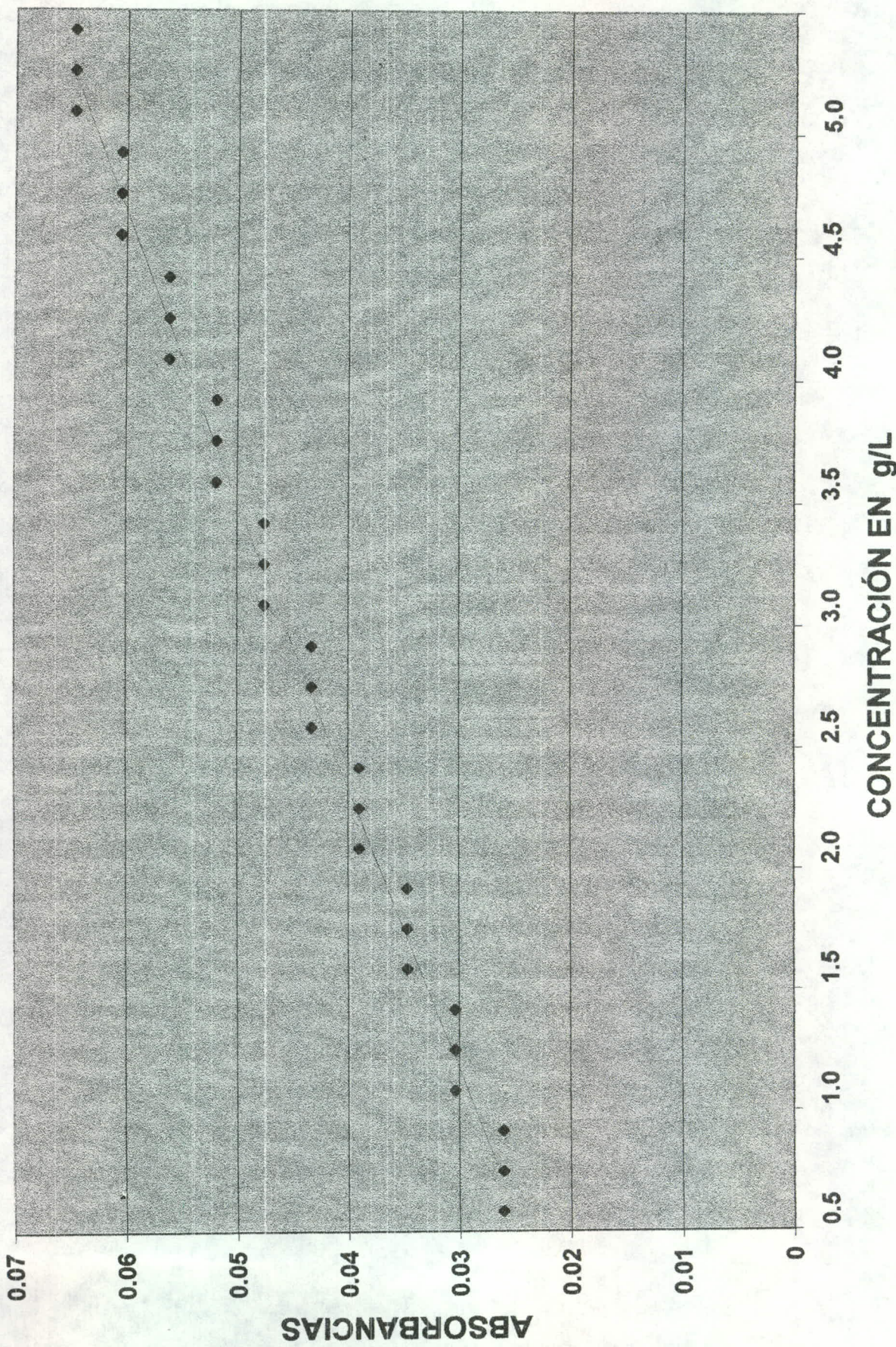
$$Y = 0.02176 + 0.00862X$$

**COEF. DE DETERMINACION: 0.6486**

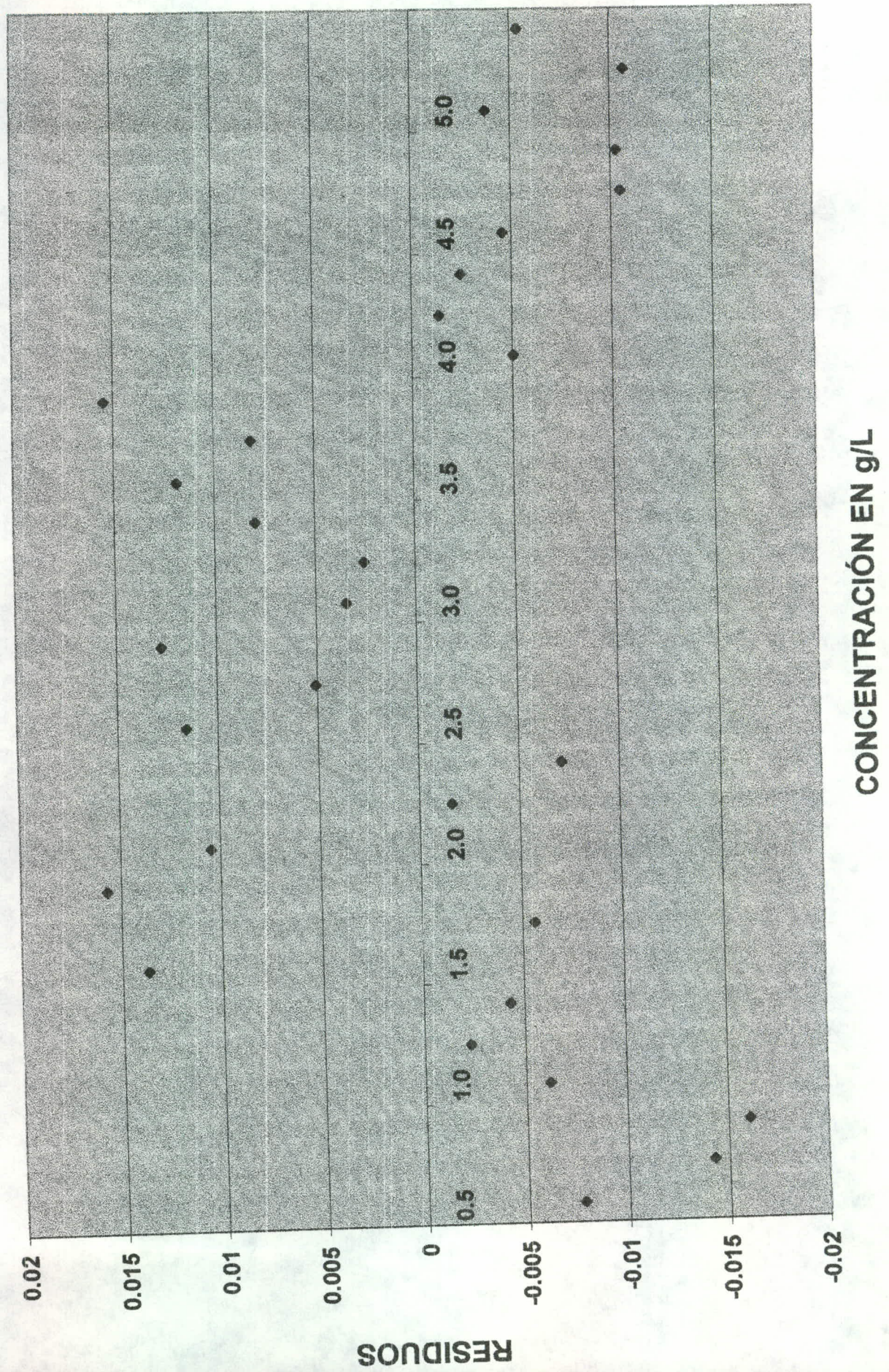
**GRAFICA No. 4**  
**LINEALIDAD**  
(Utilizando frascos con tapón esmerilado)



**GRAFICA No. 5**  
**LINEA RECTA CORREGIDA**  
**(Utilizando frascos con tapón esmerilado)**



**GRAFICA No. 6**  
**ANALISIS DE RESIDUALES**  
 (Utilizando frasco con tapón esmerilado)





## 9. DISCUSION DE RESULTADOS

Según lo mencionado anteriormente, la cuantificación de etanol en sangre mediante el método espectrofotométrico, se basa en la reacción de óxido-reducción entre la mezcla sulfocrómica y el alcohol liberado de la muestra, produciéndose así una coloración azul-verdosa, que variará en forma directamente proporcional a la concentración alcohólica de la muestra sometida al análisis (10).

Para tener una referencia sobre la cual comparar los datos, primero se elaboró una curva de calibración. Para obtenerla se prepararon muestras con concentraciones de alcohol conocidas y se sometieron al procedimiento analítico ya establecido.

Sin embargo, al obtener las lecturas de absorbancia resultantes de las muestras trabajadas en frascos con tapón de baquelita, y aplicarles el análisis estadístico respectivo para determinar la linealidad (primera característica indispensable para validar un método), se obtuvo un coeficiente de determinación de  $r^2 = 0.4485$  (ver cuadro No. 1 y gráfica No. 1). Esto indica que el 44.85 % de la variación de la absorbancia (valores en Y) están explicadas en función de la concentración de etanol en la muestra (valores en X), lo cual es una relación bastante baja como para poder aceptar los resultados; por lo tanto se dice que el método carece de la linealidad necesaria (mínimo se requiere de un  $r^2 = 0.75$ ) para poder utilizarlo.

Esto también se pudo demostrar al hacer el análisis de residuales ya que éste indica la diferencia entre el valor teórico y el experimental. De ser éste correcto tendría que mostrar el mismo número de datos por arriba y por abajo de la línea cero.

Pero en este caso como se puede observar (ver gráfica No. 3), la mayoría de datos están por arriba de la línea cero, lo cual indica que el método

generalmente estaría reportando concentraciones de etanol más altas de las que realmente contienen las muestras, con lo que se podrían reportar falsos positivos.

Para descartar errores por la utilización de frascos con tapón de baquelita, se procedió a realizar las mismas pruebas utilizando frascos con tapón esmerilado. Esto llevó a la obtención de los resultados presentes en el cuadro No. 2 (ver también gráfica No. 4), los cuales indican un  $r^2 = 0.6486$  es decir que el 64.86% de la variación de la absorbancia (valores en Y) están explicadas en función de la concentración de etanol en la muestra (valores en X). Este valor de coeficiente de determinación, a pesar de ser mayor que el anterior aún sigue siendo bajo por lo que se sigue descartando el método para su aplicación como metodología alterna al de cromatografía de gases en la determinación de alcoholemias; sobre todo por tratarse del campo legal.

Es importante hacer notar que el método motivo del trabajo, deja de mostrar la poca linealidad que ha mantenido inmediatamente al rebasar concentraciones de 3.5g/L; situación que limita aún más las probabilidades de validación del mismo.

Como consecuencia de no haber obtenido la linealidad esperada, no fue posible aplicar la ecuación de la línea recta para calcular las concentraciones de etanol de las muestras analizadas. Por lo tanto no es congruente analizar los parámetros de exactitud, precisión y especificidad así como tampoco hacer una comparación con los datos reportados por el método de cromatografía de gases.

Con respecto a las muestras analizadas y cuyos resultados se encuentran en el anexo No. 3, éstas mostraron datos con variables marcadas; lo cual puede atribuirse a factores tales como: 1) Producción endógena de sustancias volátiles capaces de producir la misma reacción de óxido-reducción entre la mezcla sulfocrómica y etanol;

estas sustancias podrían ser consecuencia de haber analizado muestras de sangre procedentes de cadáveres en descomposición o cadáveres cuya autopsia fue realizada en un período mayor de 24 horas. 2) Presencia de otras sustancias volátiles como acetona, xileno, tolueno y benceno (sustancias que conforme al análisis de CG sí están presentes en algunas de las muestras); las cuales pudieron haber sido ingeridas o inhaladas, ya sea por uso inadecuado de las mismas o bien porque el individuo se haya desenvuelto en medios donde las mismas son frecuentes.

Finalmente, para analizar la viabilidad de utilización del método propuesto se tomaron en cuenta los siguientes parámetros estadísticos: 01) Determinación de linealidad, 02) Análisis de residuales y 03) Ecuación de la línea recta, los cuales mostraron que el mismo no puede ser utilizado como método alternativo para la medición de alcohol en sangre.

## 10. CONCLUSIONES

- 10.1 El método no posee la linealidad necesaria para ser utilizado como método alternativo al de Cromatografía de Gases con detector de llama FID para la determinación de alcohol en sangre; por lo tanto, tampoco es preciso, exacto y reproducible.
- 10.2 El método espectrofotométrico no puede implementarse en laboratorios regionales donde se pretenda contar con pruebas preliminares y de menor costo, por su falta de precisión, exactitud, linealidad y especificidad.
- 10.3 El método no permite diferenciar si la reacción de óxido-reducción es producida por la presencia de sustancias endógenas generadas por descomposición del cadáver; situación que disminuye aún más la probabilidad de utilizarlo.
- 10.4 Mediante el empleo del método no hay separación de las analitas; tampoco diferenciación de la reacción generada por una u otra sustancia, lo cual hace que el mismo no pueda ser empleado en caso de ingesta, exposición o inhalación voluntaria de otras sustancias volátiles.

## 11. RECOMENDACIONES

- 11.1 Seguir utilizando el método de cromatografía de gases con detector de llama FID como método de elección para determinar las alcoholemias, lo cual da certeza y confiabilidad de los resultados.
- 11.2 Investigar sobre otro posible método que pueda validarse como método alternativo de cromatografía de gases con detector de llama FID para determinar alcoholemias.
- 10.3 De ser posible, proveer al laboratorio de un cromatógrafo adicional que minimice tiempos de respuesta en casos de sobredemanda, fallas de carácter técnico o falta de insumos.
- 10.4 Sistematizar el uso del instrumental mediante el empleo de inyectoras automáticas de mayor capacidad, aspecto que permitiría utilizar el equipo en horas inhábiles de trabajo (noches, fines de semana, asuetos, etc.).

## 12.REFERENCIAS

1. Gisbert Calabuig. **MEDICINA LEGAL Y TOXICOLOGIA** 4ta. Edición. Masson Salvat Medicina. Barcelona, España 1991 pp.650-667
2. Anstie, F.E. **STIMULANTS AND NARCOTICS.** Lindsay and Blakiston, Philadelphia, Pennsylvania, 1865 p.360
3. Britt. Med. Assoc., Spec. Comm **RELATION OF ALCOHOL TO ROAD ACCIDENTS.** Britt Med Assoc., London, 1958
4. Cavett, J.W.J. **LAB. CLIN. MED.** 23, 543 (1938).
5. Banay. R.S. **QUART. J. STUDIES ALC.** 2,686 (1942)
6. Davis, V.E., Waish, M.J.- **ALCOHOL, AMINES, AND ALKALOIDS: A POSSIBLE BIOCHEMICAL 'BASIS FOR ALCOHOL ADDICTON.** Science, 1970 pp.167, 1005-1007
7. Lery, N.; Rouzioux, J.M., y Vedrinne, J.: **ALCOHOL ETHILIQUE ENCYCLOPEDIE MEDICO-CHIRURGICALE. INTOXICATIONS.** Flammarion, Paris, 1976 pp.9
8. Stewart & Stolman **TOXYCOLOGY MECHANISMS AND ANALYTICAL METHODS.** Volume II Academic Press, New York, USA 1961 pp. 116-147
9. Borkenstein, R.F. **BREATH TESTS TO DETERMINE ALCOHOLIC INFLUENCE.** Indiana State Police, Indianapolis, Indiana, 1955
10. Morrison & Boyd **QUIMICA ORGANICA** Quinta Edición Adisson Wesley, Estados Unidos 1990 pp 623
11. Garriot, J.C.: **MEDICO LEGAL ASPECTS OF ALOCHOL DETERMINATION IN BYOLOGICAL SPECIMENS.** PSG, Littleton, 1987
12. Florez, Jesus, Armijo, Juan; et al. **FARMACOLOGIA HUMANA.** 2da. Edición Editorial Masson, S.A, España 1992. pp 419-423, 496-497
13. **REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES XIV.** Washington, United States, 1970 pp. 697-699, 1357-1358
14. Cooper, J.D. **DETERMINATION OF BLOOD ETHANOL BY GAS CHROMATOGRAPHY.** Clim.Chim- Acta33-485-5 pp.82-92
15. **THE INDEX MERK.** 12th. Edition, United States, 1990

16. Goodman & Gilman LAS BASES FARMACOLOGICAS DE LA TERAPEUTICA. 9a. edición, Editorial McGraw-Hill, México 1996
17. Rubio, Edna. COMPARACION DE METODOS PARA DOSIFICAR ALCOHOL EN SANGRE. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Universidad de San Carlos de Guatemala 1981.
18. Morales, Lys. EVALUACION DE DOS METODOS DIRECTOS DE CROMATOGRAFIA GAS-LIQUIDO PARA LA DETERMINACION DE ALCOHOL EN SANGRE. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia Universidad de San Carlos de Guatemala 1994.
19. Sunshine, I. METHODOLOGY FOR ANALITICAL TOXICOLOGY, CRC Press, Inc. USA, 1980 pp 298-299
20. Litter, Manuel. FARMACOLOGIA 7a. Edición. El Ateneo, Buenos Aires, 1987.
21. Calabrese, A.J. y E. A. Astolfi- TOXICOLOGIA. Editorial Capeluz , Buenos Aires, Argentina, 1969. pp 82-92
22. USP XXIII-NF18. USPC, Inc, 1996. pp 1982
23. CODIGO DE SALUD, Decreto 90-97 Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. Segunda Edición , Guatemala, 1999

**13. ANEXOS**



## ANEXO I

### GENERALIDADES DEL ETANOL

#### ORIGEN

El etanol es considerado como la droga más antigua y de uso más generalizado en el mundo. Actualmente es increíble la cantidad que se consume como bebida alcohólica por lo que su importancia farmacológica no radica en su valor terapéutico sino en su perfil toxicológico, el cuál se basa en su capacidad de producir adicción, de su aceptación como bebida habitual y de la multiplicidad de sus acciones biológicas (11, 12, 13).

El alcohol etílico se obtiene por la fermentación del disacárido dextrosa con la presencia de zimasa, enzima presente en las células de levadura e industrialmente se produce a partir de la melaza.

Los líquidos naturales que poseen alcohol etílico se llaman bebidas alcohólicas y se pueden dividir en dos clases- 1 Bebidas no destiladas, obtenidas por fermentación, entre ellas cerveza, vino tinto no fortificado y fortificado. 2. Bebidas destiladas o licores que se obtienen por destilación de la masa fermentada de materiales-vegetales, entre éstas el coñac, whisky, ginebra, ron.

Las bebidas no destiladas contienen del 5 al 20 % de alcohol y las destiladas contienen un promedio del 50 % de alcohol.

En las bebidas alcohólicas se encuentra una mezcla de alcoholes superiores al alcohol etílico, especialmente el alcohol butílico y amílico, aunque en muy escasa cantidad por lo que no influyen en el efecto de las mismas.

### PROPIEDADES FISICAS

Este es un líquido transparente, incoloro, volátil con un olor suave pero característico y con sabor ardiente. Su punto de ebullición es a 78 °C pero se volatiliza incluso a temperaturas más bajas y es inflamable. Cuando está puro es neutro a cualquier indicador. Su densidad específica a 15.56 °C no es más de 0.816 lo que indica que no contiene menos del 92.3% de C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH en peso o 94.9% en volumen.

Respecto a su solubilidad, es miscible con agua, acetona, cloroformo, eter y muchos otros solventes orgánicos (13,15)

### PROPIEDADES QUIMICAS

El etanol arde con llama azulada pálida, reacciona con el sodio para formar etóxido de sodio (alcoholato) y con los ácidos orgánicos para dar éteres.

FORMULA MOLECULAR	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> O H
PESO MOLECULAR	46.07 (13, 15)

### ACCION FARMACOLOGICA

En general se cree que el etanol es una droga estimulante del sistema Nervioso Central pero en realidad éste es un depresor del mismo. En efecto, la reacción inicial se manifiesta en forma de estimulación pero es debido a la depresión de los mecanismos inhibidores de control en el cerebro; es por eso entonces que la conducta aparece más confiada, expansivo, espontánea, autocontrolada, la expresión verbal pareciera más fluida pero disminuye la habilidad psicomotora fina, se puede perder la memoria, concentración e intuición. Cuando la intoxicación es más grave, se produce un trastorno general de la función nerviosa y sobresale un estado de anestesia

general y si hay concentraciones aún más elevadas, se produce coma, depresión bulbar y muerte (12, 16).

### **MECANISMO DE ACCION**

Durante varios años se pensó que el etanol al igual que los barbitúricos y los agentes anestésicos volátiles, ejercían sus efectos depresores sobre el SNC al actuar inespecíficamente sobre el componente lipídico de las membranas celulares, afectando así la transmisión sináptica. Actualmente, se considera que afecta los canales de iones que son activados por aminoácidos tanto excitadores (glutamato) como inhibidores (GABA<sub>A</sub>).

En el receptor GABA<sub>A</sub>, el etanol favorece el flujo de los iones cloruro estimulado por GABA; sin embargo no todos los receptores GABA<sub>A</sub> son sensibles al etanol. Esta acción gabérgica del etanol, explica su sinergismo con otros depresores centrales como los barbitúricos y las benzodiazepinas, así como la tolerancia y la dependencia cruzada que existe entre ellos. En el receptor de glutamato, actúa como inhibidor probablemente al interferir en la acción de la glicina sobre dicho receptor (12, 16)

### **ABSORCION**

VIA DIGESTIVA.- El etanol es una molécula pequeña y poco polar que atraviesa bien las membranas biológicas. Este se absorbe en un 20 a 30 % en el estómago y el resto en el intestino delgado especialmente en el duodeno. El mecanismo de absorción es por difusión pasiva por lo que todo el alcohol ingerido pasa a la sangre entre 30 y 60 min después de la ingestión.

Los factores que pueden modificar la velocidad de absorción son de dos órdenes: los que modifican el vaciamiento gástrico y los que modifican la velocidad de difusión como la presencia de comida y el ejercicio físico (1, 12, 16).

VIA PULMONAR: El alcohol puede penetrar fácilmente por ésta vía y atravesar la membrana alveolo-capilar por difusión (1.)

### **DISTRIBUCION**

Una vez absorbido, el etanol se distribuye con uniformidad por todos los tejidos y líquidos del cuerpo. Atraviesa con facilidad las barreras hematoencefálicas y placentarias (1, 12,16).

La difusión hística está regulada por dos factores, la concentración de agua y la de alcohol con respecto a la sangre. la distribución se da a distintas velocidades y muchas veces la concentración de alcohol no responde a la que teóricamente le debería de corresponder en función de su riqueza de agua (1).

### **METABOLISMO**

Más del 90% del etanol sufre metabolización hepática, iniciándose por la enzima deshidrogenasa alcohólica, que es una enzima que contiene zinc y que recurre al NAD como receptor de hidrógeno. En esta primera oxidación, pasa a acetaldehído que a su vez es oxidado a ácido acético, que forma acetilCoA y se metaboliza en dióxido de carbono y agua.

El 10% del etanol o más en caso de alcoholemias altas, es oxidado por el sistema de oxidasas mixtas microsomales del retículo endoplásmico liso hepático. Este complejo enzimático es responsable en cierto grado de la tolerancia y de la mayor parte de las interacciones medicamentosas que se observan con el etanol (12, 16).

## **EXCRECION**

**ELIMINACION PULMONAR:** Como mecanismo de eliminacion, tiene poco interés ya que sólo un 2 a 3 % del alcohol ingerido se elimina por esta vía. Pero desde el punto de vista analítico y judicial, es de gran importancia ya que los métodos incruentos se basan en este principio: determinación del alcohol presente en el aire espirado.

**ELIMINACION URINARIA:** El alcohol difunde a través del glomérulo y no sufre proceso de reabsorción tubular. La concentración de alcohol en la orina dependerá de la alcoholemia, aunque ésta cambia continuamente y la concentración en la orina no.

**ELIMINACION POR LA SALIVA:** La cantidad que se excreta por esta vía es ínfima, pero dado el volumen de secreción salival, tiene el mismo interés analítico que la orina. La concentración en saliva es ligeramente superior a la de la sangre.

**ELIMINACION POR LA LECHE:** También se elimina alcohol por ésta vía por lo que se debe de tener en cuenta para las madres en período de lactancia (1).

## **REACCIONES ADVERSAS**

**INTOXICACION AGUDA:** Se caracteriza principalmente por las acciones centrales que ocasiona; con dosis moderadas, se pueden apreciar las acciones ansiolíticas, elevadora del estado de ánimo y socializante.

La disminución de la coordinación motora y de la capacidad de atención y procesamiento de la información sensorial incrementan el riesgo de sufrir accidentes principalmente del tipo automovilístico.

La dosis mortal para el hombre y la concentración sanguínea letal son muy variables, pero esta última puede ser de 450 mg/100 mL aunque, se han descrito casos de muerte con 350 mg/100 mL (17).

Respecto al tratamiento, no existe tratamiento antidótico para la intoxicación aguda por alcohol etílico (13)

Para, los casos de embriaguez común, es suficiente el reposo, pudiéndose administrar dos o tres tazas de café fuerte. En casos de intoxicación manifiesta, se administrarán drogas tranquilizantes que supriman también las náuseas y vómitos existentes. Para los casos de coma, se hará un lavado gástrico si la ingestión fuera reciente, se colocará al paciente en un ambiente templado se le administrarán estimulantes del SNC como la cafeína, se deberá reponer el agua y los electrolitos perdidos así como colocar una máscara de oxígeno o sonda nasal (18),

INTOXICACION CRONICA: El consumo crónico de etanol, produce una amplia gama de efectos dosis-dependientes en el hígado, que van desde la acumulación inicial de depósitos grasos hasta la hepatitis alcohólica y la cirrosis hepática, puede producir también pancreatitis tanto aguda como crónica.

El alto contenido calórico que posee el etanol, provoca que se de una disminución en la ingesta de otros alimentos, lo cual provoca que se tenga una dieta desequilibrada pudiéndose producir así malnutrición, déficit vitamínico y de aminoácidos esenciales.

En el sistema nervioso el déficit de tiamina es la causa de las polineuropatías periféricas, de la encefalopatía de Wernicke y parte de la sintomatología del síndrome de Korsakoff. Se puede observar también en estos pacientes, otras formas de demencia no carenciales así como de cuadros degenerativos cerebelosos (12).

El tratamiento de éstos pacientes es básicamente la psicoterapia, la supresión del alcohol debe ser en forma lenta, se pueden emplear disuasivos alcohólicos como el disulfiram, se debe corregir la deficiencia dietética y en caso de haber excitación se administrarán drogas sedantes o tranquilizantes (20).

## **TOLERANCIA**

Es importante considerar, además, que personas que no están acostumbradas a ingerir bebidas alcohólicas en niveles o volúmenes relativamente grandes, pueden presentar reacciones muy severas. Pero también hay personas que han creado cierta tolerancia, por estar acostumbradas a ingerir grandes cantidades de alcohol; estas personas aún cuando muestren altos niveles alcohólicos en sangre, no presentan ningún signo de embriaguez sino que se presentan en aparente sobriedad.

## **USOS DEL ETANOL**

Se utiliza principalmente en farmacia por sus poderes como solvente así como también como sustrato para la síntesis de éter, cloroformo, yodoformo, y otros compuestos.

Tiene usos para aplicación local como desinfectante, prevención de afecciones febriles así como para prevenir las úlceras de decúbito en los pacientes encamados (etanol al 50 - 70 % por volumen), Se emplea también para disminuir la sudación, por lo que es un ingrediente de las lociones anhidrólicas y astringentes.

Se puede inyectar alcohol deshidratado en la proximidad de nervios o ganglios simpáticos para el alivio del dolor duradero en casos de neuralgia del trigémino, carcinoma inoperable y otros trastornos.

Hoy en día la utilidad terapéutica del etanol administrado por vía general se dirige al tratamiento de la intoxicación por alcohol metílico y etilenglicol (13, 16, 20.),

## **OTROS VOLATILES CONSUMIDOS**

Las personas que están ya dentro de un nivel crónico en el consumo de alcohol, pueden llegar a consumir otro tipo de solventes para saciar su adicción; entre éstos se pueden mencionar al alcohol isopropílico, que es el alcohol que se expende en las farmacias, el metanol, la acetona, entre otros.

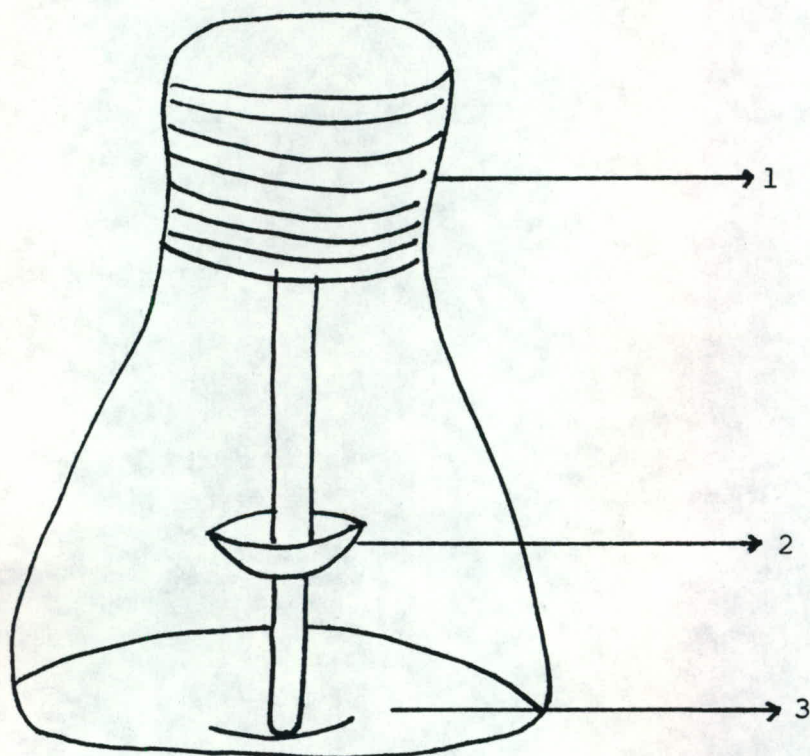
Estos solventes podrían interferir en el análisis, ya que por ejemplo el alcohol isopropílico es un metabolito de la degradación del alcohol a nivel orgánico. El metanol por el contrario, si no se tiene una buena resolución en el método analítico podría interferir ya que su tiempo de elución (en caso de usar cromatografía de gases), es muy cercano al del etanol, al igual que el de la acetona.



## ANEXO II

## Erlenmeyer especial

1. Frasco con tapa
2. Cucharilla (muestra)
3. Fondo (mezcla sulfocrómica)



## ANEXO No. 3

## MUESTRAS

No.	No./MSTRA.	ABSORBANCIA I	ABSORBANCIA II	ABSORBANCIA III
*1	75	1.5811E-01	1.4415E-01	1.5931E-01
*2	1200	6.2864E-02	6.0817E-02	9.7708E-02
*3	1201	1.3465E-02	3.5830E-03	-3.8622E-02
*4	1202	2.3170E-03	4.3039E-03	2.2790E-02
*5	1203	3.7876E-02	3.0981E-02	7.7270E-02
*6	1204	3.0837E-02	3.1608E-02	1.2327E-01
*7	1205	6.1021E-03	9.6731E-02	6.8441E-02
*8	1206	3.2853E-02	4.1279E-02	4.8620E-03
/9	1207	1.0757E-03	1.1929E-01	9.2193E-02
*10	1209	3.4380E-02	3.9453E-02	4.4712E-02
*11	1211	8.8024E-04	8.8739E-03	8.0934E-03
/12	1212	1.1188E-01	1.0955E-01	9.5071E-02
/13	1213	2.8360E-02	4.4859E-02	4.3736E-02
*14	1214	5.0701E-02	4.0230E-02	5.2601E-02
*15	1215	4.0296E-02	3.6502E-02	4.4960E-02
*16	1216	3.5621E-02	4.5890E-03	3.1240E-02
*17	1219	-6.2022E-03	1.1909E-02	3.1909E-02
*18	1224	3.9077E-03	-1.7416E-02	2.6508E-02
*19	1225	-7.6113E-03	1.0919E-02	1.6713E-03
*20	1226	5.0642E-02	5.9092E-02	5.4954E-02
*21	1227	-7.7848E-03	-2.8255E-02	1.0452E-01
*22	1228	-6.2531E-02	-3.5551E-02	-5.9371E-02
*23	1229	2.8616E-02	-8.7051E-03	7.4576E-02
*24	1230	6.9951E-02	4.4288E-02	4.0566E-02
/25	1231	9.3375E-02	6.8732E-02	7.0115E-02
/26	1232	2.0462E-02	8.9580E-02	1.6639E-02
*27	1233	3.5699E-02	3.9248E-02	4.2079E-02
*28	1234	-7.5269E-03	-5.6219E-04	-1.4512E-02
*29	1235	-5.4200E-03	-3.9800E-02	-2.7073E-02
*30	1236	-4.6357E-02	-3.7307E-02	-2.3193E-02

No.	No./MSTRA.	ABSORBANCIA I	ABSORBANCIA II	ABSORBANCIA III
*31	1237	-4.8456E-02	-4.6755E-02	-3.3941E-02
*32	1238	-1.5394E-02	3.2909E-02	-1.2746E-02
*33	1239	-1.9548E-02	-8.1859E-03	-1.5899E-03
*34	1240	5.9636E-02	2.5466E-02	5.1397E-02
*35	1241	-7.3314E-03	5.3930E-04	5.0397E-03
*36	1242	-9.6264E-03	9.5162E-04	4.4407E-02
*37	1243	4.1823E-03	1.0463E-02	1.1763E-02
*38	1244	-2.0533E-02	-1.8004E-02	-1.8327E-02
*39	1245	4.1198E-02	-8.7729E-03	-3.1544E-02
*40	1246	-1.9280E-02	-1.0054E-02	3.7680E-03
*41	1247	3.2228E-02	5.8492E-02	3.0593E-02
*42	1248	4.2238E-03	-9.9888E-03	3.1045E-02
/43	1249	3.3297E-02	2.8717E-02	8.5219E-02
*44	1250	3.6364E-03	-1.9883E-02	-3.0150E-02
*45	1251	-1.6539E-02	8.3170E-03	-7.7481E-03
*46	1252	-3.0641E-02	-2.1348E-03	-1.7138E-02
*47	1253	-2.5644E-02	-1.2255E-02	-3.0788E-02
*48	1254	-9.9039E-03	-1.1033E-02	-8.1194E-03
*49	1255	1.8032E-02	-7.0939E-03	1.6699E-03
*50	1256	-1.7722E-02	2.1417E-02	-4.1499E-03

\* Evidencia o muestra de sangre extraída del cadáver y procesada en tiempos prudenciales.

Mantenida en refrigeración previo a realizar análisis

/ Cadáver en descomposición

Muestras mal conservadas antes de ingresar al Laboratorio

**NOTA:**

La muestra No. 12, reportó por el método de Cromatografía de Gases presencia de alcohol isopropílico posiblemente debido a que según historia el cadáver llevaba ya 12 días de descomposición.

La muestra No. 13, reportó por el método de Cromatografía de Gases presencia de metanol

La muestra No. 20, contenía acetona según método cromatográfico

La muestra No. 25, contenía xileno y tolueno según método cromatográfico.

**ANEXO No. 4  
CALIBRACION  
CROMATOGRAFIA DE GASES**

\* PREP SEQ

Runs Wait for Start\_Input [Y\*/N]:  
Remote\_Start\_Relay: Prerun/Run [P/R\*]:

EQUILIBRATION TIME IN SECONDS [0 ]:

METHOD [\*]:

SAMPLE INFORMATION TABLE

Delete existing sample table [Y/N\*]: Y

RUN OR BOTTLE SAMPLE INDEXED [R/B\*]:

FIRST BOTTLE [1 ]:

LAST BOTTLE [1 ]:

BOTTLE # : 1

ISTD AMT: 2

SAMPLE AMT: 0

MUL FACTOR: 1

RECALIBRATION [Y/N\*]:

NAME: 1:0

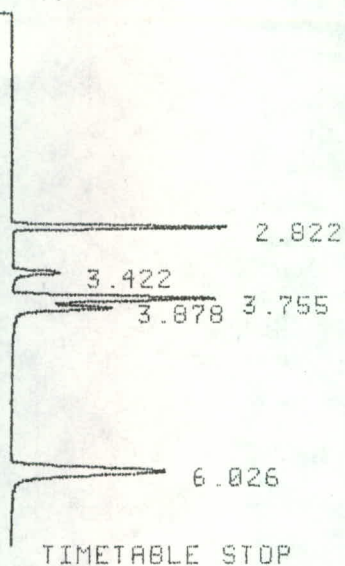
REPORT MEMO: WORKING 1.0 G/L

BOTTLE # : \*

NEXT SEQUENCE [\*]:

\*

\* RUN # 5069      NOV 22, 1999 09:56:49  
START



Closing signal file M:SIGNAL .BNC

RUN# 5069      NOV 22, 1999 09:56:49

SAMPLE NAME: 1.0      SAMPLE# 1  
WORKING 1.0 G/L

SIGNAL FILE: M:SIGNAL.BNC

Y

ISTD-AREA

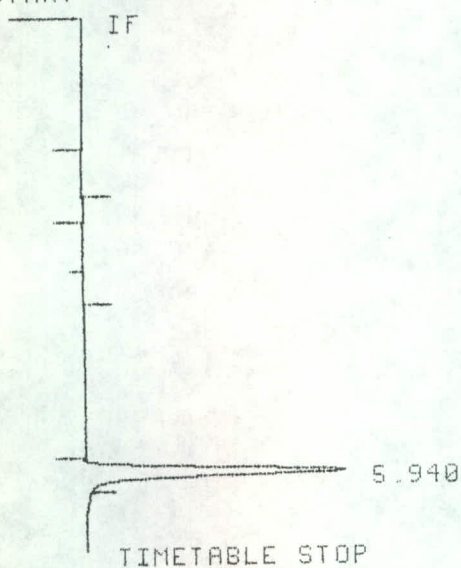
RT	TYPE	AREA	WIDTH	CAL#	G/L	NAME
2.822	PB	640997	.053	1R	1.035	ACETONA
3.422	PB	179857	.067	2	1.044	METANOL
3.755	BU	835196	.075	3	1.028	ISOPROPANOL
3.878	UB	470480	.085	4	1.047	ETANOL
6.026	PB	1072223	.124	5S		N-PROPANOL/STAND

TOTAL AREA=3198754  
MUL FACTOR=1.0000E+00  
ISTD AMT=2.0000E+00

# ANEXO No. 5 CROMATOGRAMAS

\* RUN # 3410      AUG 7, 1999 14:51:29

START



Closing signal file M:SIGNAL .BNC

RUN# 3410      AUG 7, 1999 14:51:29

SAMPLE NAME: 1244      SAMPLE# 11

SIGNAL FILE: M:SIGNAL.BNC

/ ALCOHOLEMIA

ISTD-AREA

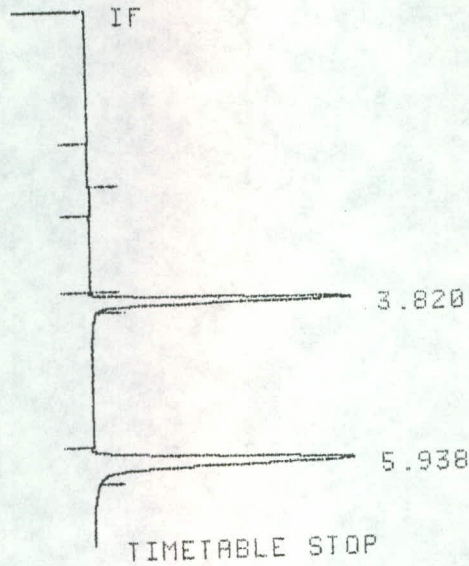
RT	TYPE	AREA	WIDTH	CAL#	G/L	NAME
5.940	PB	1864256	.132	58		N-PROPANOL

NAME  
N-PROPANOL

TOTAL AREA=1864256  
MUL FACTOR=1.0000E+00  
ISTD AMT=2.0000E+00



\* RUN # 3376      AUG 6, 1999 13:04:10  
START



Closing signal file M:SIGNAL .BNC

RUN# 3376

13:04:10

SAMPLE NAME: 1209

SAMPLE# 4

SIGNAL FILE: M:SIGNAL.BNC

ALCOHOLEMIA

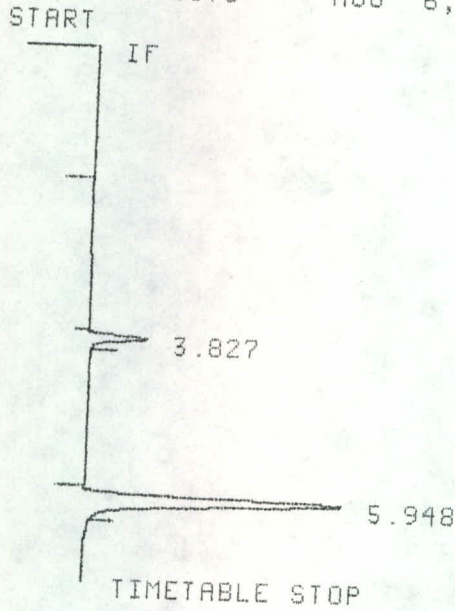
ISTD-AREA

RT	TYPE	AREA	WIDTH	CAL#	G/L	NAME
3.820	PB	1234191	.087	4	1.795	ETANOL
5.938	PB	1869925	.131	5a		N-PROPANOL

TOTAL AREA=3104117  
MUL FACTOR=1.0000E+00  
ISTD AMT=2.0000E+00



\* RUN # 3370 AUG 6, 1999 11:26:25



Closing signal file M:SIGNAL .BNC

RUN# 3370 11:26:25

SAMPLE NAME: 1213 SAMPLE# 10

SIGNAL FILE: M:SIGNAL.BNC

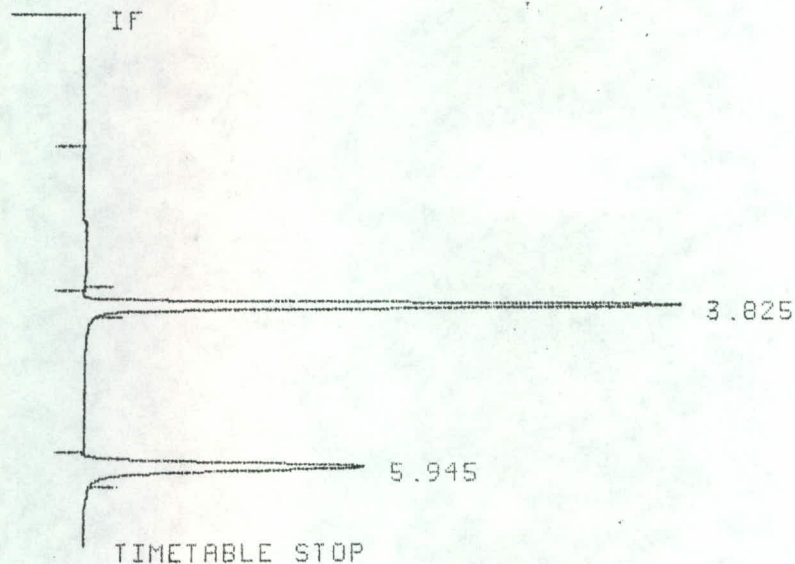
ALCOHOLEMIA

ISTD-AREA

RT	TYPE	AREA	WIDTH	CAL#	G/L	NAME
3.827	PB	274684	.086	4	.408	ETANOL
5.948	PB	1829732	.130	5&		N-PROPANOL

TOTAL AREA=2104416  
 MUL FACTOR=1.0000E+00  
 ISTD AMT=2.0000E+00

\* RUN # 3372      AUG 6, 1999 11:57:17  
START



Closing signal file M:SIGNAL .BNC

RUN# 3372      11:57:17

SAMPLE NAME: 1215      SAMPLE# 12

SIGNAL FILE: M:SIGNAL.BNC

ALCOHOLEMIA

ISTD-AREA

RT	TYPE	AREA	WIDTH	CAL#	G/L	NAME
3.825	PB	2820670	.086	4	3.834	ETANOL
5.945	PB	2000481	.131	58		N-PROPANOL

TOTAL AREA=4821152

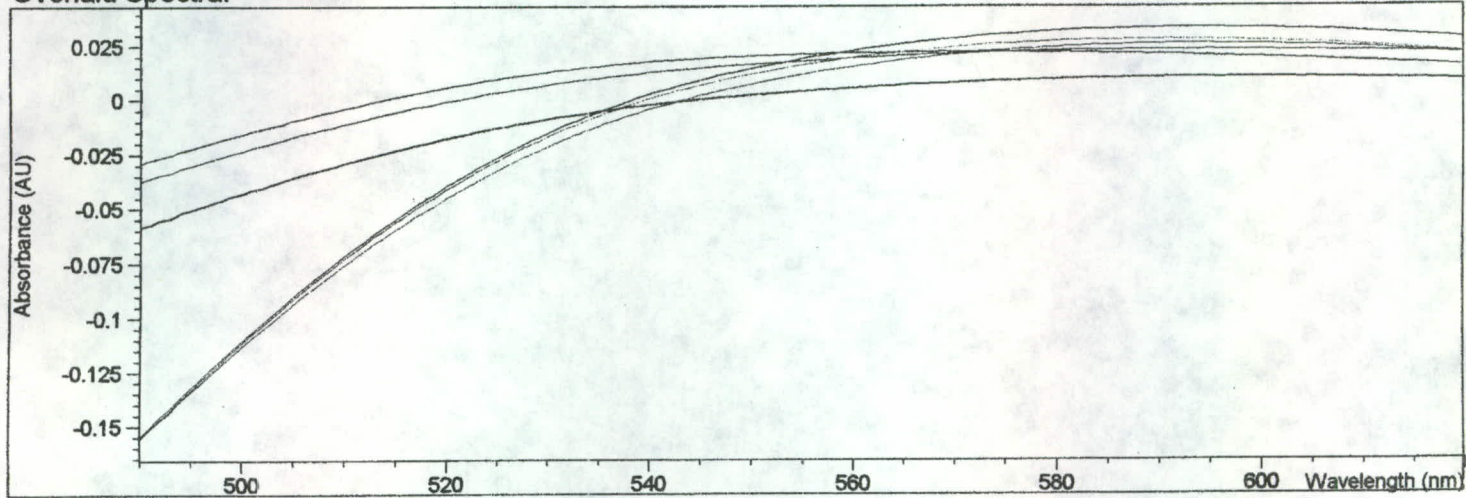
MUL FACTOR=1.0000E+00

ISTD AMT=2.0000E+00

**ANEXO No. 6  
CALIBRACION  
ESPECTROFOTOMETRIA**

Method file : <untitled>  
Information : Default Method  
Data File : C:\MUESTRAS\CURVA4BT.SD Created : 1/4/00 13:26:01

Overlaid Spectra:



#	Name	Abs<590nm>	#	Name	Abs<590nm>	#	Name	Abs<590nm>
1	0.5 g/L	1.0431E-2	3	0.5 (1)	2.1275E-2	5	1.0	3.3533E-2
2	0.5	2.3400E-2	4	1.0 (1)	2.8140E-2	6	1.0	2.6062E-2

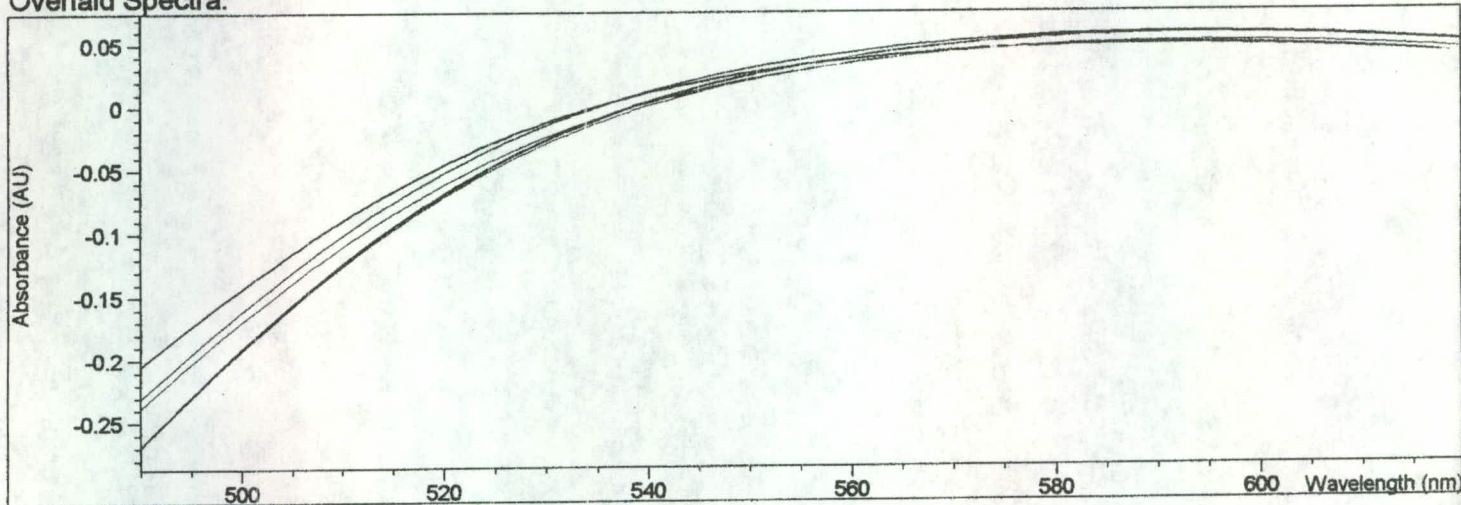
Report generated by : Bárbara Toledo

Signature: .....

\*\*\* End Fixed Wavelength Report \*\*\*

Method file : <untitled>  
Information : Default Method  
Data File : C:\MUESTRAS\CURVA5BT.SD Created : 1/4/00 17:35:01

Overlaid Spectra:



#	Name	Abs<590nm>	#	Name	Abs<590nm>	#	Name	Abs<590nm>
1	1.5	4.8386E-2	3	1.5	5.8013E-2	5	2.0	5.6703E-2
2	1.5	5.0438E-2	4	2.0	4.9460E-2	6	2.0	5.7329E-2

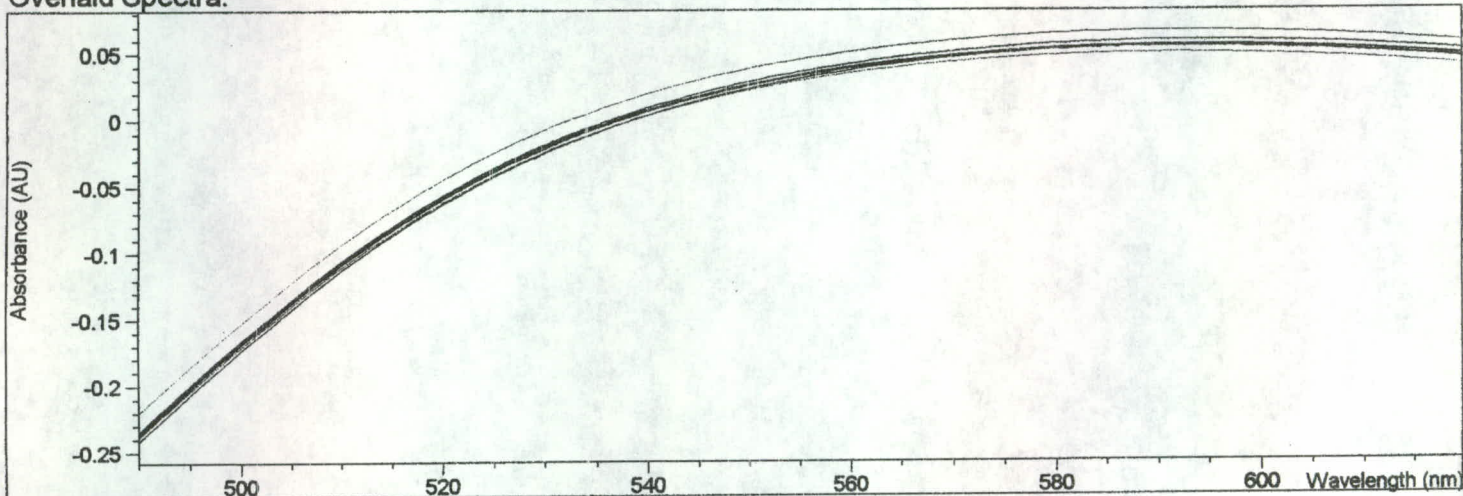
Report generated by : Bárbara Toledo

Signature: .....

\*\*\* End Fixed Wavelength Report \*\*\*

Method file : <untitled>  
Information : Default Method  
Data File : C:\MUESTRAS\CURVA6BT.SD Created : 1/5/00 12:05:26

Overlaid Spectra:



#	Name	Abs<590nm>	#	Name	Abs<590nm>	#	Name	Abs<590nm>
1	2.5 g/L	5.4863E-2	3	2.5 g/L	5.9535E-2	5	3.0 g/L	5.5560E-2
2	2.5 g/L	5.6131E-2	4	3.0 g/L	5.0158E-2	6	3.0 g/L	6.6782E-2

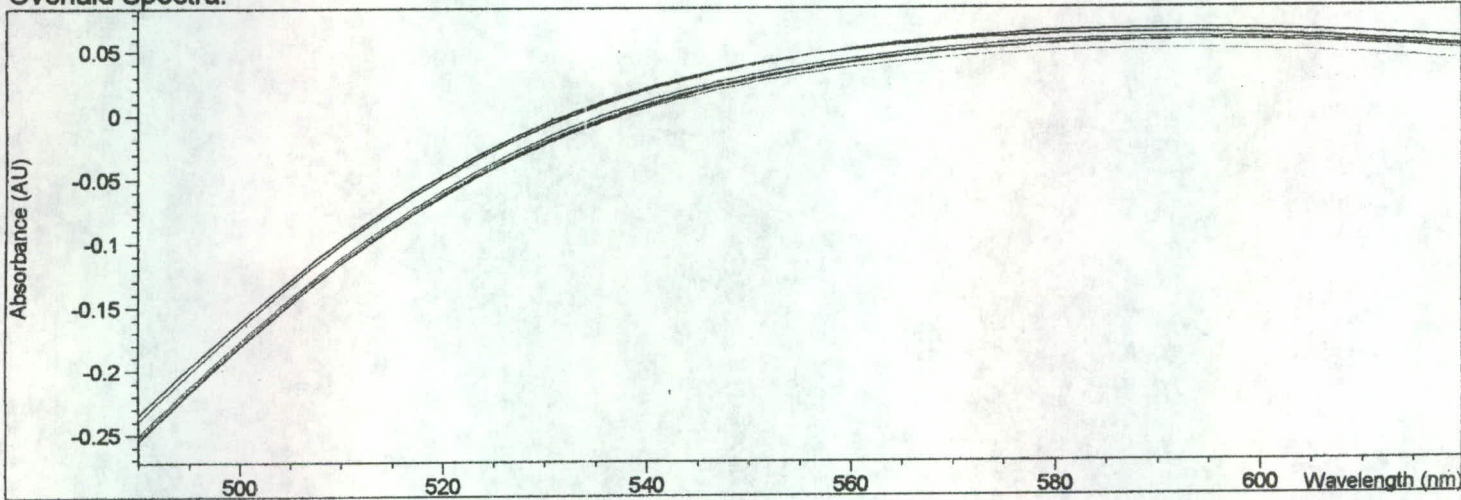
Report generated by : Bárbara Toledo

Signature: .....

\*\*\* End Fixed Wavelength Report \*\*\*

Method file : <untitled>  
Information : Default Method  
Data File : C:\MUESTRAS\CURVA7BT.SD Created : 1/5/00 15:46:11

Overlaid Spectra:



#	Name	Abs<590nm>	#	Name	Abs<590nm>	#	Name	Abs<590nm>
1	3.5 g/L	6.3831E-2	3	3.5 g/L	6.7390E-2	5	4.0 g/L	5.7849E-2
2	3.5 g/L	6.0083E-2	4	4.0 g/L	5.1200E-2	6	4.0 g/L	5.8012E-2

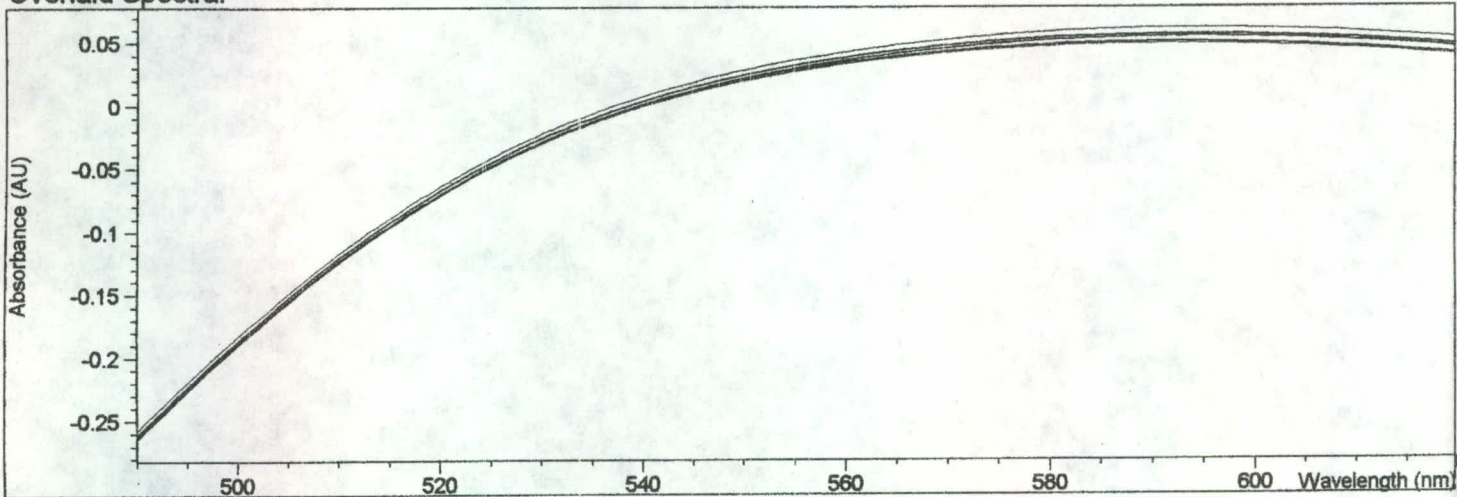
Report generated by : Bárbara Toledo

Signature: .....

\*\*\* End Fixed Wavelength Report \*\*\*

Method file : <untitled>  
Information : Default Method  
Data File : C:\MUESTRAS\CURVA8BT.SD Created : 1/6/00 11:54:00

Overlaid Spectra:



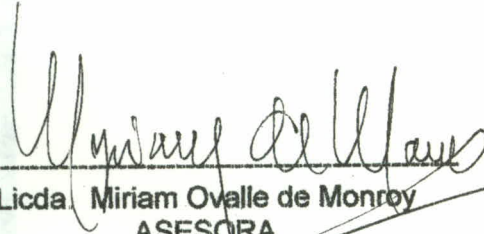
#	Name	Abs<590nm>	#	Name	Abs<590nm>	#	Name	Abs<590nm>
1	4.5 g/L	5.5980E-2	3	5.0 g/L	5.0293E-2	5	5.0 g/L	5.4146E-2
2	4.5 g/L	6.1053E-2	4	5.0 g/L	5.4215E-2	6	4.5 g/L (1)	4.8726E-2

Report generated by : Bárbara Toledo Signature: .....

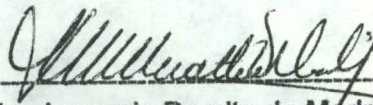
\*\*\* End Fixed Wavelength Report \*\*\*



Bárbara Yannine Toledo Chaves  
AUTORA



Licda. Miriam Ovalle de Monroy  
ASESORA



Licda. Lucrecia Peralta de Madriz  
DIRECTORA DE ESCUELA



Licda. Hada Marieta Alvarado Beteta  
DECANA