



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

IMPLEMENTACIÓN Y ESTANDARIZACIÓN DE UN MÉTODO
COLORIMÉTRICO PARA LA DETERMINACIÓN DE ALCOHOL
ETÍLICO EN FLUIDOS BIOLÓGICOS (SALIVA, SANGRE Y ORINA).

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

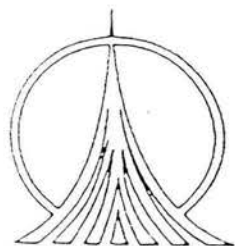
PRESENTAN:

DÍAZ VÁZQUEZ GERARDO.
SANDOVAL CORONEL CRISTÓBAL LEONCIO

ASESORES:

M. en C. VALENTÍN ISLAS PÉREZ
M. en C. JUAN FRANCISCO SÁNCHEZ RUIZ

NOVIEMBRE 2004





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO

PRESIDENTE:	Q. CARLOS SALVADOR VALADEZ SÁNCHEZ
VOCAL	M. en C. VALENTÍN ISLAS PÉREZ
SECRETARIO	M. en C. JUAN FRANCISCO SÁNCHEZ RUIZ
SUPLENTE	Q.F.B. ROSALBA CERVANTES CRUZ
SUPLENTE	M.en C. Ma. TERESA GRISELDA FUENTES LARA

AGRADECIMIENTOS.

Agradecemos la colaboración de todas las personas que contribuyeron a la realización de este proyecto, especialmente a nuestros padres y hermanos que con su apoyo y consejo nos motivaron a alcanzar la mas grande de nuestras metas, la cual constituye la herencia mas valiosa que pudiéramos recibir.

Dedicado a nuestras esposas e hijos con cariño.

ÍNDICE

TEMA	Pág.
1. GENERALIDADES Y PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS DEL ALCOHOL ETÍLICO	1
a) Cinética de absorción del alcohol etílico	1
b) Distribución del alcohol etílico en diferentes compartimentos	3
c) Metabolismo y eliminación	4
d) Efectos farmacológicos	6
e) Efectos sobre otros órganos	8
2. SALIVA	9
3. ORINA	10
4. UTILIDAD Y/O APLICACIÓN DE LA DETERMINACIÓN DE ALCOHOL ETÍLICO DE SALIVA Y/O SANGRE	11
a) Aplicaciones clínicas	11
b) Aplicaciones forenses	12
5. BEBIDAS ALCOHÓLICAS	13
6. MÉTODOS PARA CUANTIFICAR ALCOHOL ETÍLICO	14
a) Métodos colorimétricos	14
b) Métodos enzimáticos	15
c) Métodos cromatográficos	15
d) Otros métodos	15
7. VALIDACIÓN	16
a) Definiciones	17
8. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
9. OBJETIVOS	18
10. HIPÓTESIS	18
11. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN	19
12. MATERIALES Y EQUIPO NECESARIO	19
13. SOLUCIONES NECESARIAS	20
14. PROCEDIMIENTO	21
15. MÉTODO COLORIMÉTRICO PARA LA DETERMINACIÓN DE ALCOHOL ETÍLICO EN FLUIDOS BIOLÓGICOS (MÉTODO DE THIENES AND HALEY, 1972)	23
16. DIAGRAMA DE FLUJO	24
17. DETERMINACIÓN DE ALCOHOL ETÍLICO EN FLUIDOS BIOLÓGICOS	25
18. DETERMINACIONES	26
a) Máximo de absorbancia	26
b) Correlación concentración vs. absorbancia	28
c) Verificación de equipos-estufa	29
d) Validación	31
I. Linealidad del sistema	31
II. Precisión del sistema	33
III. Linealidad del método	34
IV. Exactitud y repetibilidad al 100 %	36
V. Precisión (Reproducibilidad)	37
VI. Límite de detección y límite de cuantificación	38
19. DESARROLLO DEL MÉTODO DE ANÁLISIS EN FLUIDOS BIOLÓGICOS	39
20. ANÁLISIS DE RESULTADOS	48
21. CONCLUSIONES	51
22. BIBLIOGRAFÍA	53



1. GENERALIDADES Y PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS DEL ALCOHOL ETÍLICO.

a) Cinética de Absorción del Alcohol etílico.

El alcohol etílico es una molécula pequeña y poco polar que atraviesa bien las membranas biológicas, incluidas la hematoencefálica y placentaria. Por su carácter anfifílico que le confiere propiedades de libre difusión se absorbe de forma simple en el estómago y sobre todo en el intestino delgado y colon.^{1, 2} Algunos factores que retrasan el vaciamiento gástrico (comida, ejercicio, etc.) disminuyen la velocidad de absorción y consecuentemente la concentración máxima que alcanza.³

En un estudio realizado por *Roine et al* (1991), se observó el efecto de la bebida alcohólica en la concentración sanguínea. A una dosis de 0.3g/kg se observa que disminuye la concentración máxima (Cmax) y el área bajo la curva (ABC) cuando se ingiere a concentraciones del 40% y 4% esto se debe a un incremento en la retención gástrica de alcohol etílico (4% < 40%) y un mayor metabolismo de primer paso: 4% < 40% (4% = 0.004 ± 0.05; 40% = 0.329 ± 0.044g/kg).⁴

La enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) del tracto gastrointestinal es responsable de un efecto de primer-paso con un valor típico de 0.25, el cual disminuye con el alcoholismo crónico.⁶

Se absorbe en el hígado y posteriormente se distribuye en el agua total del organismo. La concentración sanguínea máxima de alcohol etílico se iguala rápidamente con la de los órganos bien irrigados como el hígado, riñones, bazo y cerebro.^{1, 7}

El intestino delgado absorbe aproximadamente el 80% del alcohol ingerido y en adultos sanos de entre el 80-90% de esta absorción se alcanza dentro de los primeros 30-90 min. y se completa en 4-6 horas.^{3, 8}

En condiciones experimentales se alcanzan a los 30-60 minutos concentraciones plasmáticas de 25-100 mg/dL ingiriendo bebidas alcohólicas con 25% de alcohol etílico y se ha observado que la velocidad de absorción se incrementa con bebidas de concentraciones moderadas de alcohol (10-15%).^{3, 8, 9}

La cinética del alcohol es compleja y no del todo bien conocida, existe una primera fase que corresponde a la primera hora tras la ingesta, donde existe una fuerte pendiente o caída de la concentración (por la intervención de isoenzimas y el sistema microsomal de oxidación del alcohol), entre la 1ª y 6ª hora hay una caída más lineal de las concentraciones medias que es debido a la acción de la ADH y que se ajusta a la ecuación de Widmark. Figura 1

Existe una tercera fase trascurrida la 6ª hora de una caída más lenta para concentraciones bajas (inferiores a 0.2-0.3 g/L)³⁵

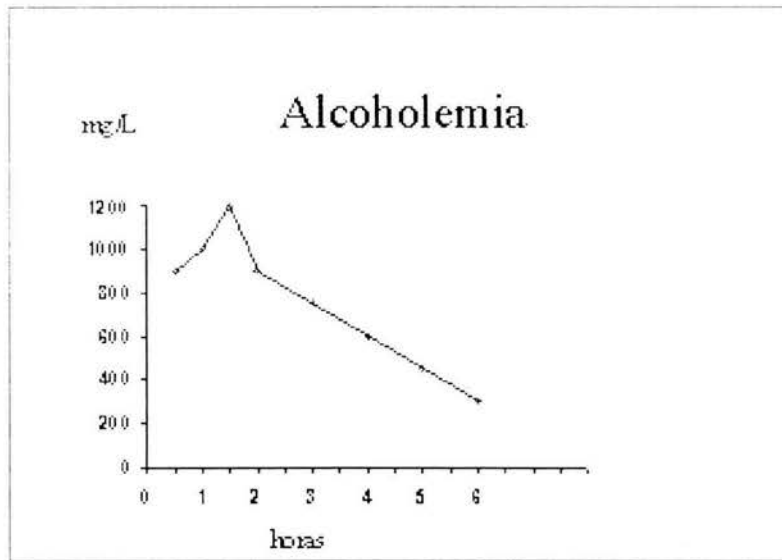


Figura 1. Cinética del alcohol etílico.

Las concentraciones sanguíneas de alcohol etílico varían según diferentes factores dietéticos, genéticos, hormonales y farmacológicos. En general aumentan la absorción y su nivel sanguíneo:

- El mayor flujo sanguíneo esplácnico.
- Las bebidas de moderada graduación (vinos).
- La motilidad intestinal aumentada.
- El ayuno.
- La ingestión de alimentos en pequeña cantidad.
- Los alimentos ricos en hidratos de carbono.

Por otro lado disminuyen la absorción o los niveles de alcohol etílico:

- Las bebidas de alta graduación (inhiben la motilidad intestinal).
- El aumento del pH gástrico.
- La ingestión de grandes cantidades de comida.
- Algunos aminoácidos (aspargina, alanina, fenilalanina, glutamina a etc).
- El aumento de la diuresis.

También la actividad de la ADH disminuye después de ayunos prolongados, los regímenes hipocalóricos o pobres en proteínas, carencias de zinc, la ingestión de pirazolonas.



El glucágon, la hipofisectomía y la tiroidectomía aumentan la actividad de la ADH. El sistema microsomal de oxidación del alcohol etílico es inducible por la ingestión crónica de éste y por la toma regular de ciertos inductores enzimáticos (fenobarbital, fenitoina, rifampicina). La actividad de la deshidrogenasa de acetaldehído disminuye en caso de enfermedad hepática con el consiguiente aumento de la concentración sanguínea de acetaldehído. La oxidación del alcohol etílico aumenta cuando se incrementa la regeneración del Nicotil Adenil Dinucleótido (NAD^+) como sucede tras la ingestión de glucosa o por el esfuerzo muscular.³⁵

b) Distribución del alcohol etílico en diferentes compartimentos.

Tras su ingestión se absorbe por la mucosa gástrica un 30% y después por el intestino delgado proximal el 70% restante. Se puede absorber por el colon y se han descrito casos mortales por absorción pulmonar por alcohol vaporizado.¹⁹

La mayor parte del alcohol etílico se metaboliza en el hígado por la ADH, enzima citoplasmática que requiere NAD^+ como aceptor de hidrogeniones. Dada su alta afinidad por el alcohol etílico ($K_m < 2\text{mM}$) se satura fácilmente y presenta cinética de orden cero (velocidad de eliminación constante e independiente a la concentración) y a un ritmo de 15 a 20 mg/dL/hora dependiendo del peso corporal y probablemente del peso del hígado.

La distribución del alcohol etílico esta determinada por el efecto de primer-paso y por el contenido acuoso de todos y cada uno de los órganos y tejidos. Esta distribución depende de la velocidad de difusión y se presentan diferentes relaciones de distribución para cada fluido.^{10, 2, 11} Tabla 1

Órgano o fluido biológico	Volumen de distribución (L/kg)
Suero	1.15
Orina	1.3
Saliva	1.3
LCR	1.15
Cerebro e hígado	0.85 a 0.90
Riñón	0.83
Aire alveolar	0.0005 de la conc. sanguínea

Tabla 1. Concentración relativa de alcohol en diversos líquidos orgánicos,, tejidos y aire alveolar (la concentración sanguínea es de 1.0)Tomado de Clark (1988)



Las mujeres presentan un menor efecto de primer-paso y, por el mayor componente graso, un menor volumen de distribución (Vd). Esto determina que, a igualdad de ingesta, se alcancen en ellas mayores alcoholemias que en los varones.¹ El Vd aproximado es de 0.6 L/kg en adultos y 0.7 L/kg en niños. Un consumo de alcohol etílico de 45 g diarios por tres semanas incrementa el Vd entre 0.73-0.88 L/kg en hombres, no así en mujeres que puede mantenerse en 0.7 L/kg.

Una vez que el alcohol etílico alcanza el equilibrio, satura la sangre y se distribuye a los tejidos de acuerdo a su contenido acuoso. Deprimirá el cerebro gradual e inespecíficamente con el deterioro intelectual y motor respectivo para el ser humano.

La relación de concentración alcohólica orina/sangre varía entre 1.4-1.7 cuando la concentración alcohólica exceda 0.50 mg/dL y a medida que esta disminuye (0.40mg/dL) la relación orina / sangre se incrementa. Esta correlación no depende de la edad (20-60 años).¹²

Existe correlación en la concentración alcohólica de sangre y saliva de 0.85-1.2 en un rango de 10-90 mg/dL ($r=0.89$). Esta relación es constante en las fases de absorción, distribución y eliminación del metabolismo del alcohol etílico.^{13, 14, 15}

c) Metabolismo y eliminación.

El hígado es el principal órgano responsable del metabolismo del alcohol etílico (más del 90%), por tres pasos principales:^{3, 16}

- 1.- Alcohol-ADH en la fracción soluble de la célula.
- 2.- Sistema de oxidación microsomal del alcohol etílico, localizada en el retículo endoplásmico.
- 3.- Sistema peroxidasa-catalasa, paso minoritario. Localizado en las proximidades.

El alcohol etílico se oxida en presencia de la ADH, en acetaldehído que es muy volátil y tóxico, este a su vez es oxidado en acetato. Esto aumenta mucho la concentración de la forma reducida de NADH, a expensas de NAD⁺. El acetato a su vez se convierte en acetyl CoA, pero esto entraña la conversión de adenosintrifosfato (ATP) en adenosinmonofosfato (AMP). Figura 2

Muchos cambios consecutivos al consumo de alcohol etílico, como la mayor producción de lactato y ácidos grasos, la probable disminución del metabolismo del ciclo del ácido tricarbónico hepático y la menor oxidación de los ácidos grasos, son consecuencia directa de la mayor relación NADH/NAD⁺ producida por la oxidación del alcohol etílico. La hiperuricemia causada por el consumo de alcohol etílico obedecería al recambio acelerado del AMP, parte del cual ingresa en la vía para la degradación de los nucleótidos purínicos que forma acetyl CoA y finalmente se metaboliza en los tejidos periféricos como músculos en bióxido de carbono (CO₂) y agua.³⁶ El 10% de acetato ingresa a las vías sintéticas formando lípidos.²

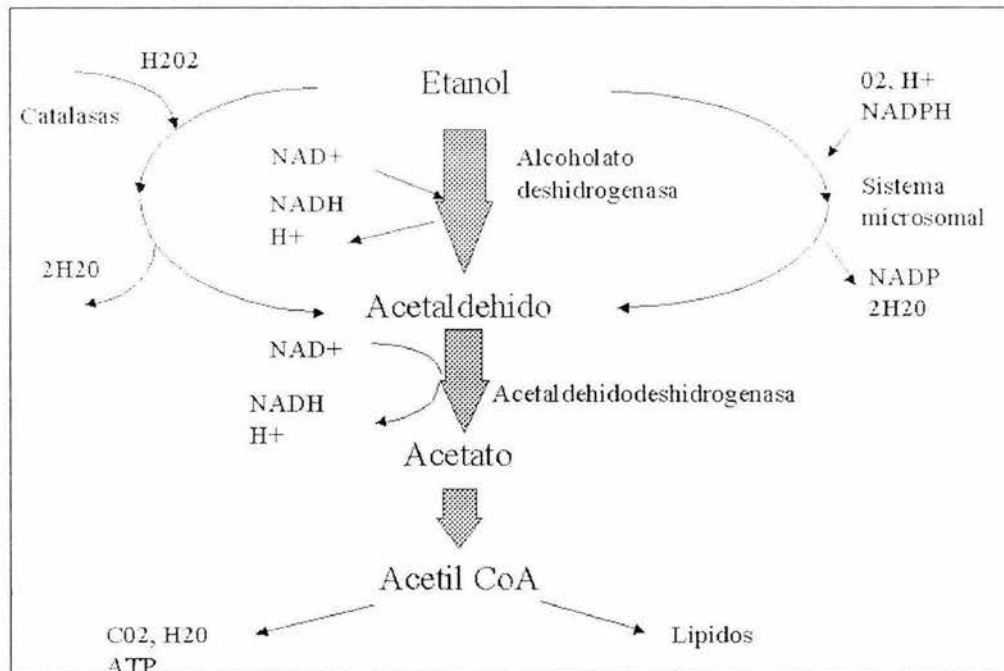


Figura 2. Metabolismo del EtOH

El alcohol etílico también puede oxidarse a acetaldehído por las oxidasas microsómicas de función mixta que están en el retículo endoplásmico liso del hígado (hasta un 10% del total en las grandes ingestiones) y por la vía alterna del sistema catalasa hepático^{1, 12}

Generalmente el 2% del alcohol etílico ingerido escapa de la oxidación y es eliminado por aliento (0.7%), orina (0.3%), sudor (0.1%), entre otros.^{5, 2} Estas pequeñas cantidades presentan un gran interés toxicológico, ya que permiten determinar indirectamente el grado de alcoholemia.^{1, 16}

En un estudio realizado por Charles L. Winek & Kathy L. Murphy indican que la velocidad de eliminación, en sujetos de peso corporal medio (70 kg), se describe como un proceso de orden cero y que esta se incrementa con la experiencia bebedora (dosis dependiente) de la siguiente manera³². Tabla 2

Velocidad de eliminación	Experiencia / consumo
12 ± 4 mg/h	No alcohólicos / < 187.5ml.EtOH/mes
15 ± 4 mg/h	Bebedor social / entre 187.5 y 937.5 oz.EtOH/mes
30 ± 9 mg/h	Alcohólico / >937.5ml.EtOH/mes

Tabla 2. Velocidad de eliminación y experiencia de consumo alcohólico³²



Algunos autores consideran el metabolismo del alcohol etílico siguiendo la cinética de Michaelis-Menten con una K_m : 0.09-0.11 mg/ml, con niveles de alcohol etílico de 300mg/dL y una V_{max} :0.22mg/ml/h.³

El proceso de eliminación total se describe de acuerdo al modelo de Michaelis-Menten para cinética enzimática. La velocidad máxima de eliminación es de 8.5g/h/70kg lo cual equivale a una velocidad de desaparición de 230mg/L/h. El aclaramiento en: aliento es 0.16L/h, sudor es 0.02L/h y en riñón 0.06L/h.⁵

Se estima que la velocidad de eliminación es de 100-200 mg/kg/h a una dosis de 2g/kg peso corporal.²² Algunas sustancias aumentan el ritmo de metabolismo tales como la insulina, tiroxina, corticosteroides, vitamina B, B₆ y C, así como la fructosa.²

Desde el punto de vista energético, un gramo de alcohol etílico libera 30 kJ completamente oxidado.²

d) Efectos Farmacológicos.

El alcohol etílico es fundamentalmente un depresor de la transmisión nerviosa a nivel neuronal en el sistema nervioso central (SNC).^{1,2} Sus efectos son una consecuencia directa de su acción sobre las membranas celulares y sobre los neurotransmisores. Puede modificar la estructura física de las membranas, así como su composición química de una forma reversible. En estudios recientes se ha comprobado que el etanol actúa en células del SNC de las siguientes formas:

- ❖ Acentúa el efecto de algunos neurotransmisores en sus receptores postsinápticos,
- ❖ Las respuestas sinápticas a menudo son mayores amplitud o duración.
- ❖ Se aumenta la actividad de canales iónicos por activación de proteínas de membrana.³⁸ Fig.3

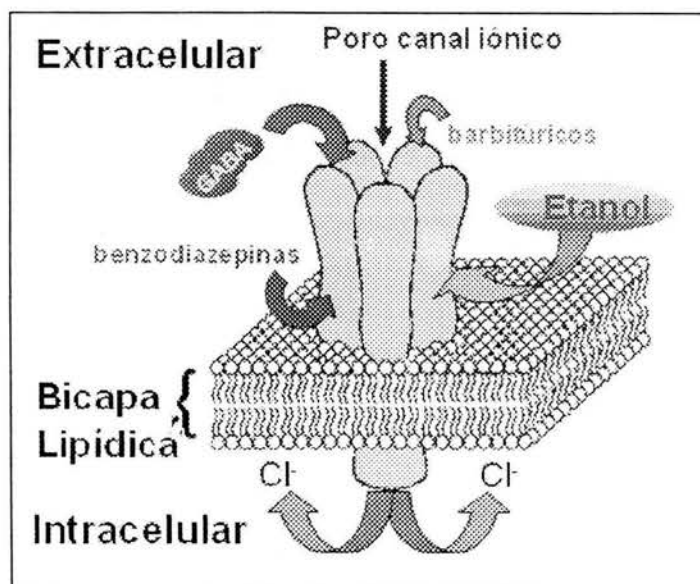


Fig 3. Activación de proteínas de membranas por etanol.



El sistema nervioso central es el órgano más afectado por el alcohol que cualquier otro sistema del organismo. La acetilcolina cerebral, así como las aminas biógenas (dopamina, noradrenalina, serotonina) aumentan inicialmente su liberación lo cual explicaría el efecto estimulante inicial sobre la actividad psicomotriz para pasar después a una fase de depresión. El ácido gamma-aminobutírico (GABA) es un potente inhibidor del SNC y está aumentado en casos de etilismo agudo. También el alcohol es capaz de aumentar la afinidad del GABA por su receptor responsable del efecto depresor. Puede ser que el alcohol también influya en el enlace entre los opiáceos endógenos (encefalinas y endorfinas) con sus receptores y sobre los aminoácidos estimulantes (aspartato y glutamato). Los resultados finales en líneas generales serían estimulación inicial a pequeñas dosis e inhibición a grandes dosis³⁶. Por ello el efecto inicial se manifiesta como una aparente estimulación, seguido de una conducta espontánea y menos autocontrolada; el pensamiento y su expresión verbal puede aparecer más fluidos pero disminuye la habilidad motora más fina. En general disminuye la capacidad de entender y procesar la información sensorial por lo que resulta más lenta la respuesta inmediata.

Aunque los efectos centrales del alcohol etílico son proporcionales a su concentración sanguínea, también es cierta la aparición de un fenómeno de tolerancia.

A medida que se incrementa la ingesta de alcohol etílico aumenta la alcoholemia, generalizando la depresión central disminuyendo aun más la capacidad ideativa y asociativa, torpeza, pérdida de reflejos, estupor y sueño. Concentraciones más elevadas producen coma, depresión bulbar y muerte. La correlación de ambos parámetros se indican en la siguiente tabla:^{18, 19}

Whisky (ml)	Conc. en sangre (mg/100ml)/(% EtOH)	Efecto	Parte de el SNC deprimida
30-60	10 - 50/0.01 - 0.05	Ninguna o ligera euforia.	Lóbulo frontal
90-120	50 - 100 / 0.05 - 0.1	Influencia leve sobre la visión estereoscópica y la adaptación a la oscuridad.	Lóbulo frontal
120-180	100 / 0.1	Ligeramente intoxicado.	Lóbulo frontal
120-180	100 - 150 / 0.1 - 0.5	Euforia: desaparición de la inhibición; mayor tiempo de reacción.	Lóbulo parietal
180-210	150 - 200 / 0.15 - 0.2	Intoxicación moderada; tiempo de reacción muy prolongado; pérdida de inhibición, perturbación del equilibrio y coordinación.	
240-270	200 - 250 / 0.2 - 0.25	Grado intenso de intoxicación; perturbación del equilibrio y coordinación; retardo de procesos químicos y obnubilación de la conciencia.	Lóbulo occipital, cerebelo y diencefalo.
300-450	250 - 400 / 0.25 - 0.4	Coma profundo y posiblemente fatal.	Medula

Tabla 3. Correlación entre la concentración sanguínea de alcohol y sus efectos en el SNC.



Por otro lado, los textos especializados mencionan la correspondencia entre la concentración del alcohol etílico en sangre y en orina con los efectos farmacológicos antes citados, específicamente pérdida de las habilidades motoras e intelectuales. Otros investigadores reportan estudios en saliva, en donde determinan la concentración de alcohol etílico en este fluido y tratan de correlacionarla con la concentración en sangre.¹³

El momento en que un individuo se califica como “ebrio”, se basa precisamente en estos dos parámetros: determinación de la concentración en sangre y la valoración clínica del efecto farmacológico manifestado y de acuerdo con la literatura especializada, un valor de alcohol etílico en sangre mayor a 80 mg/dL se considera estado de ebriedad.*

e) Efecto sobre otros órganos.

Sistema Cardiovascular.- A dosis moderadas provoca vasodilatación de la piel y vías digestivas, ya que deprime el centro vasomotor. Con la vasodilatación periférica aumenta la pérdida de calor y disminuye la temperatura corporal a pesar del bochorno cutáneo.

Aparato Digestivo.- Estimulación de las secreciones salivales y gástricas a causa de la liberación de histamina y gastrina por el alcohol etílico a dosis bajas. Cuando estas exceden una concentración de 20% se inhibe la secreción gástrica y a concentraciones de más de 40% se presenta una acción irritante a causa de la hipertermia e inflamación de la boca del estómago.

Riñón.- Al disminuir la secreción de hormona antidiurética (vasopresina) por el lóbulo posterior de la hipófisis (Sistema hipotálamo-hipófisis) disminuye la resorción de agua produciendo diuresis.

En médula ósea.- Provoca anemia macrocítica y sobre el nervio óptico puede llegar a causar atrofia.

Nivel hepático: Provoca inhibición de glicogénesis, aumento de síntesis de triglicéridos, disminución de la actividad del ciclo de Krebs y reducción de la oxidación de ácidos grasos

Otras acciones, generalmente tóxicas, son a nivel del aparato digestivo ya que produce irritación de las mucosas e interferencia con la absorción de lípidos, minerales, ácido fólico y algunas vitaminas (B₁₂). En el músculo, produce alteraciones estructurales de la fibra muscular, que pueden llevar a miopatía.²

*Artículo 100. DEL REGLAMENTO DE TRANSITO DEL DF.- Ninguna persona puede conducir vehículos por la vía pública; si tiene una cantidad de alcohol en la sangre superior a 0.8 gramos por litro o de alcohol en aire expirado superior a 0.4 miligramos por litro.



2. SALIVA.

La saliva es un fluido biológico práctico para la determinación de drogas de abuso, fármacos, contaminantes ambientales y muchas sustancias endógenas, y a causa de que el alcohol etílico tiene un bajo peso molecular, alta solubilidad en agua y no se enlaza a proteínas plasmáticas, así como la alta irrigación sanguínea a las glándulas salivares, hacen de la saliva un fluido disponible para su análisis.²³

La saliva se excreta en mayor proporción por tres glándulas: parotida, sublingual y submaxilar, contribuyendo con el 90% la parotida y submaxilar.

La composición de la saliva en adultos normales se resume en la tabla 4 y esta puede afectarse por numerosos factores tales como el día, dieta, edad, sexo y cambios en la velocidad de secreción. Aproximadamente se producen 1200 ml de saliva al día los cuales contienen electrolitos y otras sustancias presentes en pequeñas cantidades. El pH de la saliva se encuentra entre 6.2 - 7.4, la concentración de proteínas es 1/10 parte de la plasmática.²⁴

Espécimen	Saliva parotida (0.7 ml/min)a*	Saliva submaxilar (0.6 ml/min)a*	Plasma
Potasio b	20.0	17.0	4
Sodio b	23.0	21.0	140
Cloruro b	23.0	20.0	105
Bicarbonato b	20.0	18.0	27
Calcio b	2.0	3.6	5
Magnesio b	0.2	0.3	2
Fosfato b	6.0	4.5	2
Urea c	15:0	7.0	25
Amonio c	0.3	0.2	
Ácido úrico c	3.0	2.0	4
Glucosa c	<1.0	<1.0	80
Lípidos totales c	2.8	2.0	500
Colesterol c	<1.0		160
Ácidos grasos c	1.0		300
Amino ácidos c	1.5		50
Proteínas c	250.0	150.0	6000
PH	6.8 - 7.2	6.8 - 7.2	7.35

*a Vel. Flujo en ml/min/gland

*b mEq/L

*c mg/dL

Tabla 4. Valores medios de composición salivar en adultos sanos comparados con plasma.²⁴



3. ORINA.

La orina se forma en el riñón el cual posee la notable propiedad de seleccionar y retener las sustancias esenciales, excretando al mismo tiempo los productos de desecho del metabolismo y el exceso de lo ingerido en la dieta. En un adulto normal, el 25% del gasto cardiaco (aproximadamente 1 litro de sangre), pasa por los dos riñones cada minuto y un ultrafiltrado de plasma atraviesa cada ovillo glomerular en la cápsula de Bowman. La mayor parte de los solutos de la orina esta formada por urea y cloruro de sodio, además de contener, ácido úrico, creatinina así como potasio, sulfatos, pequeñas cantidades de azúcares, productos del metabolismo intermediario como ácido oxálico, ácido cítrico, piruvato, algunos aminoácidos, glucoproteínas, ácidos grasos libres y metales. Las cantidades presentes de cada uno de estos metabolitos esta determinada por la ingesta de alimentos del individuo. Los valores de metabolitos más importantes de la orina se resumen en la Tabla 5.

Propiedades físicas y químicas	Valores de referencia.
Volumen	1000 - 1800 ml/ml / 24 hrs.
Color	Amarillo paja a ámbar aumenta con la concentración de solutos.
Aspecto	Transparente
Densidad	1.005-1.030 g/dL
pH	4.6 - 8 (En función de clima y dieta.)
Proteínas	No hay
Cuerpos cetónicos	No hay
Bilirrubina	No hay
Urobilinógeno	1-4 mg/ 24 hrs.
Glucosa	No hay

Tabla 5. Valores de referencias de elementos en orina. (Adulto)



4. UTILIDAD Y/O APLICACIÓN DE LA DETERMINACIÓN DE ALCOHOL ETÍLICO EN SALIVA Y/O EN SANGRE.

El alcohol etílico es probablemente la droga más antigua que se conoce. En la Biblia, es referido el vino en los episodios de Noé y Lot. Una tablilla cuneiforme del 2.200 a.c, recomienda la cerveza como tónico para las mujeres en estado de lactancia. Actualmente es un gran problema médico y social.

El abuso en el consumo de bebidas alcohólicas (alcoholismo), representa uno de los problemas de salud pública más importantes actualmente. El alcohol etílico es una sustancia capaz de afectar en mayor o en menor medida (dependiendo del consumo, y la habitualidad), la casi totalidad de los sistemas del organismo, así como también puede alterar una gran cantidad de funciones metabólicas. Entre los órganos capaces de ser alterados están: el hígado (con patologías que van desde el hígado graso alcohólico, pasando por la hepatitis alcohólica, hasta la cirrosis en su grado más severo), el páncreas (en el que puede desarrollarse pancreatitis hasta insuficiencia pancreática por destrucción del parénquima), también pueden afectarse corazón, sistema nervioso central, sistema endócrino y sistema inmunológico. Entre los procesos metabólicos que pueden alterarse, se mencionan el metabolismo de las vitaminas, minerales, lípidos, proteínas e hidratos de carbono. Su detección puede realizarse en sangre o en orina.³⁷

a) Aplicaciones Clínicas

Los efectos farmacológicos así como los desordenes en la funcionalidad de muchos órganos se relacionan directamente con el grado de intoxicación con alcohol etílico, el grado de alcoholismo y la tolerancia que se presente en un individuo, así como las interacciones medicamentosas son un claro ejemplo de la necesidad de contar con métodos prácticos y específicos para la determinación directa y/o indirecta de la concentración de alcohol etílico en sangre.

El alcohol etílico está presente fisiológicamente en el organismo humano a niveles de trazas en sangre y orina, sin que esto represente interferencias en la interpretación de los datos analíticos de intoxicación.²⁰



b) Aplicaciones Forenses.

El análisis de alcohol cumple uno de los objetivos principales de la toxicología forense, en donde la detección y aislamiento de drogas en el organismo se correlacionan con efectos en el comportamiento humano. Por ejemplo: el papel predominante del automóvil en actualidad demandan la imposición de leyes que protejan al público de conductores ebrios, lo que en la práctica lleva a procedimientos rápidos y específicos para la determinación del grado de autointoxicación alcohólica.^{21, 11} Figura 4

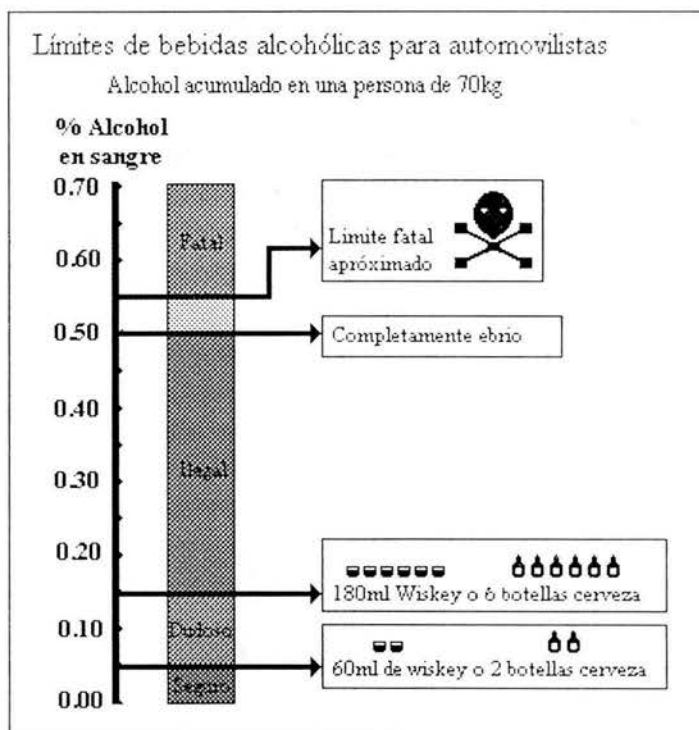


Fig. 4 Concentración de alcohol etílico y capacidad para conducir. Tomado de Clark (1988)



5. BEBIDAS ALCOHÓLICAS.

Las bebidas alcohólicas son el producto de la fermentación por microorganismos capaces de producir alcohol etílico y otros, a partir de carbohidratos. Existen diferentes tipos de bebidas alcohólicas que se diferencian en cuanto a la fuente de carbohidratos o el contenido alcohólico. Pero todos tienen en común la presencia de alcohol etílico.

Existe evidencia documentada de que no se presenta ninguna relación entre el tipo de bebida y/o preparación con la concentración alcohólica máxima. La concentración de alcohol en sangre depende de la cantidad, la velocidad de ingestión, la concentración de alcohol en la bebida y la velocidad de metabolización del organismo que se ve modificada con la experiencia bebedora del individuo. Una ingestión rápida resulta en un efecto acumulativo en la velocidad de eliminación y un incremento en las concentraciones plasmáticas de alcohol etílico. Este se absorbe más rápidamente cuando las concentraciones en la bebida oscilan entre el 10 y 30%. Cuando la concentración es menor al 10% hay un menor gradiente de concentración en el tracto gastrointestinal y una lenta absorción lo que retarda el vaciamiento gástrico. Por otra parte en concentraciones altas (mayores al 30%) la irritación de las membranas de la mucosa, el tracto gastrointestinal y el esfínter pilórico causan incremento de secreción y un retardo en el vaciamiento gástrico.³¹

El porcentaje alcohólico de algunas bebidas se resume en la tabla 6.

Bebida	Contenido de alcohol (%)
Cerveza Ligera	3.2 – 4.0
Cerveza clara	4.5
Cerveza	6.0
Cerveza de Barril	6.0 – 8.0
Licor	3.2 – 7.0
Sake	14.0 – 16.0
Vino de madera	7.1 – 14.0
Vino espumoso	8.0 – 14.0
Vino tinto	14.0 – 24.0
Vino dulce	15.5 – 20.0
Brandy	40.0 – 43.0
Whisky	40.0 – 75.0
Vodka	40.0 – 50.0
Ginebra	40.0 – 48.5
Ron	40.0 – 95.0
Tequila	45.0 – 50.5

Tabla 6. Contenido alcohólico de algunas bebidas.



6. MÉTODOS PARA CUANTIFICAR ALCOHOL ETÍLICO.

Las reacciones de cuantificación para alcohol etílico, se basan generalmente, en la oxidación del grupo funcional a su correspondiente aldehído. Esta oxidación puede ser química y/o enzimática, la formación del producto de oxidación puede ser utilizada como medida directa de la cantidad de alcohol etílico presente en la muestra. Aunque existe una potencial interferencia de alcoholes de cadena corta (metanol e propanol), la determinación de alcohol etílico resulta siempre de gran utilidad clínica y forense.

A continuación se describen algunas técnicas para la cuantificación del alcohol etílico.

a) Métodos Colorimétricos.

Estos métodos se basan en la oxidación del alcohol presente en la muestra y la determinación se realiza indirectamente al cuantificar la cantidad del ión reducido que se esta formando mediante la utilización de un espectrofotómetro UV-Vis o bien un colorímetro a la longitud de onda correspondiente al color formado. De manera general existen tres reacciones que se pueden aplicar a la cuantificación de alcohol etílico:^{33, 34}

- 1) Dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) amarillo + H_2SO_4 \longrightarrow sulfato de cromo ($Cr_2(SO_4)_3$) verde
- 2) Permanganato de potasio ($KMnO_4$) morado + H^+ \longrightarrow ion magnesio (Mn^{+2}) casi incoloro
- 3) Pentóxido de yodo (I_2O_5) incoloro \longrightarrow Yodo (I) produce color azul con almidón.



b) Métodos Enzimáticos

Estos métodos se basan en la reacción específica de la enzima ADH, con alcoholes de cadena corta (metanol, etanol y propanol). Esta reacción es dependiente de la coenzima NAD^+ y la cuantificación se realiza espectrofotométricamente.³⁴



c) Métodos Cromatográficos.

La cromatografía es un procedimiento utilizado principalmente para separar e identificar sustancias químicas en esta denominación se agrupan el conjunto de métodos que tienen características comunes.

El término cromatografía se puede definir como un método de separación física en el cual los componentes que se van a separar se distribuyen en dos fases: Una estará constituida por un soporte estacionario de gran superficie y la otra por un líquido que es filtrado a través de la fase estacionaria, esta fase móvil es el medio de transporte mientras que la fase estacionaria es el agente de separación. Estos métodos permiten la cuantificación específica de la molécula.³⁴

d) Otros métodos.

1) Fotométrico: Atenuación de la energía de radiación (REA) reacción de copulación donde ADH cataliza la oxidación del EtOH y el NAD^+H se reoxida en presencia de una diaforasa con la reducción del idonitrotetrazolio violeta (INT) a formazan-INT. Este producto absorbe a 492 nm en un espectro de emisión fluorescente.

2) Electroanalítico. (+0.8V vs. Ag/AgCl) determinación electroquímica de la formación de NAD^+H en la oxidación por ADH.³⁴

3) Determinación de alcohol etílico por microdifusión (Método de Conway)

Este método se basa en que si una sustancia volátil y un solvente puro se mantienen en compartimientos separados pero en contacto con la misma atmósfera, el soluto volátil tenderá a disolverse en el solvente puro. El soluto volátil pasará de la solución original hacia la atmósfera para luego disolverse en el solvente originalmente puro. Finalmente, esto implicará una difusión del soluto desde la solución original al solvente. Este proceso ocurrirá hasta alcanzar el equilibrio pero, si en lugar del solvente puro utilizamos una sustancia que convierta al soluto volátil en no volátil, la difusión ocurrirá hasta que la presión de vapor en la atmósfera compartida tienda a cero.²⁰



7. VALIDACIÓN.

Actualmente el empleo de una técnica de cuantificación implica un riesgo si dicha técnica no ha demostrado ser confiable por lo cual es necesario realizar la validación de la misma. Dentro del área de química legal existen problemas asociados con los análisis y dictámenes de un laboratorio forense, en estos casos la muestra analizada es juzgada y/o considerada como evidencia en casos de impartición de justicia. La validación de técnicas analíticas en el laboratorio forense permite obtener una determinación verdadera y confiable^{27, 28, 29, 30}

La validación se define como el proceso por el cual se establece por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas^{25, 26)}

La validación debe ser realizada tomando en cuenta una serie de consideraciones tales como: método de análisis, sustancia a analizar, tipo de muestra, niveles de concentración, etc. Por lo cual, para seleccionar los puntos para validar de un método de cuantificación dependen de la aplicación del método, de las necesidades particulares, de los requerimientos oficiales y algunas veces del criterio de la persona que lo realiza. Los parámetros de evaluación más comunes para la evaluación de métodos analíticos son los siguientes:

- 1) Exactitud
- 2) Linealidad
 - a) Linealidad del método
 - b) Linealidad del sistema.
- 3) Precisión
 - a) Repetibilidad
 - b) Reproducibilidad
- 4) Especificidad

Existen otros parámetros menos comunes y se utilizarán según lo requiera el método y son: sensibilidad, tolerancia del sistema cantidad mínima detectable, cantidad mínima cuantificable, estabilidad de la muestra, robustez, etc.



a) DEFINICIONES.

I. Linealidad

La linealidad de un sistema o un método analítico es su habilidad para asegurar que los resultados analíticos, los cuales pueden ser obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración de la sustancia dentro de un intervalo determinado.

II. Exactitud.

La exactitud de un método analítico es la concordancia entre un valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Se expresa como el por ciento de recobro obtenido del análisis de muestras a las que se les han adicionado cantidades conocidas de una sustancia.

III. Precisión.

La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos. Usualmente se expresa en términos de desviación estándar (D.E.) o del coeficiente de variación (C.V.). Es una medida del grado de reproducibilidad y/o repetibilidad del método analítico bajo las condiciones normales de operación.

IV. Reproducibilidad.

Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia obtenida entre determinaciones independientes realizadas bajo condiciones diferentes (diferentes analistas, días y en el mismo o diferente laboratorio con el mismo o diferente equipo).

V. Repetibilidad.

Es la precisión de un método analítico expresada como la concordancia obtenida entre varias determinaciones independientes realizadas bajo las mismas condiciones (analista, tiempo, aparato, laboratorio, etc).

VI. Límite de detección.

Es la mínima concentración de una sustancia en una muestra la cual puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada bajo las condiciones de operación establecidas. Una relación señal ruido de 3:1 ó 2:1 se considera generalmente aceptable para estimar el límite de detección.

VII. Límite de cuantificación

Es la menor concentración de analito que puede determinarse con precisión y exactitud en una muestra, bajo las condiciones experimentales establecidas. Puede emplearse una aproximación basada en la comparación de las señales medidas con muestras que contienen pequeñas cantidades conocidas de analito con muestras blanco



y determinando la relación señal-ruido. Una relación señal ruido de 10:1 se considera generalmente aceptable para estimar el límite de cuantificación.

VIII. Especificidad.

Es la habilidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente a la sustancia de interés y no a otros componentes de la muestra u otros productos de degradación.

8. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Aunque existen investigaciones reportadas en la literatura especializada para determinar la correlación entre la concentración de alcohol etílico en sangre y efecto farmacológico manifestado que indique o apoye la valoración clínica sobre el estado de ebriedad de un individuo, estos se han realizado en poblaciones anglosajonas cuyas características fisiológicas no corresponden con la nuestra. Adicionalmente también se han realizado algunas investigaciones para determinar la concentración de alcohol etílico en saliva de individuos que han ingerido bebidas alcohólicas para establecer su relación con la concentración de alcohol etílico en sangre en determinado momento y poder establecer el grado de intoxicación, con la finalidad de cuantificar en este fluido por ser de más fácil recolección y manejo.^{13,14,15,22}

A pesar de los avances en este sentido, de cuantificar alcohol etílico en saliva de individuos intoxicados, no se ha establecido con exactitud la correlación entre la concentración de alcohol etílico en sangre y saliva, por lo cual sería de gran utilidad poder realizarlo utilizando una técnica o método accesible a la mayoría de los laboratorios que tienen la necesidad de realizar este tipo de estudios, ya sea para fines legales o forenses, ó para cuestiones clínicas o de salud.

9. OBJETIVOS.

- ❖ Implementar y estandarizar un método colorimétrico para cuantificar alcohol etílico en fluidos biológicos.
- ❖ Cuantificar y comparar la concentración de alcohol etílico en sangre y saliva a diferentes tiempos.

10. HIPÓTESIS

Si consideramos que cierto porcentaje de alcohol etílico es eliminado sin metabolizarse, es posible desarrollar un método colorimétrico sencillo y reproducible para determinar y cuantificar alcohol etílico en fluidos biológicos.



11. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN.

El presente proyecto se desarrolló en dos partes:

Diseño, implementación y estandarización, del método analítico (colorimétrico) para la determinación cuantitativa de alcohol etílico.

En base a este método se realizó un estudio longitudinal comparativo y experimental llevado a cabo en una población de 3 voluntarios humanos sanos de 25 a 28 años del sexo masculino y complexión mediana, a quienes se les sometió a una ingesta controlada de una bebida alcohólica. Posteriormente se recolectaron muestras de sangre, saliva y orina a tiempos preestablecidos para determinar la concentración de alcohol etílico. A los resultados obtenidos se les realizó un Análisis de Regresión Lineal para establecer la correlación entre las concentraciones de ambos fluidos.

12. MATERIALES Y EQUIPO NECESARIO

20 tubos Vacutanier con EDTA

Matraz aforado de 10, 20, 50 y 100 ml

Pipetas Hamilton 25 mL

Pipetas graduadas 1, 5 y 10 ml

Vaso de precipitado de 50ml

Cámaras de Conway

Micropipeta 100 – 1000 ml.

Celdas de cuarzo para Espectrofotómetro UV

Ligadura

70 recipientes de plástico de boca ancha y tapón de cierre hermético o de rosca, de capacidad de 20 ml.

Centrifuga clínica 3000-5000 rpm,

Espectrofotómetro

Estufa

Refrigerador 4 °C.

Cronómetro, etiquetas y marcadores.

Gradilla



13. SOLUCIONES NECESARIAS.

Solución dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$): 4.262g + 500mL H_2SO_4 conc. y aforar a 1L con agua destilada.

Soluciones estándares de alcohol etílico:

50 mg/dL

100 mg/dL

150 mg/dL

200 mg/dL

Solución saturada de carbonato de potasio.

14. PROCEDIMIENTO.

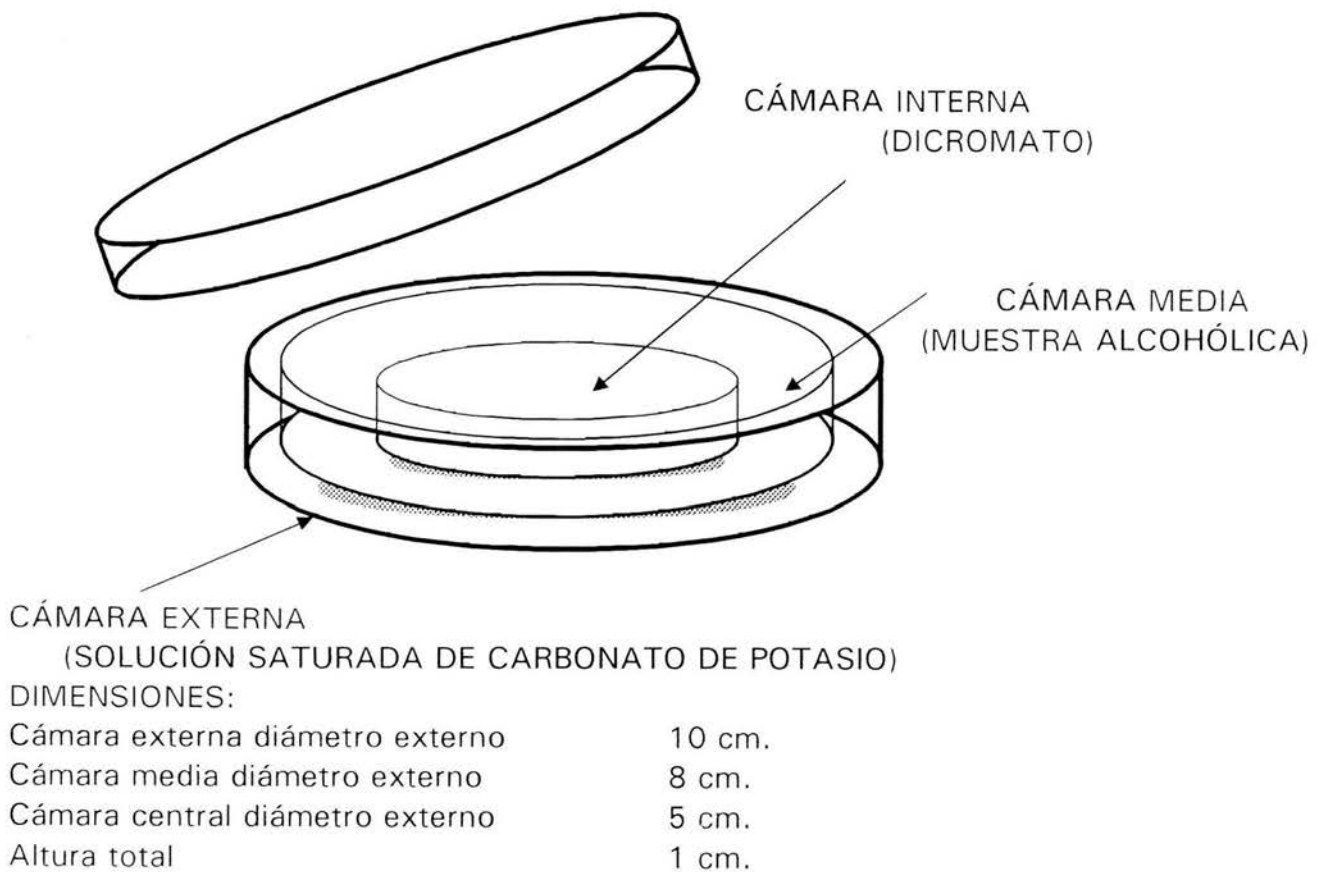
a) Estandarización y Optimización.

La solución de dicromato de potasio en ácido sulfúrico, en presencia de alcohol etílico origina la oxidación de este último en ácido acético, y el cromo pasa a Cr^{+3} , cambiando su color de anaranjado a verde-azulado, por lo que se procedió a calcular el máximo de absorbancia de este ión, realizando un barrido a la solución resultante de hacer reaccionar en un tubo de ensaye 2 ml de solución de alcohol etílico (100mg/dl) con 3ml de dicromato de potasio en solución ácida en un Espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 2 UV/VIS comenzando en la región visible de 500nm a 700nm.

Se hicieron reaccionar en un tubo de ensaye 2 ml de soluciones estándar de alcohol etílico a concentraciones (50, 100, 150, 200 mg/dl) con 3 ml de solución ácida de dicromato de potasio respectivamente y se les realizó un barrido entre las longitudes de onda visible 500nm a 700nm en un Espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 2 UV/VIS, para observar el comportamiento de absorción para cada concentración, y verificar el máximo de absorbancia.



Una vez verificado el máximo de absorbancia y en base a la técnica de microdifusión de Conway descrita anteriormente se diseñaron e implementaron cámaras de reacción empleando cajas de petri de acuerdo al siguiente diseño:





Se colocaron para la reacción de microdifusión, 4ml de solución de dicromato de potasio, en la cámara interna, y 2 ml de soluciones estándar de alcohol etílico, (50, 100, 150, 200 mg/dL) en la cámara media, así como solución saturada de carbonato de potasio en la cámara externa, esto ultimo para sellar y evitar la difusión en agua y favorecer la saturación y se observaba el cambio de color en la solución de dicromato de potasio.

Para optimizar los tiempos de incubación, al principio largos (de más de 5 horas), se opto utilizar una estufa, a la que se le verificó la temperatura en 50°C a fin de obtener un calentamiento uniforme.

Posteriormente se realizaron pruebas de temperatura y tiempos de incubación a muestras estándar, con el fin de favorecer la difusión dentro de las cámaras diseñadas, para un mejor rendimiento.

En todos los ensayos para verificar la reacción, se realizaban dos pruebas esto es para cada estándar existían dos ensayos uno directo en tubo y otro en cámaras de difusión comparándose las lecturas de absorbancia de ambas reacciones hasta observar variación de 0.01 nm.

Una vez establecidos tiempos y temperaturas para la reacción se procedieron a realizar los ensayos de estandarización del método analítico.

- 1) Linealidad del sistema.
- 2) Precisión del sistema.
- 3) Linealidad del método.
- 4) Exactitud y repetibilidad al 100%
- 5) Reproducibilidad
- 6) Limites de detección y cuantificación.

Posteriormente se realizó el ensayo biológico en sujetos, administrándoles una dosis de 0.8g de alcohol etílico por kg de peso en una bebida alcohólica preparada con ron* y refresco de toronja en un lapso de 30 min. (Se cuidó que la velocidad de ingesta de alcohol, el consumo de alimentos y los movimientos corporales fueran similares en todos los voluntarios). Una vez ingerido el primer trago se recolectaron, de manera adecuada 10 ml de orina, 2 ml de saliva a los 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120, 135 y 150 minutos, y 3 ml de sangre a los 0, 30, 60, 90 y 120 min. Almacenándose en refrigeración a 4°C hasta su procesamiento y determinación.

Nota: No se utilizó ningún conservador. Las muestras se recolectaron en recipientes de plástico y vidrio; limpios y estériles con tapón de cierre hermético y de capacidad adecuada.

*Se eligió ron por ser una bebida de consumo regular en reuniones sociales y de menor costo en comparación con otras bebidas. Además de que está reportado que no existe variación en la concentración alcohólica máxima por el tipo de bebida ³¹.



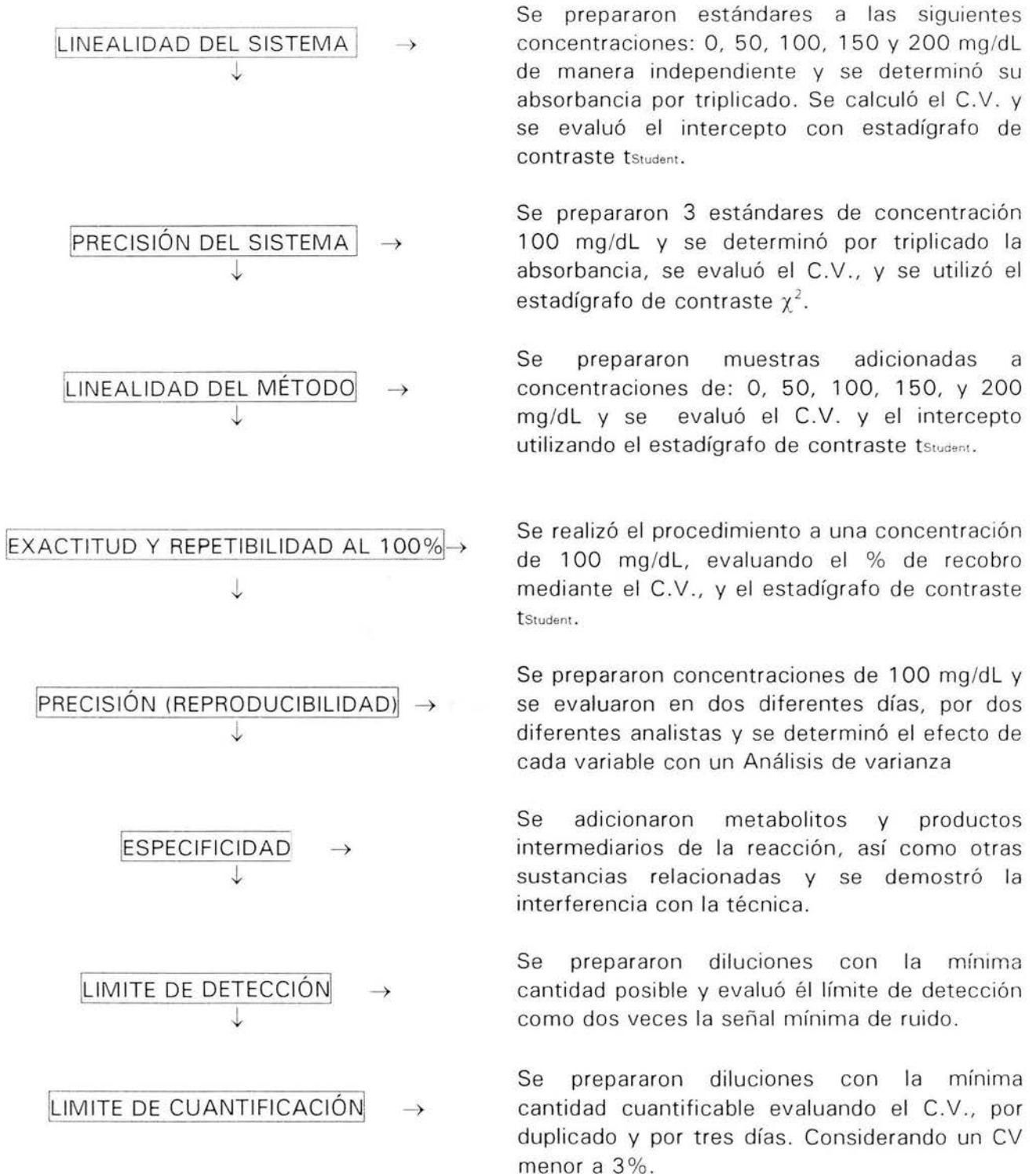
15. MÉTODO COLORIMÉTRICO PARA LA DETERMINACIÓN DE ALCOHOL ETÍLICO EN FLUIDOS BIOLÓGICOS (MÉTODO DE THIENES AND HALEY, 1972)³¹

1. Adicionar 4 ml de una solución de $K_2Cr_2O_7$ en el centro de una cámara de Conway.
2. Adicionar 2 ml de muestra en el compartimiento exterior de la cámara.
3. Incubar 90 min. a $50^\circ C$.
4. Recuperar la solución de dicromato del compartimiento interno.
5. Leer absorción a 595nm y comparar con curva estándar según se indicó anteriormente.



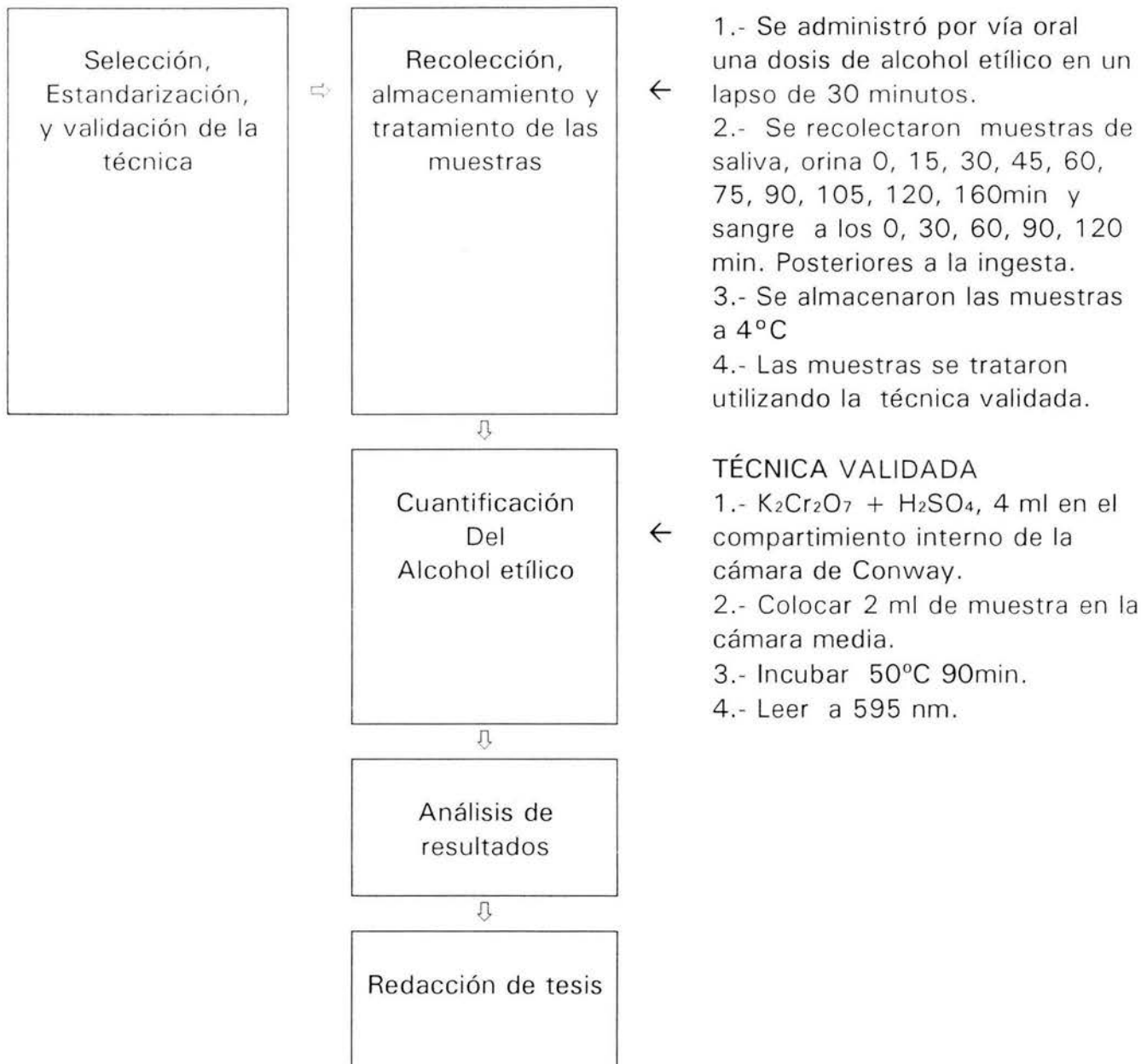
16. DIAGRAMA DE FLUJO.

VALIDACIÓN





17. DETERMINACIÓN DE ALCOHOL ETÍLICO EN FLUIDOS BIOLÓGICOS





18. DETERMINACIONES.

a) Máximo de absorbancia.

Se prepararon soluciones estándar de alcohol etílico a 0, 50, 100, 150 y 200 mg/dL. Tomándose un alícuota 2 ml de solución de alcohol etílico y otra con 3 ml de solución de dicromato de potasio se hicieron reaccionar en un tubo de ensaye. A las soluciones obtenidas se les determinó el máximo de absorbancia. Grafico. 1 y 2

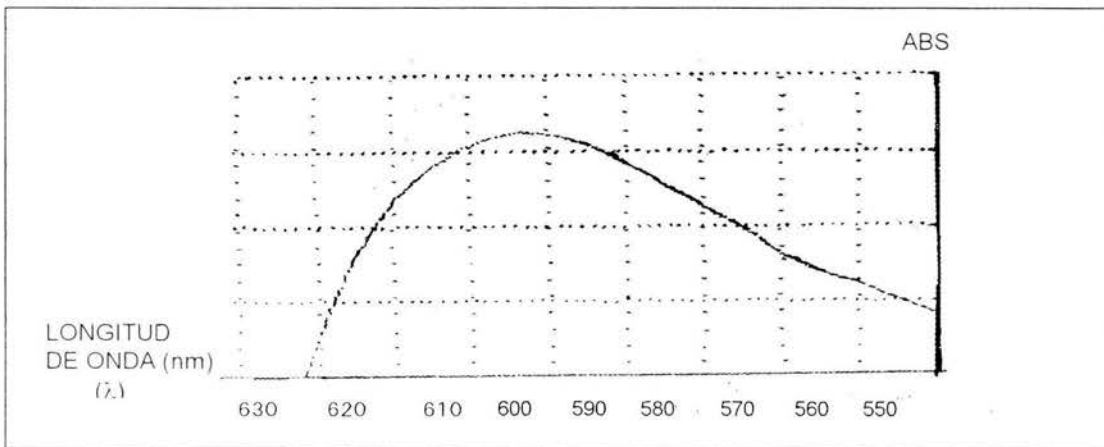


Grafico. 1 Curva que muestra el máximo de absorbancia a 595nm (haciendo reaccionar solución estándar de alcohol etílico 100mg/dl. con solución dicromato de potasio)

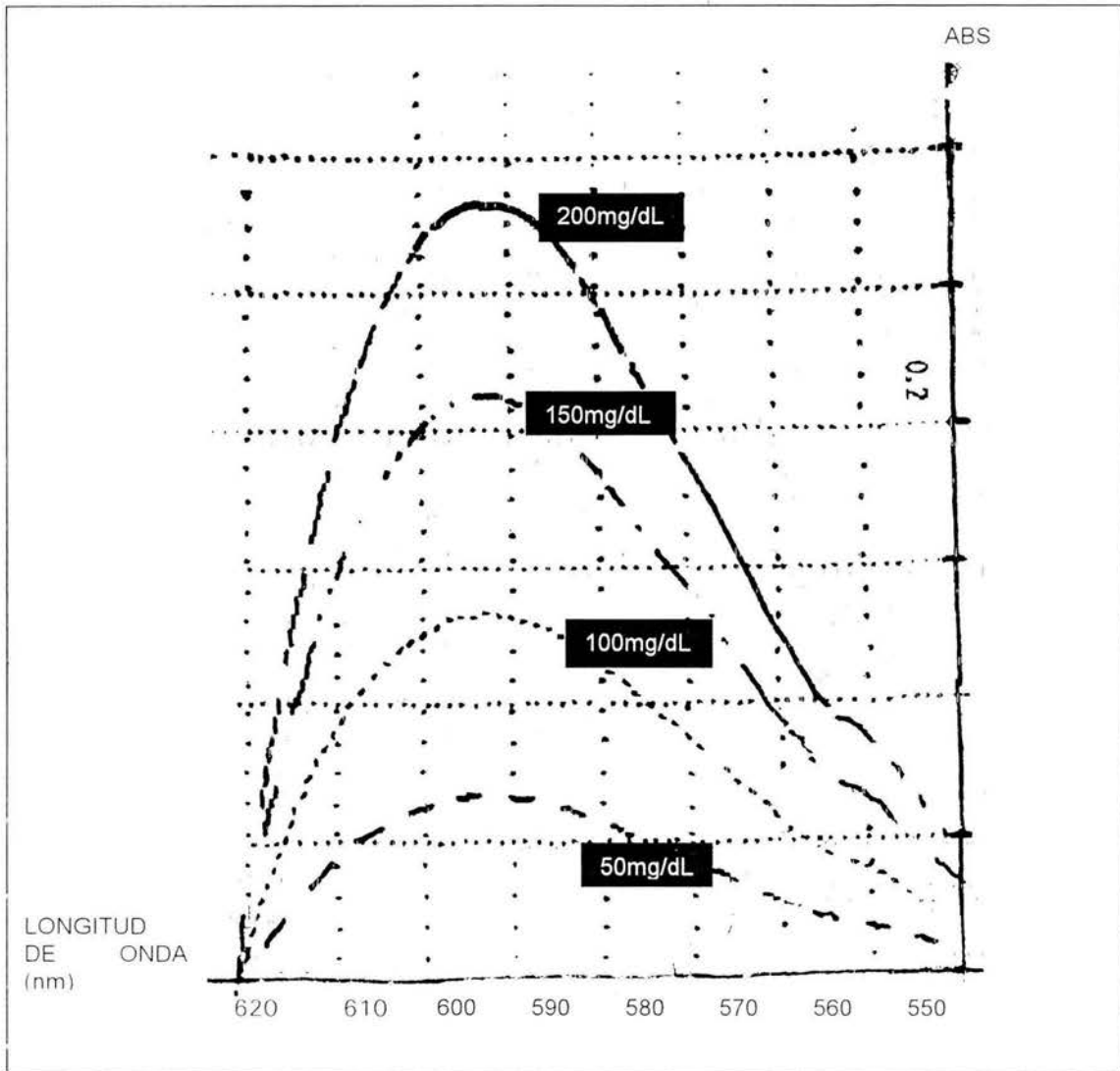


Grafico 2. Curvas que muestran el máximo de absorbancia (595nm), de abajo hacia arriba (soluciones 50, 100, 150 y 200 mg/dL de alcohol etílico/ con dicromato de potasio)



b) Correlación concentración vs absorbancia

Los datos obtenidos anteriormente se sometieron a regresión lineal y se determinó su linealidad a través de estadígrafo de contraste t_{Student} Y ANADEVIA

CORRELACION DE LA CONCENTRACION-ABSORBANCIA

CONC. (mg/mL)	ABS	λ
50	0.067	596.4
100	0.134	594.4
150	0.214	594.0
200	0.285	594.4

$$\bar{X} = 594.8$$

$$y = m x + b + E_{ij}$$

pendiente $m = \underline{\underline{0.00147}}$

intercepto $b = \underline{\underline{-0.00850}}$

Inferencia estadística.

$$H_0: b = 0$$

$$H_a: b \neq 0$$

Estadígrafo de contraste : t_{Student}

$$t = \frac{b - B}{S_{b \cdot B}}$$

$$S_{b \cdot B} = \sqrt{\frac{1}{n} \cdot \frac{x^2}{(n-1) \left(S_y^2 \right)}}$$

$$S_{b \cdot B} = \sqrt{\frac{(n-1)(S_y^2 - m^2 S_x^2)}{n-2}}$$

$$t_{\text{CALC } b} = -1.8482629$$

$$t_{\text{TABLAS}} = 2.042$$

$$S_{x/y} = 0.003755 \quad \text{ERROR TIPICO}$$

Criterio de aceptación. $t_{\text{CALC}} < t_{\text{TABLAS}}$

Intervalo de confianza. =

$$0.00939098 + b = \underline{\underline{0.00089}}$$

$$0.00939098 - b = \underline{\underline{-0.01789}}$$

$$\text{Intervalo de confianza : } -0.01789 < b < 0.00089$$

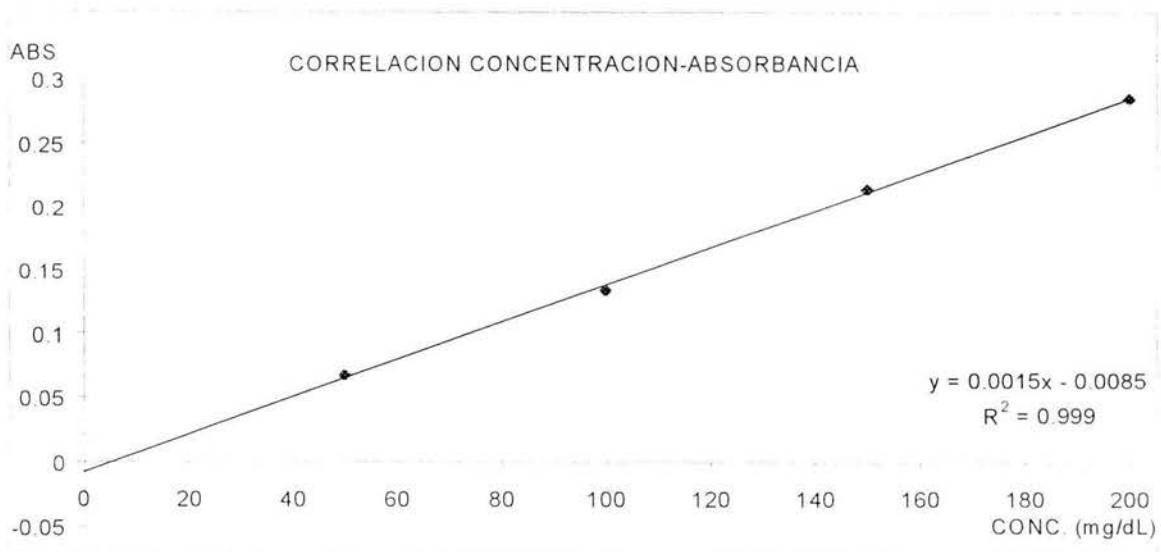


Gráfico 3 Correlación concentración vs Absorbancia.

**c) Verificación de equipos-estufa.**

ANADEVA PARA LA REGRESION

Ho= $F_{calc} < F_{tabl}$ (y no depende linealmente de x)Ha= $F_{calc} > F_{tabl}$ (y si depende linealmente de x)

x	yi	\hat{y}_i	$(y_i - \bar{y})^2$	$(\hat{y}_i - \bar{y})^2$
50	0.067	0.06490	0.01166	0.01212
100	0.134	0.13830	0.00168	0.00135
150	0.214	0.21170	0.00152	0.00135
200	0.285	0.28510	0.01210	0.01212
y=	0.17500	SC_{tot} =	0.02697	0.02694 = SC_{exp}

m= 0.00147

b= -0.0085

$S_{inexp} = 0.00003$

$S^2_{exp} = 0.00269378$

$S^2_{inexp} = 0.00003$

$F_{calc} = 95.52411$

$F_{tab} = 9.28$

Se realizó la verificación de la temperatura interior de la estufa, colocando 10 termómetros en el interior de esta, distribuidos en sus dos niveles cinco en la parte superior apuntando con los bulbos uno hacia cada esquina y otro mas en el centro, al igual que en el nivel inferior, unas vez obtenidas las lecturas se graficaron obteniéndose los siguientes resultados.



TIEMPO (min)	TEMPERATURA (°C)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
5	39	37	41	36	40	39	32	36	35	38
10	52	53	53	49	50	50	52	54	51	54
15	51	52	50	51	47	50	51	56	52	53
20	52	52	53	50	49	50	53	55	51	54
25	50	52	49	48	46	50	52	53	51	52
30	50	54	54	54	49	51	50	56	54	51
35	50	52	48	48	47	51	54	54	53	52
40	54	53	52	49	52	53	50	56	52	51
45	52	51	53	49	49	54	51	55	52	51
55	51	54	53	49	52	55	51	55	53	52
65	51	52	53	50	50	54	51	57	54	52
75	49	54	54	54	50	53	51	52	54	51

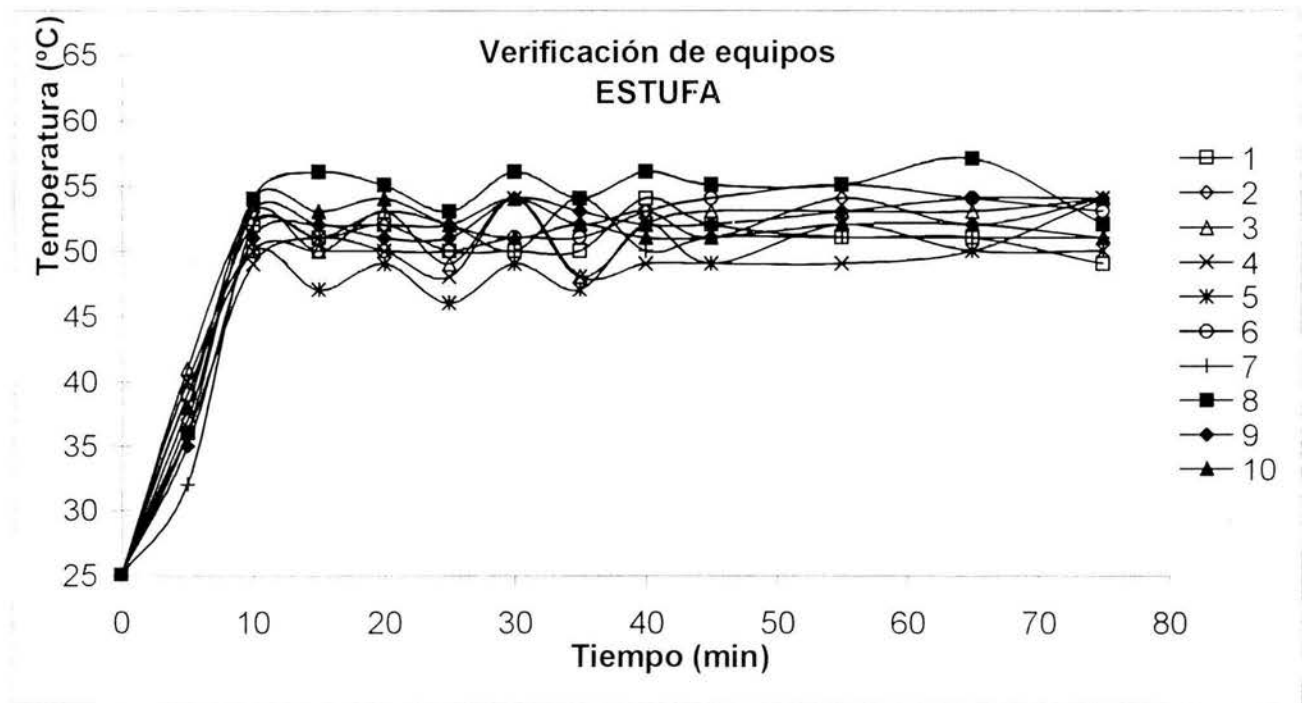


Grafico 4. Variación de Temperatura en la estufa



d) Validación.

I. Linealidad del Sistema.

Se determinó construyendo una curva de calibración (concentración vs. respuesta medida) utilizando 4 diluciones preparadas a partir de una misma solución patrón y haciendo análisis por triplicado para cada dilución.

El intervalo entre las concentraciones a analizar dependió del propósito del método, por lo que se utilizó 100 mg/dL como el punto medio de la curva.

LINEALIDAD DEL SISTEMA

CONCENTRACION. (mg/mL)	ABSORBANCIA		
	A ₁	A ₂	A ₃
50	0.084	0.083	0.083
100	0.178	0.182	0.184
150	0.265	0.266	0.270
200	0.347	0.346	0.347

$$y = m x + b + E_{ij}$$

pendiente $m = \underline{\underline{0.00175}}$
intercepto $b = \underline{\underline{0.00072}}$

Inferencia estadística.

Ho: b = 0

Ha: b ≠ 0

Estadígrafo de contraste: t_{Student}

$$t = \frac{b - B}{S \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{x^2}{\sum x^2}}}$$

$$t_{\text{CALC}} = 0.191181255$$

$$t_{\text{TABLAS}} = 2.042$$

$$S_{x/y} = 0.005343 \quad \text{ERROR}$$

Criterio de aceptación. $t_{\text{CAL}} < t_{\text{TABLAS}}$

Intervalo de confianza. =

$$0.00771524 + b = \underline{\underline{0.00844}}$$

$$0.00771524 - b = \underline{\underline{-0.00699}}$$

$$\text{Intervalo de confianza: } -0.00699 < b < 0.00844$$

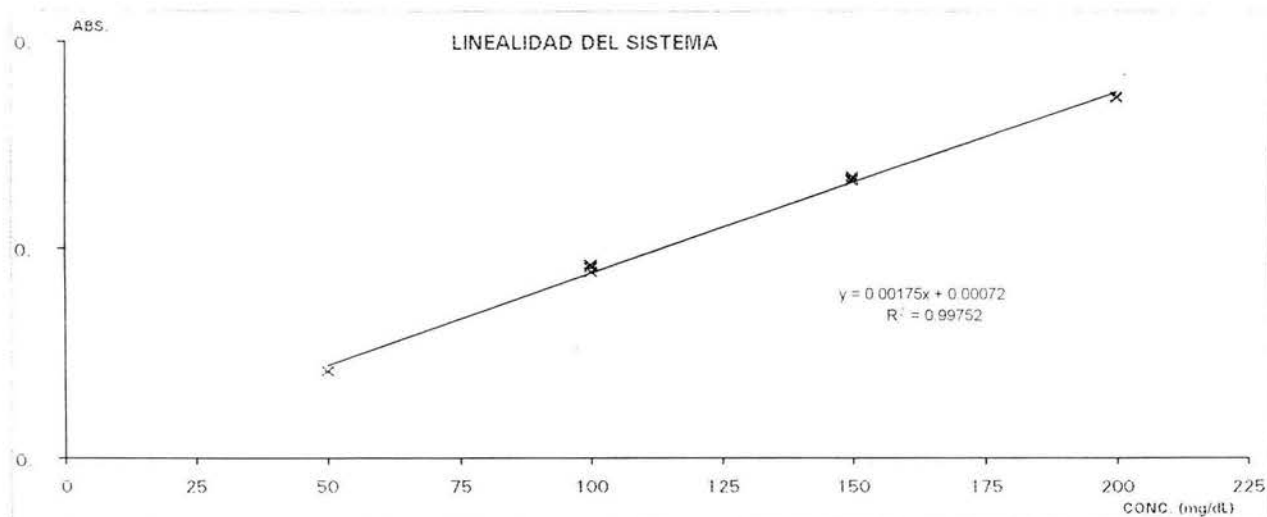


Gráfico 6. Linealidad del sistema



ANAVEVA PARA LA REGRESION

$H_0 = F_{\text{calc}} < F_{\text{tabl}}$ (y no depende linealmente de x)

$H_a = F_{\text{calc}} > F_{\text{tabl}}$ (y si depende linealmente de x)

x	y_i	\hat{y}_i	$(y_i - \bar{y})^2$	$(y_i - \hat{y}_i)^2$
50	0.084	0.08829	0.01840	0.01725
50	0.083	0.08829	0.01858	0.01725
50	0.083	0.08829	0.01867	0.01725
100	0.178	0.17586	0.00173	0.00192
100	0.182	0.17586	0.00144	0.00192
100	0.184	0.17586	0.00125	0.00192
150	0.265	0.26342	0.00209	0.00192
150	0.266	0.26342	0.00215	0.00192
150	0.270	0.26342	0.00250	0.00192
200	0.347	0.35099	0.01631	0.01725
200	0.346	0.35099	0.01588	0.01725
200	0.347	0.35099	0.01631	0.01725
$\bar{y} =$	0.21964	$SC_{\text{tot}} =$	0.11530	0.11502 = SC_{exp}

$$m = 0.00175$$

$$b = 0.0007222222$$

$$S_{\text{inexp}} = 0.00029$$

$$S_{\text{exp}}^2 = 0.011501882$$

$$S_{\text{inexp}}^2 = 0.00029$$

$$F_{\text{calc}} = 40.28576$$

$$F_{\text{tab}} = 9.28$$

Criterio de Aceptación.

$$C.V. \leq 1.50 \%$$

$$r \geq 0.99$$

$$r^2 \geq 0.98$$

$$t_{\text{calc}} < t_{\text{tab}}$$

$$F_{\text{calc}} > F_{\text{tab}}$$

**II. Precisión del Sistema.**

Se determinó por el análisis por triplicado de tres diferentes soluciones estándar correspondiente a la concentración de interés en la linealidad del sistema (100 mg/dL).

Criterio de Aceptación.

$$C.V. \leq 1.50 \%$$

$$t_{\text{calc}} < t_{\text{tab}}$$

PRECISION DEL SISTEMA

		x	y		
		Conc. (mg/mL)	Conc.	Media y	Desv.Est. y
Estándar	1	100	101.415	101.2033	1.3133
		100	101.224		
		100	99.321		
2	2	100		C.V.	CRITERIO
		100	101.415	1.2977	C.V. < 2.5
		100	102.176		
3	3	100	100.844	n= 9	
		100	99.511	Intervalo de confianza	
		100	101.224	99.780574 - 102.6260581	

Estadigrafo de contraste t_{student}

$$t = \frac{100 - \bar{X}}{s / \sqrt{n}}$$

$$t_{\text{Calc.}} = -2.7487602$$

$$t_{\text{Tab.}} = 2.04$$



III. Linealidad del método.

Se determinó a partir de muestras adicionadas de 4 diferentes concentraciones de la sustancia de interés, cada uno de manera independiente, haciendo los análisis por triplicado.

Las concentraciones de las muestras adicionadas fueron las adecuadas para que, las concentraciones de las soluciones finales se localizaran dentro del intervalo de la linealidad del sistema. El análisis se llevó a cabo por un mismo analista en las mismas condiciones de operación.

LINEALIDAD DEL METODO

Concentración Adicionada	Concentración recuperada (mg/dL)		
	1	2	3
50	46.409	47.551	47.741
100	103.699	101.224	103.508
150	151.853	150.901	149.378
200	199.055	197.532	198.484

$$b = -0.5393$$

$$m = 1.0025$$

$$r = 0.9991$$

$$r^2 = 0.9983$$

$$x = 125$$

$$y = 124.77795$$

Inferencia Estadística para: pendiente (m) e intercepto (b).

$$H_0: m = 1$$

$$H_a: m \neq 1$$

$$H_0: b = 0$$

$$H_a: b \neq 0$$

Estadígrafo de contraste t_{student}

$$t = \frac{b - B_0}{S_{b \dots} \left(\frac{\sqrt{\frac{1}{n} + \frac{-2}{x}}}{(n-1)(S_x^2)} \right)}$$

$$t = \frac{m - m_0}{S_{m \dots} \left(\frac{\sqrt{\frac{1}{n} + \frac{-2}{x}}}{(n-1)(S_x^2)} \right)}$$

$$S_{b \dots} = \sqrt{\frac{(n-1)(S_y^2 - m^2 S_x^2)}{n-2}}$$

$$S_{x/y} = 2.540927$$

ERROR TIPICO

$$t_{\text{cal } m} = 0.00020$$

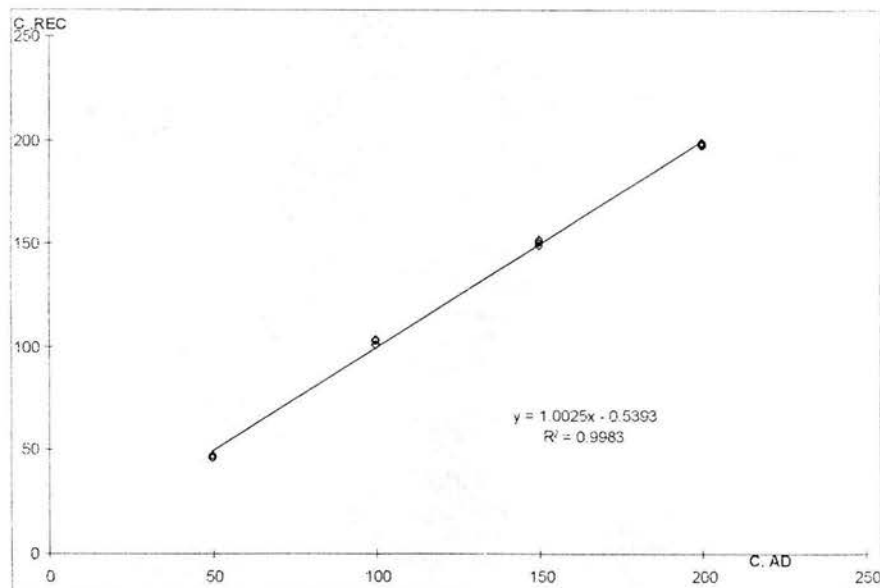
$$t_{\text{cal } b} = -0.04296$$

CRITERIO DE ACEPTACIÓN

$$t_{\text{tab } m} = 2.0555$$

$$t_{\text{tab } b} = 2.0555$$

$$t_{\text{cal}} < t_{\text{tab}}$$





ANADEVA PARA LA REGRESION

Ho= Fcalc < Ftabl (y no depende linealmente de x)

Ha= Fcalc > Ftabl (y si depende linealmente de x)

x	yi	xi	(yi - \bar{y}) ²	(yip - \bar{y}) ²
50	46.4091	49.5876	6141.6785	5653.5859
50	47.5511	49.5876	5963.9902	5653.5859
50	47.7414	49.5876	5934.6290	5653.5859
100	103.6988	99.7145	444.3317	628.1762
100	101.2245	99.7145	554.7666	628.1762
100	103.5084	99.7145	452.3920	628.1762
150	151.8526	149.8414	733.0345	628.1762
150	150.9009	149.8414	682.4087	628.1762
150	149.3783	149.8414	605.1750	628.1762
200	199.0547	199.9683	5517.0343	5653.5859
200	197.5320	199.9683	5293.1579	5653.5859
200	198.4837	199.9683	5432.5373	5653.5859
\bar{y} =	124.77795		SC _{tot} = 37,755.13579	37690.57268 = SC _{exp}

m= 1.00254
b= -0.539271666

S_{inexp}= 64.56311
S²_{exp}= 3769.05727
S²_{inexp}= 64.56311
F_{calc}= 58.37788
F_{tab}= 9.28

Criterio de Aceptación.

Cantidad Adicionada vs Cantidad Recuperada:

$$m = 1$$

$$b = 0$$

$$r^2 \geq 0.98$$

$$t_{calc} < t_{tab}$$

$$F_{calc} > F_{tab}$$

**IV. Exactitud y Repetibilidad al 100%.**

Se determinó con, 3 controles de muestras adicionadas de manera independiente con la cantidad necesaria de la sustancia de interés para obtener la concentración del 100%, utilizando el método propuesto. El análisis se realizó por triplicado, en las mismas condiciones de operación y por el mismo analista.

EXACTITUD

		Conc. (mg/mL)	Conc. Rec.	Media y	Desv. Est. y
Estándar	1	100	100.463	101.0976	1.0682
		100	99.702		
		100	101.034		
	2	100	100.653	1.0566	CRITERIO C.V. < 2.5
		100	103.318		
		100	100.653		
	3	100	100.463	Intervalo de 99.9403261 - 102.2548268	n= 9
		100	101.986		
		100	101.605		

Estadígrafo de contraste $t_{Student}$

$$t = \frac{100 - \bar{X}}{\sigma / n^{1/2}}$$

$$t_{calc.} = 3.08$$

$$t_{Tab.} = 2.04$$

Criterio de Aceptación.

El porcentaje recuperado y el C.V. deberán estar de acuerdo con la siguiente tabla:

MÉTODO	PROMEDIO DE RECOBRO	C.V.
Cromatográfico	98 - 102 %	≤ 2 %
Titrimétricos	98 - 102 %	≤ 2 %
Químicos y Espectrofotométricos	98 - 103 %	≤ 3 %
Microbiológicos	98 - 105 %	≤ 5 %

Criterio de aceptación de coeficientes de variación para diferentes métodos.

**V. Precisión (reproducibilidad.)**

Se determinó con una muestra homogénea de producto igual 100mg/dL, realizada por dos analistas en dos diferentes días y por triplicado.

Criterio de aceptación, el C.V. total debe cumplir con los siguientes criterios.

MÉTODO	C.V.
Cromatográficos	2 %
Químicos y Espectrofotométricos	3 %
Microbiológicos	5 %

Criterio de aceptación de coeficientes de variación para diferentes métodos.

$$F_{\text{calc}} < F_{\text{tab}}$$

PRECISIÓN (REPRODUCIBILIDAD)

		ANALISTA		
		1	2	
DIA	1	Conc. (mg/mL)		
			102.747	101.034
			101.605	101.034
		99.511	98.369	
	2		101.986	99.131
			100.463	99.321
		101.415	101.795	

ANAdEVA					
F. Variación	g.l.	S.C.	M.C.	F _{calc}	F _{tablas}
Analista	1	4.1328	4.1328	2.1029	4.032
Día	1	0.0060	0.0060	0.0031	4.032
Analista-Día	1	0.0030	0.0030	0.0015	2.576
Error	8	15.7221	1.9653		

**VI. Límite de Detección y Límite de cuantificación.**

Se determinó realizando corridas a 0 mg/dL de alcohol etílico, determinando el doble la mínima señal de ruido detectable como el límite de detección.

Para el límite de cuantificación se prepararon estándares diluidos 2:1, a partir de la concentración de 50mg/dL, tomando como criterio de aceptación un C.V. menor al 3%.

LIMITE DE DETECCION						
Conc mg/dl	Abs	Conc(mg/dl) recuperada				
		Detección	Cuantificación			
0	0.020	11.4199	-	X=	0.0190	10.8489
0	0.020	11.4199	-	D.E. =	0.00110	0.62549
0	0.018	10.2779	-	C.V. =	5.7655	5.7655
0	0.018	10.2779	-			
0	0.020	11.4199	-			
0	0.018	10.2779	-			
25	0.045	-	25.2823	X=	0.0460	25.8533
25	0.046	-	25.8533	D.E. =	0.00126	0.72226
25	0.047	-	26.4243	C.V. =	2.7498	2.7937
25	0.045	-	25.2823			
25	0.048	-	26.9953			
25	0.045	-	25.2823			



19. DESARROLLO DEL MÉTODO DE ANÁLISIS EN FLUIDOS BIOLÓGICOS.

Antes de iniciar el estudio fue necesario contar con el método analítico validado para poder cuantificar el alcohol etílico en sangre, orina y saliva.

Los materiales para el almacenamiento de las muestras y los que se utilizaron durante el procedimiento de análisis fueron nuevos, limpios y se identificaron de acuerdo a procedimientos de operación previamente aprobados.

El método cumplió con los siguientes criterios:

1. Linealidad
2. Exactitud
3. Precisión
4. Reproducibilidad
5. Especificidad
6. Limite de detección
7. Limite de cuantificación

Se utilizaron tres sujetos de experimentación, controlando un ayuno de mínimo 8 horas, de peso y edad aproximados.

Se administró una dosis de alcohol etílico de 0.8g de alcohol etílico/kg peso de una bebida alcohólica preparada con ron como se muestra en el siguiente cuadro:

	Sujeto 1 (E)	Sujeto 2 (G)	Sujeto 3 (S)
Peso corporal	93.75 kg	75.00 kg	92.50 kg
Talla	1.74 m	1.72 m	1.85 m
Experiencia bebedora	Bebedor social bajo	Bebedor social alto	Bebedor social moderado
Dosis (alcohol etílico)	75 g	60 g	74 g
Volumen de Ron	260 ml	208 ml	256 ml
7 tragos (ml Ron/Vaso) diluido a 30% v/v con refresco de toronja.	37.1 ml	21.7 ml	36.6 ml

La administración se realizó dividiendo la dosis total de Ron en 7 tragos de los volúmenes antes mencionados, cada trago fue administrado en lapsos de 10 minutos controlando así la velocidad de ingesta.

A los intervalos mencionados en el procedimiento se tomaron muestras de orina, saliva y sangre, obteniendo los siguientes resultados.



RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS DE SANGRE

SUJETO 1

: ERNESTO

SUJETO 2: EDGAR

SUJETO 3: SALVADOR

TIEMPO min.	SUJETO 1	SUJETO 2	SUJETO 3
CONCENTRACIÓN (mg/dL)			
0	0.000	0.000	0.000
30	49.835	28.137	49.264
60	85.808	60.113	67.536
90	108.076	73.817	85.808
120	96.657	64.681	81.240

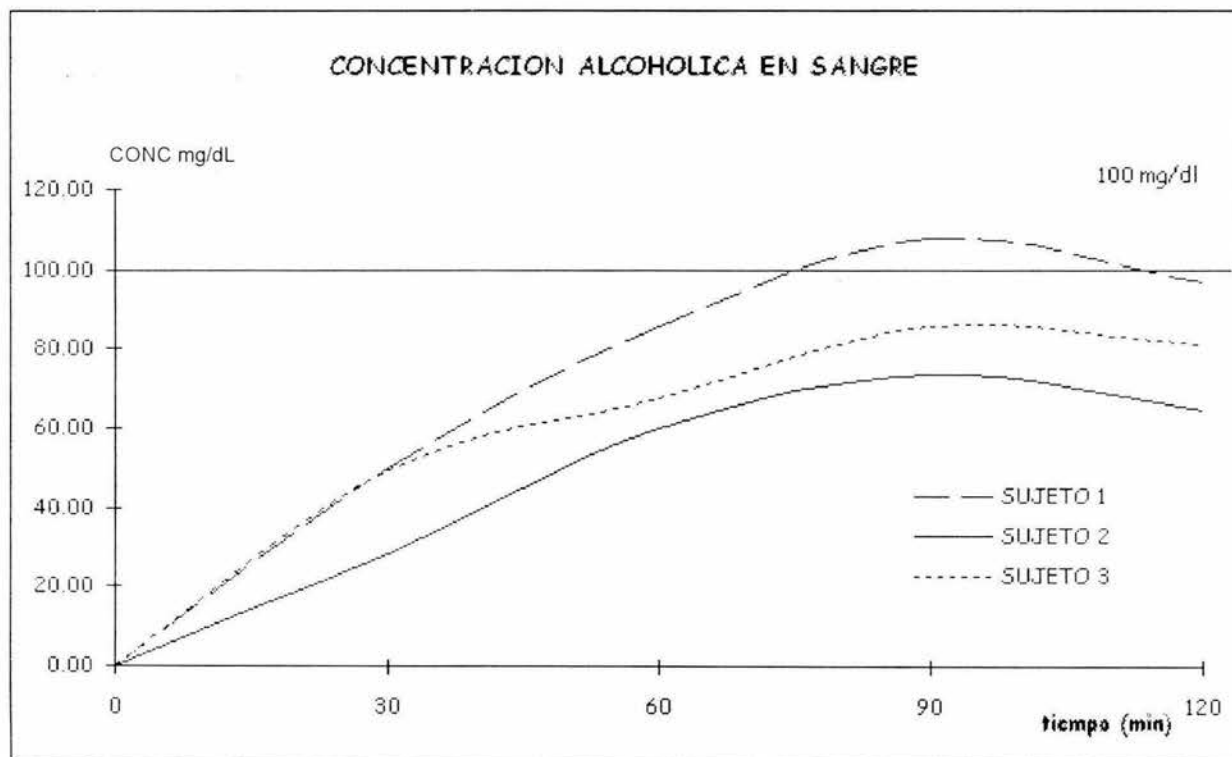


Gráfico 8. En el que se representa el seguimiento de la concentración alcohólica sanguínea.



RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS DE ORINA

TIEMPO Min.	CONCENTRACIÓN (mg/dL)		
	SUJETO 1	SUJETO 2	SUJETO 3
0	0.000	0.000	0.000
15	0.000	0.000	0.000
30	16.717	11.578	25.853
45	51.548	50.977	68.107
60	79.527	61.255	86.950
75	84.666	77.243	92.089
90	102.366	82.382	95.515
105	112.644	64.681	100.082
120	110.360	62.397	98.369
160	104.650	56.687	101.795

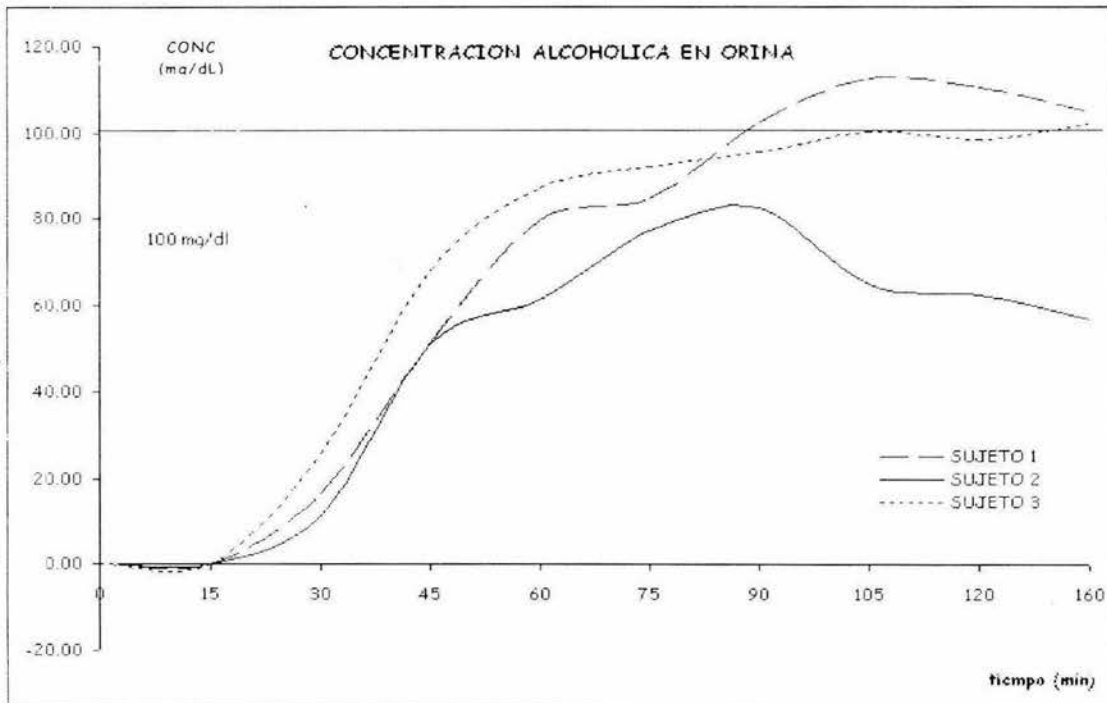


Gráfico 9. En el que se representa el seguimiento de la concentración alcohólica en orina.



RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS DE SALIVA

TIEMPO min.	CONCENTRACIÓN (mg/dL)		
	SUJETO 1	SUJETO 2	SUJETO 3
0	0.000	0.000	0.000
15	266.813	47.551	178.880
30	177.167	112.644	105.792
45	179.451	41.841	84.666
60	156.611	40.699	131.487
75	88.092	18.430	138.339
90	117.212	16.717	64.110
105	89.805	16.146	38.415
120	66.965	11.007	65.823
135	52.690	8.724	39.557
160	33.847	7.582	33.847

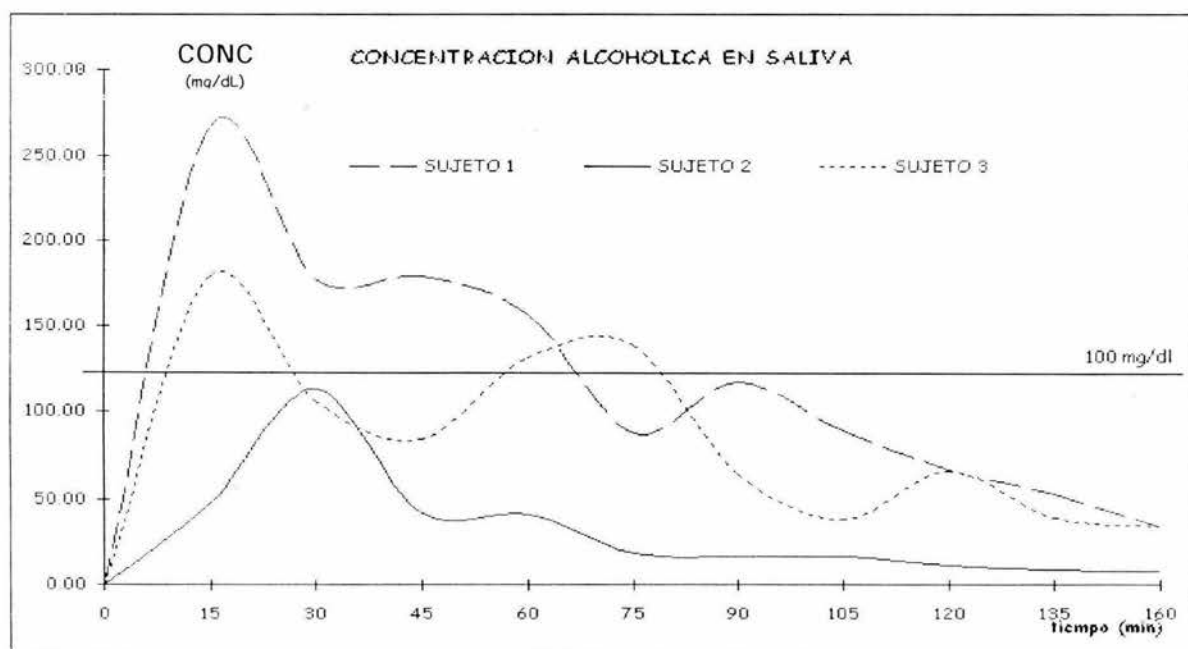


Gráfico 10. En el que se representa el seguimiento de la concentración alcohólica en saliva.



RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS DE LOS TRES FLUIDOS POR SUJETO

SUJETO 1: ERNESTO

TIEMPO min.	FLUIDO		
	ORINA	SALIVA	SANGRE
0	0.000	0.000	0.000
30	16.717	177.167	49.835
60	79.527	156.611	85.808
90	102.366	117.212	108.076
120	110.360	66.965	96.657

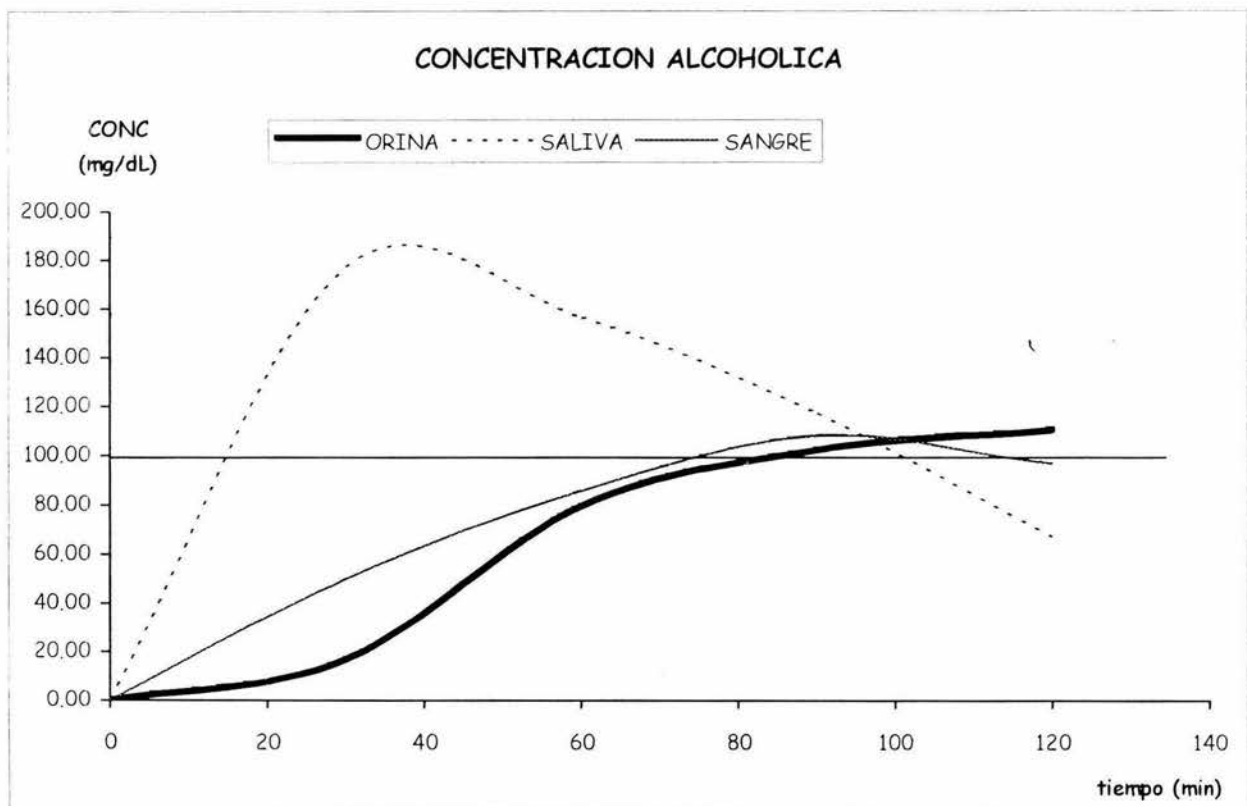


Gráfico 11. En el que se representa el seguimiento de la concentración alcohólica en los diferentes fluidos sujeto 1.



SUJETO 2: EDGAR

TIEMPO min.	FLUIDO		
	ORINA	SALIVA	SANGRE
0	0.000	0.000	0.000
30	30.992	112.644	28.137
60	85.808	40.699	57.829
90	70.391	16.717	73.817
120	62.397	11.007	64.681

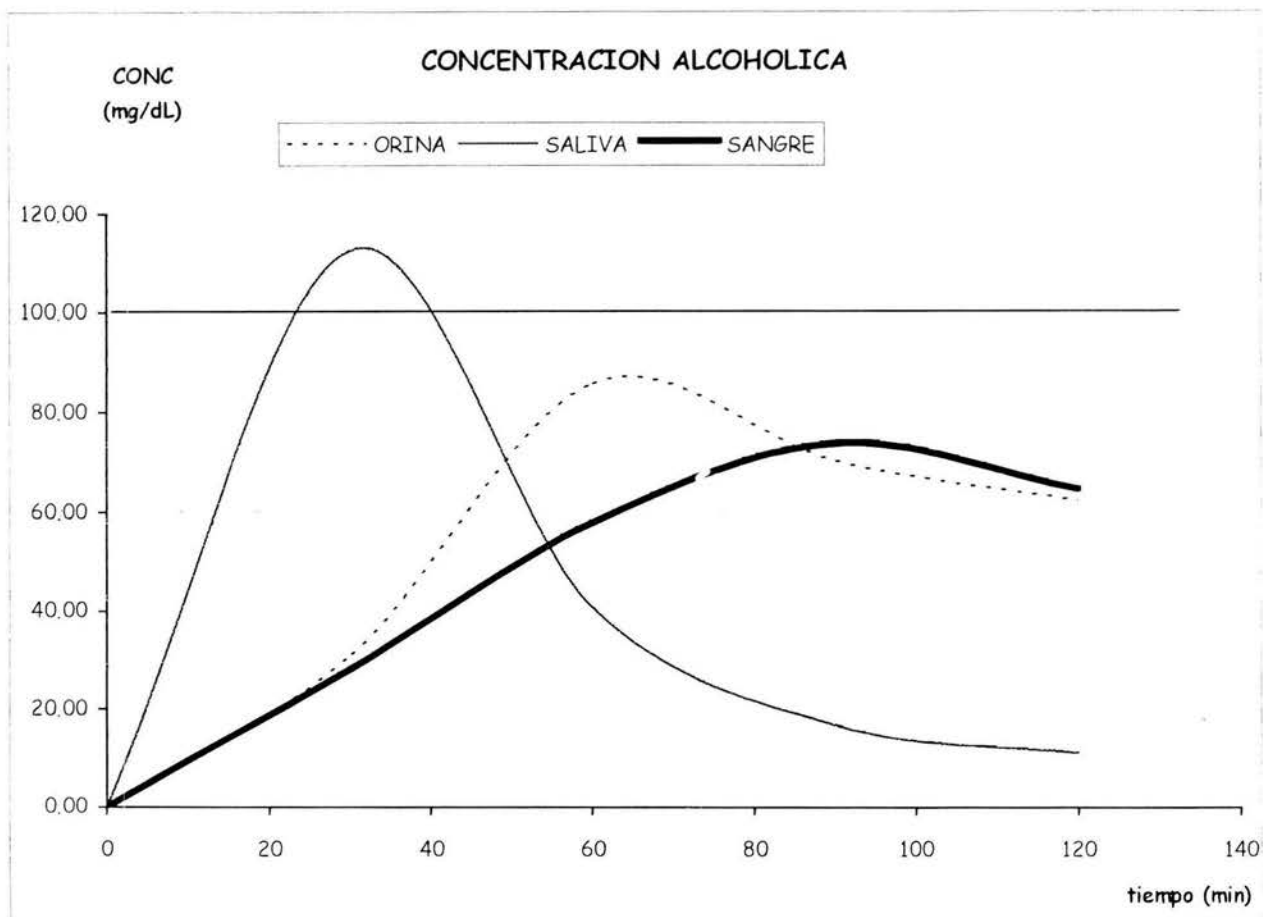


Gráfico 12. En el que se representa el seguimiento de la concentración alcohólica en los diferentes fluidos sujeto 2



SUJETO 3: SALVADOR

TIEMPO min.	FLUIDO		
	ORINA	SALIVA	SANGRE
0	0.000	0.000	0.000
30	57.258	105.792	49.264
60	92.660	131.487	67.536
90	151.462	64.110	85.808
120	127.490	65.823	93.802

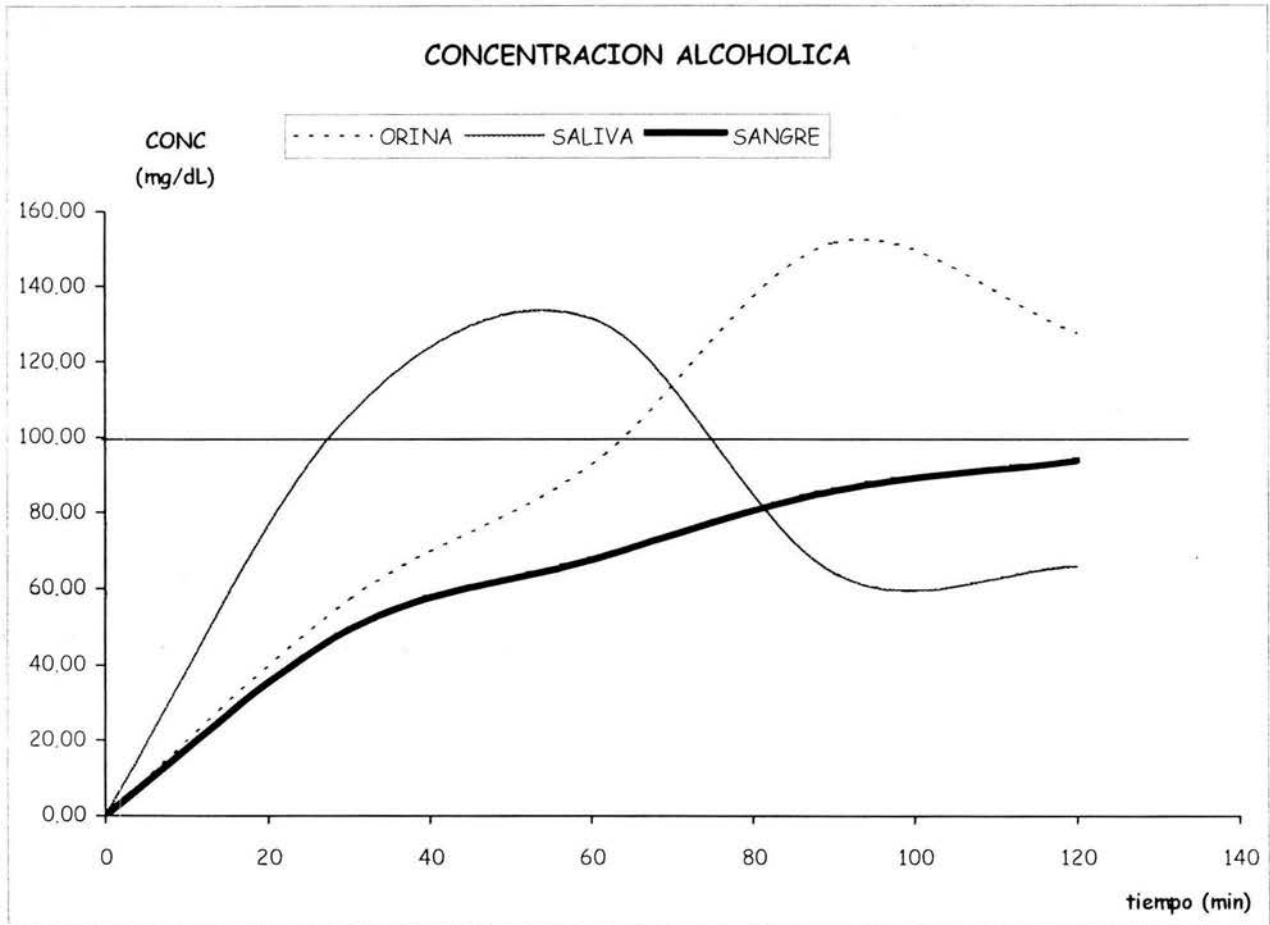


Gráfico 13. En el que se representa el seguimiento de la concentración alcohólica en los diferentes fluidos sujeto 3.



RESULTADOS DEL ESTUDIO DE CORRELACIÓN, SANGRE/ORINA.

CORRELACION SANGRE vs ORINA

TIEMPO min.	SUJETO 1		SUJETO 2		SUJETO 3	
	ORINA	SANGRE	ORINA	SANGRE	ORINA	SANGRE
30	16.717	49.835	30.992	28.137	57.258	49.264
60	79.527	85.808	85.808	57.829	92.660	67.536
90	102.336	108.076	70.391	73.817	151.462	85.808
120	110.360	96.657	62.397	64.681	127.490	93.802

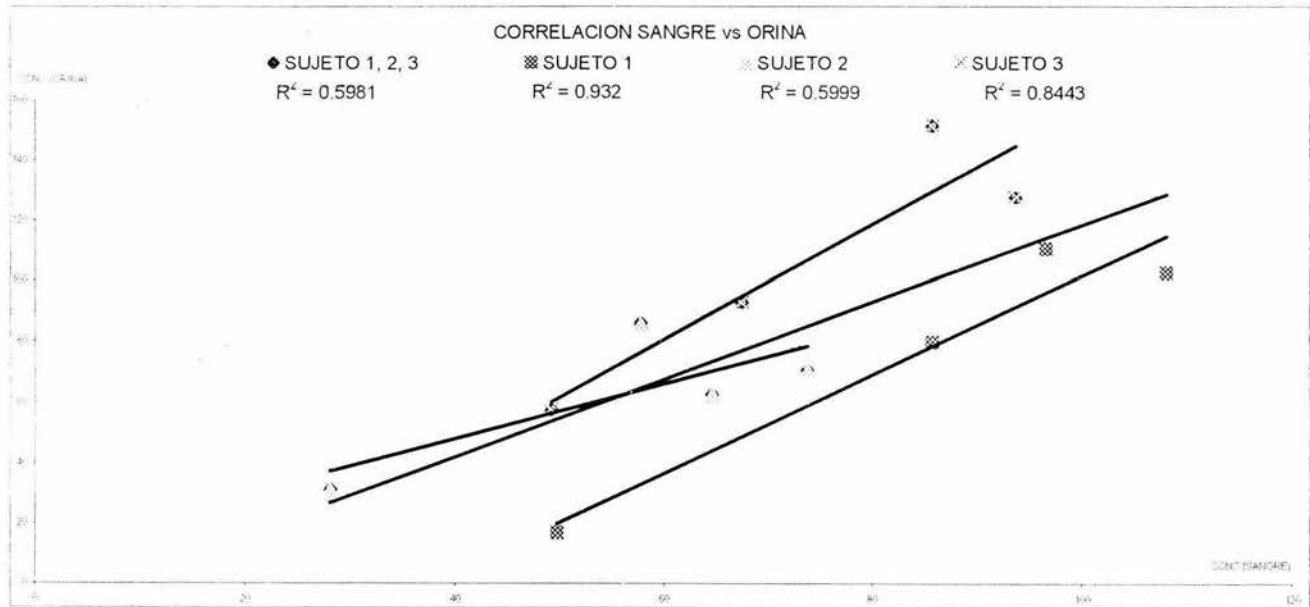


Gráfico 14. En el que se representa la correlación de etanol en los fluidos sangre/orina.



RESULTADOS DEL ESTUDIO DE CORRELACIÓN, SANGRE/SALIVA.

CORRELACION SANGRE vs SALIVA

TIEMPO min.	SUJETO 1		SUJETO 2		SUJETO 3	
	SALIVA	SANGRE	SALIVA	SANGRE	SALIVA	SANGRE
30	177.167	49.835	112.644	28.137	105.799	49.264
60	156.611	85.808	40.699	57.829	131.487	67.536
90	117.212	108.076	16.717	73.817	64.110	85.808
120	66.965	96.657	11.007	64.681	65.823	93.802

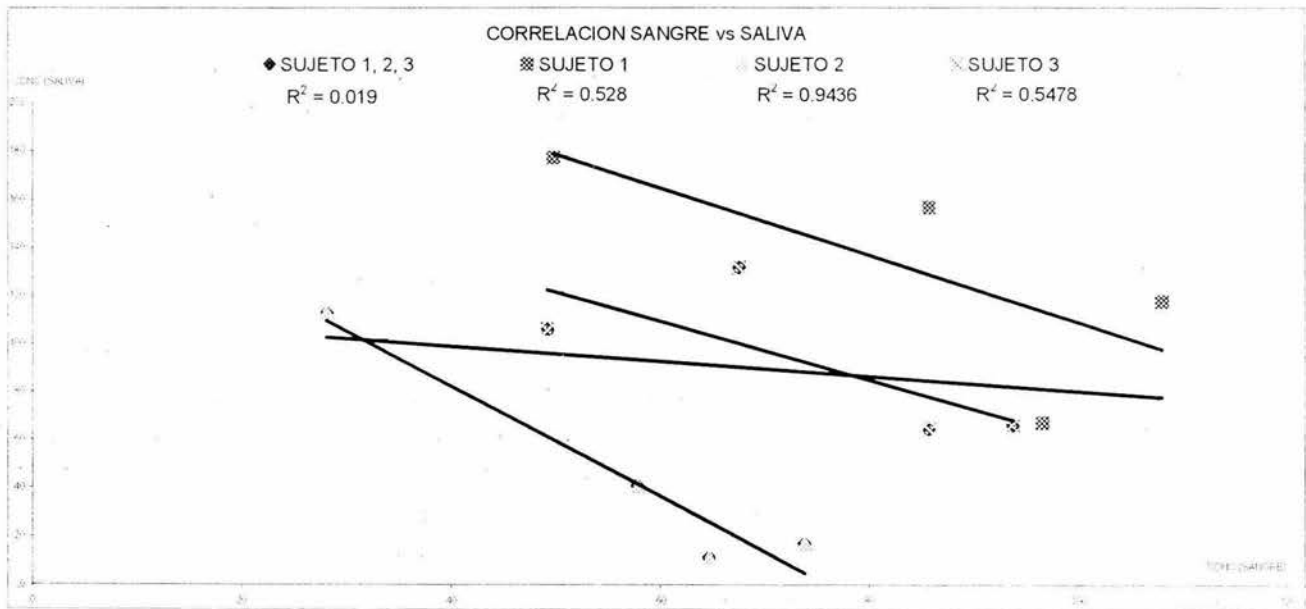


Gráfico 15. En el que se representa la correlación de etanol en los fluidos sangre/saliva.



20. ANÁLISIS DE RESULTADOS.

De acuerdo con las gráficas obtenidas en el barrido realizado se observó respuesta en la región de 540 a 620 nm con un máximo a 595 nm tanto para la solución estándar de 100mg/dL, como para las para las demás soluciones 50, 150, 200 mg/dL de alcohol etílico/dicromato de potasio, quedando establecida esta lectura como el punto máximo de absorbancia.

Una vez obtenido este punto, se demuestra la dependencia conc vs absorbancia mediante la curva estándar realizada y el análisis estadístico con el fin de verificar la linealidad.

Los datos estadísticos y gráficas realizadas, muestran una proporcionalidad entre la concentración vs absorbancia. El análisis de varianza demuestra que la absorbancia depende linealmente de la concentración en el intervalo de 50 a 200 mg/dL el cual es el intervalo de importancia para la finalidad del estudio en cuestión.

Una vez realizado el estudio estadístico se comenzó con las pruebas para el ensayo de micro difusión de Conway, pues el objetivo consiste en determinar el contenido de alcohol etílico en muestras biológicas por lo que la prueba es imposible realizarla en tubo de ensaye, así que se comenzó por certificar los equipos que se emplearían para el ensayo así como el diseño de las cámaras de difusión.

La calibración del espectrofotómetro Campsec M301 se realizó con una solución estándar de dicromato de potasio en solución acuosa observando el pico de máxima absorbancia en la región esperada.

Una vez diseñadas las cajas se procedió a realizar el ensayo en ellas, empleando la técnica descrita anteriormente, conjuntamente se montaban una prueba en tubo de ensaye y otra en la cámara empleando las mismas soluciones tanto de dicromato como de alcohol etílico, se comparaban las absorbancias de ambas reacciones para verificar la reacción de difusión, encontrando mucha variación entre ambas lecturas, por lo que se decidió ha sellar la parte externa de la cámara con agua para evitar fugas, pero seguía existiendo variación, como la técnica es por difusión se tomo en cuenta la difusión que existía no solo hacia la solución de dicromato de potasio sino también hacia el agua que sellaba la cámara, por lo que se empleo en su lugar solución saturada de carbonato de potasio, al mismo tiempo se planeo acortar los tiempos de incubación de mas de 4 horas a temperatura ambiente, por lo que se decidió utilizar calor.

Se comenzó por certificar una estufa, colocando termómetros en diferentes puntos en el interior del equipo, verificando que no existiesen puntos fríos dentro de esta o en su defecto en que regiones existe poca variación en la temperatura.



Se procedió con los ensayos, determinando la reacción de estándares inicialmente a 80°C durante una hora, obteniendo gran variación en los resultados debido a que el material de las cámaras se deformaba, por lo que fue necesario disminuir la temperatura y aumentar el tiempo de incubación. Finalmente, se estandarizó una temperatura de 50°C durante 90 minutos, en estas condiciones la variación de absorbancia entre la prueba en tubo y la cámara se considero en no más 0.001nm.

De esta manera se procedió a la validación del método diseñado, realizando pruebas por triplicado para estándares de alcohol etílico desde 50 a 200 mg/dL, encontrándose precisión del sistema pues los estudios estadísticos muestran un coeficiente de variación menor a 1.5% (C.V. = 1.2977%), así como una $t_{calc} < t_{tab}$ por lo que podemos decir que el sistema es preciso.

La linealidad del método demuestra que la pendiente y la ordenada al origen son estadísticamente significativas a los valores de 1 y 0 respectivamente como lo demuestra la inferencia estadística realizada para cada una de ellas $t_{calc} < t_{tab}$ (0.00020 < 2.0555) y $t_{calc} < t_{tab}$ (-0.0426 < 2.0555). De la misma manera se muestra que en el método existe una dependencia lineal entre la cantidad adicionada y la cantidad recuperada esto a través del ANADEVA realizado para este.

En la exactitud y repetibilidad al 100% se observa que el C.V. es menor a 1.5% (1.0566) y que la inferencia estadística utilizando $t_{student}$ muestra que el método es exacto y repetible, $t_{calc} < t_{tab}$ (3.08 < 2.04).

En la reproducibilidad se trabajó de la misma manera, es decir pruebas por triplicado, en ensayos alternados tanto en horario como en analista, así como con soluciones diferentes preparadas a diferentes tiempos tanto de dicromato como de alcohol etílico, demostrando en los estudios estadísticos que no existe variación por el efecto del analista y el día tal como se demuestra en el ANADEVA realizado: $F_{calc} < F_{tab}$ (2.0129 < 4.032), $F_{calc} < F_{tab}$ (0.0031 < 4.032) y el combinado analista-día $F_{calc} < F_{tab}$ (0.030 < 4.032)

El límite de detección se observa a 10.8489 mg/dL con un C.V. < 6% (5.7655%) y el límite de cuantificación se encontró en los 25.8533 mg/dL con un C.V. < 6% (5.7655%).

Una vez estandarizada la técnica se procedió a realizar ensayos empleando muestras de saliva sangre y orina, de personas que no habían ingerido bebidas alcohólicas esto con el fin de evaluar alguna interferencia con algún componente de estos fluidos ya que la presencia de cualquier agente oxidante podría ocasionar falsos positivos, observando que no hay interferencia alguna.



Durante la evaluación con fluidos biológicos positivos (muestras de saliva, sangre y orina de personas que se les administro bebida alcohólica) se realizaron las determinaciones de la concentración de alcohol etílico presente en las muestras recolectadas, empleando la técnica ya descrita.

Los resultados obtenidos con la técnica implementada muestran que se alcanza una concentración máxima de alcohol etílico en sangre aproximadamente a los 90 min. presentando posteriormente una disminución gradual, este comportamiento se observa claramente en los tres individuos. De la misma manera en la grafica de las muestras de orina se observa un comportamiento similar en los 3 sujetos un gradual aumento de la presencia de alcohol etílico eliminado por vía renal llegando a un máximo y un declinamiento gradual. En tanto que en saliva se observa una mayor variación de las concentraciones etílicas presentes en este fluido.

Como se puede observar en las gráficas, sangre vs. orina existe una mejor correlación entre estos dos fluidos para el individuo 1, no así con los individuos 2 y 3. Al realizar la gráfica empleando los datos de los 3 sujetos se observa una menor correlación que para sus graficas individuales. Estas diferencias se deben a la variación biológica de los sujetos así como a la experiencia bebedora que será discutida mas adelante.

Referente a el análisis de las gráficas cuando se comparan los fluidos sangre vs. saliva, se observa un comportamiento negativo para las pendientes por lo no es posible la correlación entre estos fluidos.



21. CONCLUSIONES:

1. Se logro implementar una técnica colorimétrica para la determinación de alcohol etílico en fluidos biológicos utilizando material de uso común en el laboratorio.
2. Se logró la validación del método analítico propuesto. Observando linealidad y precisión.
3. Se determinaron las concentraciones mínimas detectables y cuantificables.
4. En base a los resultados obtenidos prácticamente en ensayos con fluidos biológicos y comparados con los resultados obtenidos en otros estudios y por otras técnicas de cuantificación, se observó una favorable similitud en estos resultados
5. Se observa una similitud en los niveles máximos de alcohol etílico en los diferentes fluidos entre 60 y 90 minutos.
6. Se trató de verificar la existencia de correlación en el contenido alcohólico entre los diferentes fluidos (saliva-sangre y orina-sangre). Cabe mencionar que el estudio se realizo solo con 3 individuos, y que el coeficiente de correlación obtenido es muy bajo para los datos en conjunto, no así de manera individual, por lo que no existen elementos para afirmar que exista o no correlación real entre los fluidos.
7. La aplicación de este método de análisis en la determinación del grado de alcoholemia resulta económica en comparación. Con otros métodos instrumentales (HPLC y CG).
8. La aplicación de este método de análisis no requiere de la preparación previa de la muestra, ya que no interfieren ninguno de los componentes de la misma por utilizar el alcohol que se escapa de la matriz.



9. Se observa en las graficas de los diferentes fluidos para los individuos de estudio los comportamientos son muy similares y que las variaciones de atribuyen a la variación biológica así como a la experiencia bebedora, por lo que podemos decir que la aplicación de la técnica analítica para este tipo de estudios es útil y conveniente.
10. Las gráficas donde se observa la comparación entre sangre vs orina muestran una correlación similar a la reportada en la bibliografía para cada uno de los sujetos que se modifica por la experiencia bebedora.
11. Es posible aplicar esta técnica analítica a estudios de farmacología donde se utilice un mayor número de individuos considerando la experiencia bebedora con el fin de evaluar la correlación entre diferentes fluidos.



Bibliografía.

- 1) Flores J. Farmacología humana. 2a ed. Ed. Científicas y Técnicas S.A. Barcelona. 1992. pp 419-423
- 2) Bowman W.C. Rand M.J. Farmacología. Bases Bioquímicas y Patológicas: Aplicaciones Clínicas, 2a ed. Ed. Interamericana. México. 1984. pp 8.10-8.14, 42.2-42.21
- 3) Ellerhorn J.M. Barceloux G.D. Medical toxicology, Diagnosis and treatment of human poisoning. Ed. ELSEVIER. USA. 1988. pp 782-797
- 4) Roine RP. Gentry RT. Lim RT. Baraona E. Lieber CS. "Effect of the concentration of ingested ethanol on blood alcohol levels". *Alcohol Clin Exp Res.* **15**(4): 734-738 (1991)
- 5) Holford NH. "Clinical Pharmacokinetics of ethanol". *Clinical Pharmacokinet.* **13**(5): 273-292 (1987)
- 6) Julkunen RJ. Tannenbaum L. Baraona E. Lieber CS. "First pass metabolism of alcohol etílico: an important determination of blood levels after alcohol consumption". *Alcohol.* **2**(3): 437-441 (1985)
- 7) Derache A. Toxicología y seguridad de los alimentos. Ed. Omega S.A. Barcelona. 1990. Pp407-428
- 8) Flores J. Farmacología humana, 2ª ed Ediciones Científicas y técnicas S.A Barcelona España 1992
- 9) Modell W., Schild H O Wilson A. Applied Pharmacology. Ed. Saunders Co. Philadelphia. 1976. pp 861-868
- 10) Popke J. "New aspects of the pharmacokinetics of ethanol". *Z Gesamte Inn Med.* **45**(20):616-620 (1990)
- 11) Clark W G. Goth Farmacología clínica. 12a ed. Ed. Medica Panamericana. México. 1988. pp 240-245
- 12) Jones AW. "Ethanol distribution ratios between urine and capillary blood in controlled experiments and in apprehended drinking drivers". *J Forensic Sci.* **31**(7): 21-34 (1992)
- 13) Bates ME. Brick J. White HR. "The correspondence between saliva and breath estimates of blood alcohol concentration: advantages and limitations of the saliva method". *J Stud Alcohol.* **54**(1): 17-22 (1993)
- 14) Haeckel R. Peiffer U. "Comparasion of ethanol concentration in saliva and blood from police controlled persons". *Blutalkohol.* **29**(5): 342-349 (1992)
- 15) Jones AW. "Distribution of ethanol between saliva and blood in man". *Clin Exp Pharmacol Physiol.* **6**(1): 53-59 (1979)
- 16) Toxicomanías y alcoholismo. Problemas médicos y psiquiátricos. 2a ed. Ed. Científicas y técnicas S.A. Barcelona 1973 pp 62-92
- 17) Modell W, Applied Pharmacology, American Edition, Philadelphia, 1976.
- 18) Henry J. B. Diagnóstico y tratamiento clínicos por el laboratorio. 9a ed. Ed. Científicas y técnicas. México. 1993. pp 389-391
- 19) Gossel T. A. & Bricker J. D. Principles of Clinical Toxicology. 2a ed. Ed. Raven Press. New York. 1990. pp 65-72



- 20) Tagliaro F, Lubli G, Ghielmi S, Franchi D, Marigo M. "Chromatographic methods for blood alcohol determination". *Journal of Chromatography*. **580**:161-190(1992)
- 21) Saferstein R. *Criminalistic. An introduction to forensic science*. Ed. Prentice Hall. New Jersey. 1977. pp 192-211
- 22) McColl KE, Whiting B, Moore MR, Goldgerg A. "Correlation of ethanol concentrations in blood and saliva". *Clin Sci*. **56(3)**:283-286(1979)
- 23) Jones A W. Measuring Ethanol in saliva with the QED Enzymatic Test Device: Comparatsion of Results with Blood- and Breath-Alcohol concentrations. *J. Anal. Toxicol*. **19(3)**: 169-174 (1995)
- 24) Drobitch R K. and Svensson C K. Therapeutic Drug Monitoring in Saliva. An update. *Clin Pharmacokinet*. **23(5)**: 365-379. (1992)
- 25) Reyes T.C. Tesis "Desarrollo y validación de un método analítico para Griserofulvina en control de calidad y sangre." FES Zaragoza. UNAM. México p. 10-24 (1996).
- 26) Guerra J. Validation of analytical methods by FDA laboratories. *Pharmaceutical technology* **10(3)**:74-80 (1986)
- 27) Thomson M A. Bais and quality control in forensic science: A curse for concern. *Journal of forensic sciences*. **19(3)**: 504-517 (1974)
- 28) Harte R A. Evidence from instruments-Their validity, reliability, and role in the adversary system. *Journal of forensic sciences*. **18(3)**: 197-201 (1973)
- 29) McCloskey K L. Proficiency testing in forensic toxicology. *Journal of forensic sciences*. **22(4)**: 675-679 (1977)
- 30) Frank R S and Gunn J W. Standardization of forensic drug analyses. *Journal of forensic sciences*. **19(1)**: 163-167 (1974)
- 31) Breen M.H., Dang Q.T., Jaing J.T. & _Boyd G.N. The effect of a one for the road drink of hard liquor, beer or wine on peak breath alcohol concentration in a social drinquin environmente with food consumption . *Med. Sci. Law*. Jan ; **38(1)**: 62-69 (1998)
- 32) Charles L. Winek and Katy L. Murphy. The rate and kinetic order of ethanol elimination. *Forensic Science International*. **25**: 62-69 (1984)
- 33) Pavia D.L. *Introduction to organic laboratory techniques a contemporary approach* 3a edition Soundes College Publications. USA 1988
- 34) Dubouski Kurt M. Alcohol determination in the clinical laboratory. *Am J Clin Patol* **74**: 747-750 (1980)
- 35) Paille F, Gillet C, Pirollet P. Physiopathologie de l´alcoolisation aiguë et du sevrage alcoolique. *Rev Prt* 1993; **43**:2035-41.
- 36) Ritchie JM. Alcoholes Alifáticos. En: Gilman AG, Goodman LS, Rall TW, Murad F, eds. *Goodman y Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. Madrid: Editorial Medica Panamericana, 1986: 364-377.
- 37) Escotado A. *Historia elemental de las drogas*. Editorial Anagrama S.A. Barcelona 1996.
- 38) Angeles Rangel Serrano. Función y propiedades bioquímicas de las proteínas G. *Sociedad Mexicana de Bioquímica*, **18(2)**:53 – 59. 1999