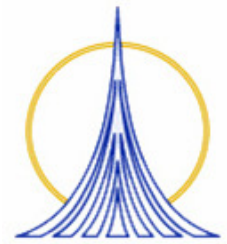




**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIOLÓGO**

**ESPINOSA MUÑOZ CECILIA**

**Nº DE CUENTA 8815683-9**

**DETERMINACIÓN DE ALCOHOL ETÍLICO EN  
HUMOR VÍTREO Y SANGRE**

**ASESOR DE TESINA  
M.C. FRANCISCO OSCAR GUADARRAMA  
MORALES**



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.

## INDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
MARCO TEÓRICO.....	3
OBJETIVOS.....	63
PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	63
IMPORTANCIA DEL ESTUDIO .....	64
LIMITACIONES DEL ESTUDIO .....	65
TIPO DE ESTUDIO .....	66
ANALISIS DE RESULTADOS .....	66
CONCLUSIONES.....	69
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	71

# **DETERMINACION DE ALCOHOL ETÍLICO EN HUMOR VÍTREO Y SANGRE**

## **RESUMEN**

El estudio toxicológico y de las técnicas para la determinación del alcohol etílico en fluidos biológicos posee una extraordinaria importancia social, criminalística y médico legal.

La trascendencia social del alcoholismo, en sus diversas manifestaciones, está demostrada por múltiples estadísticas que señalan entre otras, sus repercusiones económicas, profesionales, familiares y de toda índole. Sin embargo, intervienen intereses de sectores nacionales que impiden adoptar medidas prohibitivas de su consumo.

Ante todo, el alcohol es un factor criminógeno general de primer orden. Está comprobado que los llamados días criminales, es decir, aquellos en los que estadísticamente es más elevado el número de delitos, corresponden precisamente a los días de intemperancia en el consumo de bebidas alcohólicas.

Los métodos que se utilizan en la actualidad para la determinación de alcohol etílico son colorimétricos, enzimáticos, cromatográficos, fotométricos, electroanalítico y método de conway.

Los principales hallazgos que espero obtener al realizar este trabajo de tesina es determinar cual de las dos muestras biológicas (humor vítreo y sangre) son más confiables para la determinación de alcohol etílico ya sea antes o después de la muerte.

# INTRODUCCIÓN

En el presente trabajo se tratarán los temas de toxicidad por el alcohol etílico y su determinación en muestras biológicas como son la sangre y el humor vítreo además de que se analizarán cada una de las muestras biológicas mostrando sus ventajas y desventajas. También se analizarán diferentes técnicas de laboratorio para determinar el grado de alcohol.

La sangre es el espécimen que puede ser analizado para determinar la concentración de etanol. Sin embargo, a veces es necesario acudir a otros fluidos del cuerpo si la muestra de sangre no es adecuada.

En este aspecto, existen varias muestras que ayudan a determinar la concentración de dicha sustancia, entre las que se destaca, el humor vítreo.

El humor vítreo es una parte anatómica del ojo en estado líquido. Por su importancia ha sido objeto de múltiples estudios de interés forense, como: a) determinar el tiempo de evolución postmortem, el cual es denominado intervalo postmortem y b) se ha empleado para determinar las concentraciones de alcohol a través de las técnicas; oxidante del dicromato de potasio (microdifusión), con la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH), cromatografía de gases, cromatografía de gases con el sistema de espacio de cabeza, micro extracción en fase sólida.

En 1966, se hace por primera vez la cuantificación de alcohol etílico en humor vítreo y sangre, posteriormente se llevaron a cabo diversas publicaciones sobre este tema y en el año 2002 aparece uno de los últimos estudios desde el punto de vista forense, en donde determinan concentraciones de etanol postmortem en humor vítreo y sangre.

El objeto de este trabajo es proporcionar una información confiable sobre el empleo del humor vítreo para el estudio de las concentraciones de etanol

## MARCO TEÓRICO

El alcohol etílico o etanol es un líquido aromático y combustible que procede de la fermentación de sustancias azucaradas, del almidón y de la celulosa. Constituye el elemento activo (unido, a veces, a otros principios también tóxicos) de las bebidas espirituosas o alcohólicas.

El alcohol etílico puede dar lugar a una intoxicación común, accidental o voluntaria, y a una intoxicación profesional.

La intoxicación común es el resultado de la ingestión de bebidas alcohólicas en cantidad variable, bien de forma esporádica o bien de forma habitual.

La intoxicación profesional es debida a la inhalación de vapores de alcohol en ambientes de trabajo (refinerías, bodegas y fábricas de sombreros de fieltro, de seda artificial y de pólvora).

Las fuentes de la intoxicación alcohólica están constituidas por las bebidas espirituosas o alcohólicas que, según su grado de concentración de alcohol, se dividen en tres grupos:

- Bebidas débilmente alcohólicas. El porcentaje de alcohol oscila entre el 1 y el 8%.
- Bebidas medianamente alcohólicas. El grado de alcohol oscila entre el 10 y el 20%.
- Bebidas fuertemente alcohólicas. En la obtención de estas bebidas se suceden dos fases, la primera es una fermentación, seguida de una destilación del producto fermentado, con lo que se enriquece considerablemente la bebida alcohólica.

## **METABOLISMO DEL ETANOL**

### **Absorción**

1.- Vía digestiva. La mayoría de las intoxicaciones por alcohol se producen por vía digestiva. El alcohol se absorbe en un 20 – 30 % en el estómago y el resto, en el intestino delgado (principalmente en duodeno).

El metabolismo de absorción se realiza por difusión pasiva, siguiendo la ley de Fick.

El alcohol pasa a la sangre a través de la porta y desde aquí se incorpora a la circulación general. Todo el alcohol ingerido pasa a la sangre entre 30 y 60 minutos después de la ingestión; aunque en algunas circunstancias puede retrasarse hasta un máximo de 3 horas.

Los factores que condicionan la velocidad de absorción son de dos órdenes: los que modifican la evacuación gástrica y los que modifican la velocidad de difusión, en función de la ley de Fick:

$$Vd = \frac{S (C1 - C2) K}{d}$$

donde S es la superficie de absorción disponible; C1, la concentración de alcohol en el aparato digestivo; C2, la concentración en la sangre, y d, el grosor o la densidad de la membrana. La constante K influye poco en este caso.

2.- Vía pulmonar. El alcohol puede penetrar fácilmente por vía pulmonar y atravesar la membrana alveolo-capilar por difusión.

## **Distribución**

Una vez que el alcohol es distribuido por todo el organismo, se establece un proceso de difusión que vendrá regulado por dos factores. 1) La concentración de agua y la de alcohol con respecto a la sangre. 2) El proceso de reparto se realiza a velocidades muy distinta y no siempre la concentración de alcohol responde a la que teóricamente le debería corresponder en función de su riqueza en agua. Este hecho es de sumo interés médico-legal cuando se analiza el alcohol en distintos fluidos e incluso en el mismo fluido (caso de la sangre, según que ésta sea arterial o venosa).

La concentración de alcohol en esta fase de distribución dependerá de la fase en que se encuentre el proceso:

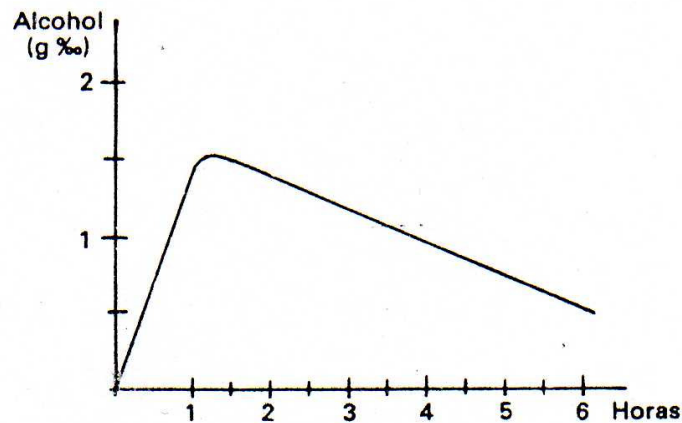
Absorción dependerá, de muchos factores, entre ellos, y de modo principal, el número de libaciones. En el supuesto de una única libación al estómago vacío, a los 60 min. todo el alcohol habrá pasado a la sangre. La pendiente de la recta será más o menos empinada en función de la velocidad de difusión.

Equilibrio de difusión. Una vez que el alcohol llega a la sangre, difunde a los tejidos en función de la riqueza en el agua de los líquidos extra e intracelulares. Llega un momento en que se produce un punto de equilibrio, que puede ser un vértice o una meseta.

Eliminación. El 95% del alcohol se metaboliza por oxidación y un 5% se elimina sin modificar por distintos órganos y aparatos.



La curva de alcoholemia que aparece en la figura 1 sintetiza los procesos indicados. Tiene un gran interés médico-legal, porque representa la evolución de la concentración del alcohol en la sangre en el período de tiempo que sigue a la ingestión, hasta su catabolización total.



**Fig. 1. Curva de alcoholemia**

## **Eliminación**

### **Eliminación pulmonar**

Esta vía de excreción, posible gracias a la volatilidad del alcohol, sigue un proceso inverso al de la absorción. Como mecanismo de eliminación tiene escaso interés, pues sólo un 2-3% del alcohol ingerido se elimina por esta vía. Pero desde el punto de vista analítico y judicial es de gran importancia, pues los métodos de análisis incruentos se basan en este principio: la cantidad de alcohol presente en 2.0 ml de aire espirado equivale al que hay en 1 ml. de sangre arterial.

### Eliminación 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, pero ésta cambia continuamente y la de la orina no lo hace.

### Eliminación por la saliva

El alcohol se elimina por la saliva, aunque la cantidad excretada por esta vía es ínfima; con todo, dado el volumen de secreción salival, tiene el mismo interés analítico que la orina.

### Eliminación por la leche

El alcohol se elimina por esta secreción, lo que debe ser tenido en cuenta por las madres lactantes.

## **Catabolismo del alcohol**

Del 90% al 95% del alcohol presente en el organismo se metaboliza por un proceso de oxidación. Esta oxidación es uniforme para cada individuo y no se ve modificada por el trabajo muscular, la temperatura ambiente ni la concentración del alcohol presente en ese momento en los tejidos.

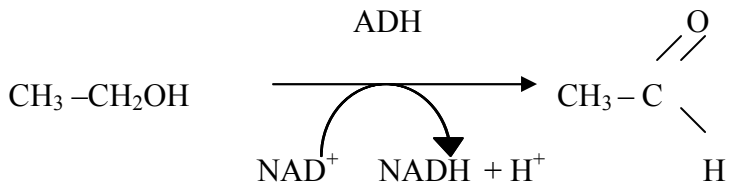
El catabolismo oxidativo del alcohol se puede realizar por varias rutas metabólicas, conduciendo todas a la producción de acetaldehído; éste es metabolizado a acetato, que es integrado en diversas vías metabólicas, según el figura 2, que resume las etapas metabólicas.

### Primera etapa

Está constituida por la formación de acetaldehído y se lleva a cabo por tres vías diferentes:

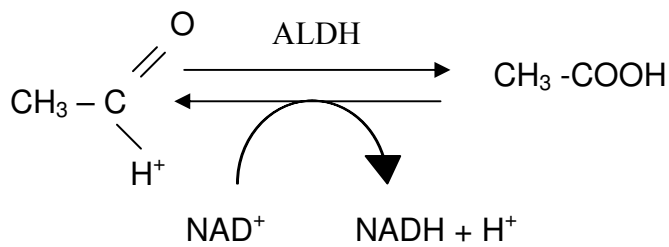
1.- vía del alcohol-deshidrogenasa (ADH). Hasta hace algunos años era la única vía conocida de oxidación del alcohol.

La ADH es una enzima que está presente en numerosos tejidos (pulmón, estómago, riñón), pero fundamentalmente está en el hígado. Se localiza en el citoplasma del hepatocito y cataliza la siguiente reacción

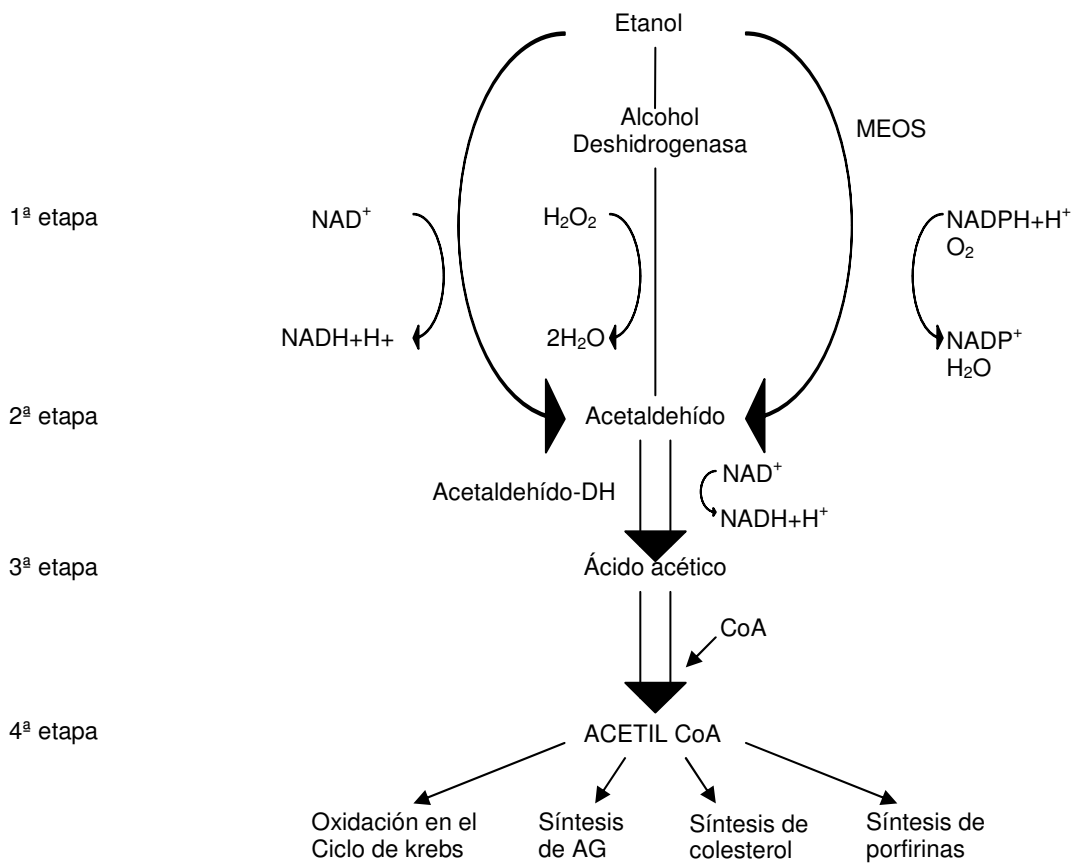


### Segunda etapa:

El acetaldehído es metabolizado a ácido acético, según la siguiente reacción:



Catalizada por una enzima, la acetaldehído- deshidrogenasa.



**Fig. 2. Vía metabólica del alcohol y las distintas etapas que la constituyen**

## EFFECTOS METABÓLICOS DEL ETANOL

El mejor conocimiento de los procesos bioquímicos en la degradación metabólica del etanol ha permitido esclarecer algunas de las situaciones patológicas generadas en la intoxicación. De todas ellas merecen destacarse por su interés fisiopatológico las siguientes:

Metabolismo de los glúcidos.

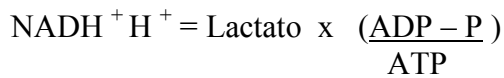
1.- Alteración de la gluconeogénesis. Estas alteraciones están motivadas por la alteración del cociente  $\text{NADH} + \text{H}^+ / \text{NAD}^+$  y, subsiguientemente, los de:

Lactato-Piruvato y Malato oxalacetato

La regeneración del  $\text{NAD}^+$ , como se mencionó antes, se hace a expensas de un descenso del piruvato y del oxalacetato, que son los puntos de partida más importantes para la gluconeogénesis. De otra parte, el exceso de NADH inhibe otras reacciones necesarias en los procesos gluconeogénicos. El resultado es una hipoglucemia, fenómeno bien conocido desde la antigüedad, pero no bien explicado. La hipoglucemia puede ir precedida de una hiperglucemia transitoria, en respuesta a una glucogenólisis de estrés que durará lo que las reservas de glucógeno.

2.- Acción sobre el ciclo de Krebs. El ciclo de Krebs puede sufrir una inhibición en su funcionamiento hasta de un 75%. El punto más importante es el descenso de la concentración de oxalacetato, esto se debe a que se está aumentando el paso de ácido pirúvico al ácido láctico, por una parte, y del oxalacetato a malato, por otra. A ello se añade la inhibición de ciertas enzimas del ciclo, como son: la isocitrato-deshidrogenasa, el citrato sintetasa y la cetoglutarato deshidrogenasa.

3.- Hiperlactacidemia. Para regenerar el  $\text{NAD}^+$ , la enzima láctato-deshidrogenasa transforma gran parte del ácido pirúvico en láctico. La consecuencia es un aumento de la acidosis y del ácido úrico en sangre. Esta acidez cede mejor al tratamiento con glucosa, que contribuye a regenerar al  $\text{NAD}^+$  y el ATP en función de la ecuación:



#### Metabolismo en los lípidos

La acción del etanol sobre el metabolismo de los lípidos se efectúa en diferentes vías y depende de que se trate de una intoxicación aguda o crónica. En resumen puede suceder:

- Aumento de la síntesis de ácidos grasos libres, ya que la acetil-Coenzima A se canaliza en esa dirección debido al exceso de  $\text{NADH} + \text{H}^+$  y a la inhibición del ciclo de Krebs.
- Aumento de la síntesis de triglicéridos debido a que se favorece la síntesis de glicerol, precursor de los triglicéridos.
- Disminución de la oxidación de los ácidos grasos libres, que no sólo se oxidan, sino que forman ácidos grasos de cadena larga. El mal catabolismo de los ácidos grasos es el responsable de la cetonemia y de la cetonuria de los alcohólicos.

El resultado final es un depósito de grasas en los tejidos, principalmente en hígado y corazón, lo que a la larga se traducirá en una degeneración grasa. La disminución de las oxidaciones y el aumento de la síntesis de triglicéridos, ambos procesos ligados al descenso del  $\text{NAD}^+$ , serían las causas más importantes de esa degeneración grasa.

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 vía alterna del sistema catalasa hepático.

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. Estas pequeñas cantidades presentan un gran interés toxicológico, ya que permiten determinar indirectamente el grado de alcoholemia.

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 ésta se incrementa con la experiencia bebedora (dosis dependiente) de la siguiente manera. (Ver tabla 1).

Tabla 1. Velocidad de eliminación y experiencia de consumo alcohólico.

Velocidad de eliminación	Experiencia / consumo
12 mg/h	No alcohólicos / menor 187.5 ml. etanol/mes.
15 mg/h	Bebedor social / 187.5 y 937.5 ml etanol /mes
30 +/- 9 mg/h	Alcohólico / mayor 937.5 ml. etanol/mes

Algunos autores consideran el metabolismo del alcohol etílico siguiendo la cinética de Michaelis-Menten con una Km: 0.09-0.11 mg/ml, con niveles de alcohol etílico de 300 mg/dl y una V max: 0.22 mg/ ml /h.

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

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

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

Efectos farmacológicos.

El alcohol etílico es fundamentalmente un depresor de la transmisión nerviosa a nivel neuronal en el sistema nervioso central (SNC). 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 de mayor amplitud o duración.
- Se aumenta la actividad de canales iónicos por activación de proteínas de membrana. (como se muestra en la figura 3).



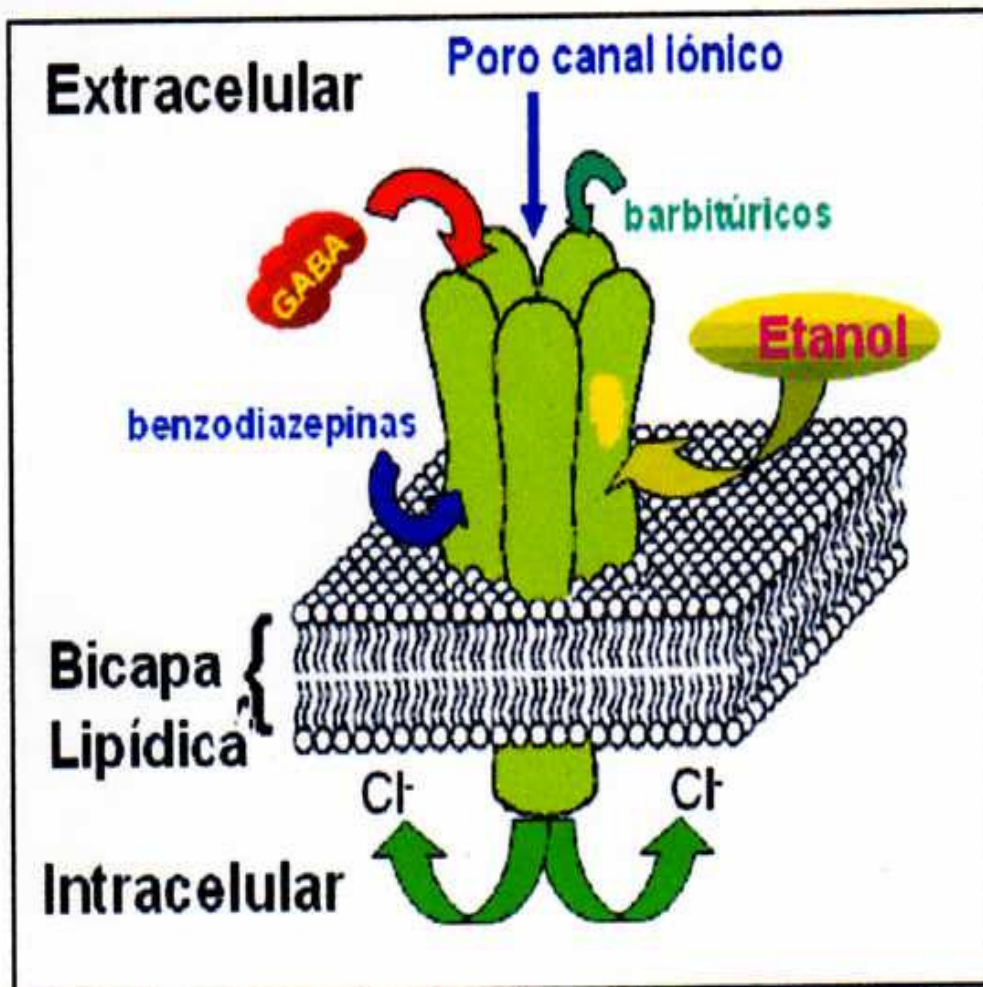


Fig 3. Activación de proteínas de membranas por etanol.

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 opioides 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 dosis. 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 ideática y asociativa., torpeza, pérdida de reflejos, estupor y sueño. Concentraciones más elevadas producen coma, depresión bulbar y muerte. La correlación de ambos parámetros se indica en la siguiente tabla.

### Correlación entre la concentración sanguínea de alcohol y sus efectos en el SNC

Whisky	Conc. en sangre (mg/100 ml) / (% etanol)	Efecto	Parte del 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.

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.

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 un valor de alcohol etílico en sangre mayor a 80 mg/dl se considera estado de ebriedad.

#### EFFECTOS SOBRE OTROS ÓRGANOS.

Sistema cardiovascular.-A dosis moderadas provoca vaso dilatación de la piel y vías digestivas, ya que deprime el centro vasomotor. Con la vasodilatación periférica aumenta la perdida 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 gástrina 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 49% se presenta una acción irritante a causa de la hipertermia e inflamación del píloro.

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).

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.

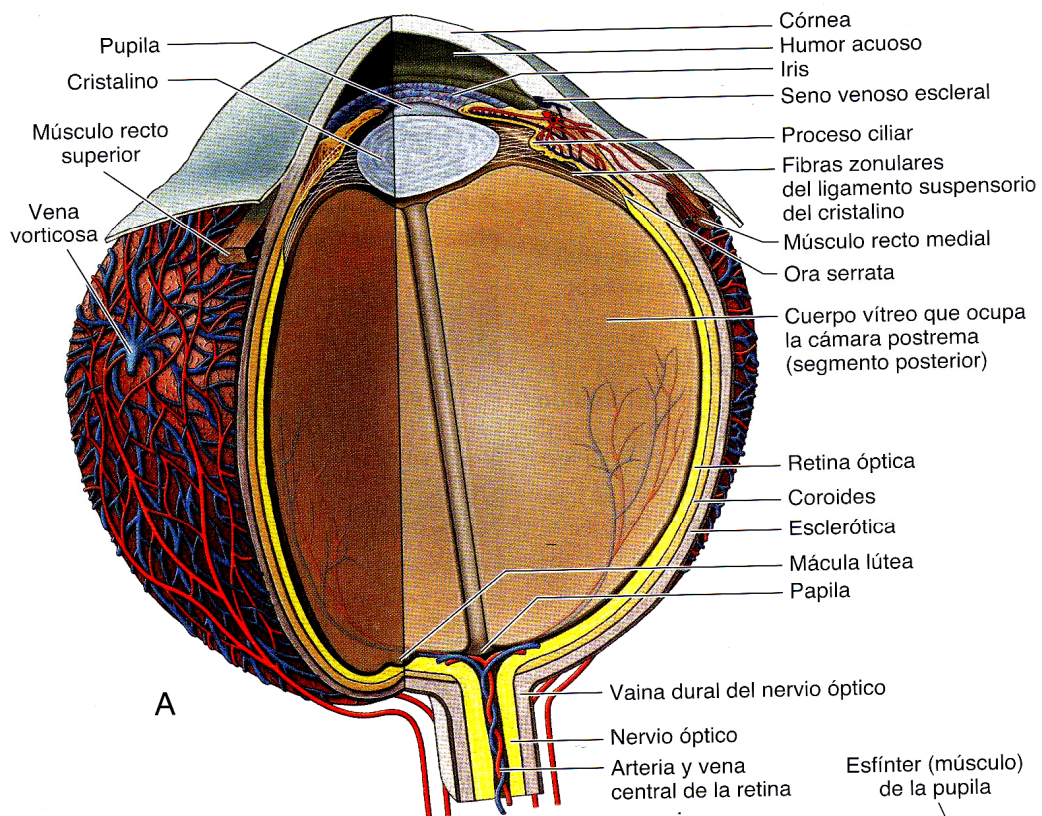
En médula ósea provoca anemia macrocítica y sobre el nervio óptico puede llegar a causar artrofia.

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.

En el músculo, produce alteraciones estructurales de la fibra muscular, que pueden llevar a miopatía.

## ANATOMÍA DEL OJO

Humor vítreo (vitreous humor) Sustancia transparente y semigelatinosa contenida en una fina membrana hialoidea que rellena la cavidad situada por detrás del cristalino ocular. A veces en el humor vítreo quedan pequeños restos del canal hialoideo pero no posee vasos sanguíneos y su nutrición la recibe desde la periferia a través de los vasos de la retina y las prolongaciones filiales. El humor vítreo es cóncavo en su porción anterior para que se adapte al cristalino y se encuentra estrechamente unido a la retina en torno al globo ocular. Denominado también cuerpo vítreo.



El humor vítreo en las cámaras del globo ocular es producido por los procesos filiares. Esta solución acuosa proporciona nutrientes para la córnea y el cristalino avasculares. Después de atravesar la pupila desde la cámara posterior en la cámara anterior, el humor vítreo drena en el seno venoso de la esclera.

#### Obtención de la muestra de Humor vítreo

Los especímenes de humor vítreo se obtienen por aspiración directa de cada uno de los ojos, utilizando una jeringa de 5 a 10 ml con aguja del calibre del número 20. La aguja se debe introducir al ojo hasta su extremo, por la comisura externa de los párpados y hasta el centro del globo ocular.

Posteriormente, se aspira el humor vítreo del globo ocular con una succión suave y delicada. Para prevenir la contaminación del espécimen con fragmentos de retina y otros tejidos, se deben evitar los tubos al vacío y la succión fuerte. Con la técnica correcta se pueden extraer de cada uno de los ojos del adulto de 2 a 3 ml de líquido y de cada ojo de un recién nacido alrededor de 1 ml de humor vítreo. Finalmente, tan pronto como se haya extraído la muestra de cada uno de los ojos, es conveniente para reponer el humor vítreo extraído, inyectar un volumen similar de solución salina ó glicerina a cada uno de los ojos para devolverles el aspecto natural.

#### Manejo de la muestra

El humor vítreo, tan pronto como se haya obtenido, se debe depositar en un tubo de ensayo estéril sin aditivos y mientras se lleva a cabo el estudio se conservará en refrigeración a una temperatura de 4° C; si se estudia después de 24 horas o más, deberá congelarse hasta que se pueda hacer su análisis. Se recomienda centrifugarse y emplear el sobrenadante para el análisis, principalmente en aquellos estudios donde el espécimen se ponga directamente al aparato analizador y deba fluir a través de una tubería de calibre muy pequeño.

Precauciones:

Cuando se trabaje muestra de humor vítreo, se debe tener la precaución de saber si la muestra es de un individuo con o sin infección. El síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), hepatitis viral y la tuberculosis son algunas de las enfermedades infecciosas que pueden adquirirse por una exposición inadecuada a una muestra con dichas infecciones.

Numerosas publicaciones han demostrado que tanto el antígeno como el anticuerpo del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), se pueden detectar en muestras de humor vítreo.

Klatt, encontró en especímenes postmortem de humor vítreo de 34 horas de tomados, positividad para anticuerpos en contra el VIH; sin embargo algunos especímenes de humor vítreo dieron resultados “falsos –negativos” en muestras con más de 34 horas después de la muerte.

Karhunen, informó que los anticuerpos de VIH pueden ser detectados en muestras de suero, sangre entera, humor vítreo y bilis conservadas por meses a temperatura ambiente.

La sangre siempre debe envasarse en condiciones médicamente aceptadas por un individuo calificado. Es importante que al extraer la muestra la aguja sea estéril. La sangre debe guardarse en un refrigerador hasta la entrega del laboratorio de toxicología, con un anticoagulante (EDTA) y un preservativo como el Fluoruro de sodio que es capaz de inhibir el microorganismo que puede destruir al alcohol.

### **BEBIDAS ALCOHÓLICAS.**

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

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 en consecuencia un incremento en las concentraciones plasmáticas de alcohol etílico. Éste 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.

El porcentaje alcohólico de algunas bebidas se resume en la tabla 2.

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
Vodka	40.0 – 50.0
Ginebra	40.0 – 48.5
Ron	40.0
Tequila	45.0 – 50.5



## ALCOHOL Y ACCIDENTES DE TRÁFICO

Los efectos que ejerce el alcohol sobre el comportamiento al volante, depende de la cantidad que exista en sangre, es decir, de la alcoholemia. El alcohol se comporta de manera semejante a los anestésicos inhalatorios clásicos. Como tal, el efecto se inicia de un modo paradójico, induciendo excitación, euforia, optimismo y desinhibición generalizada. Este último efecto es especialmente delicado para conducir. Aunque la conducción en saturaciones circulatorias normales puede continuar siendo aceptablemente segura, ante una circunstancia imprevista, una situación compleja o un estado psicofísico no óptimo (cansancio, fatiga, deterioro de la destreza), el juicio que realice el conductor ante la realidad circulatoria del momento no será suficientemente objetiva y, por lo tanto, la respuesta probablemente será inadecuada. A medida que la cantidad de alcohol en sangre aumenta, afecta a distintos estratos cerebrales y las manifestaciones se hacen más patentes progresivamente.

La información disponible pone de manifiesto que el alcohol es el responsable del 30-50% de los accidentes con víctimas mortales, del 15-35% de los que causan lesiones graves y del 10% de los que causan lesiones. El análisis de la mortalidad prematura muestra que algo más del 60% de todos los años potenciales de vida perdidos estuvieron relacionados con los accidentes no intencionados, lo que representa una medida de 23 años por cada muerte.

Artículo 100. Del reglamento de tránsito del D.F.- 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 espirado superior a 0.4 miligramos por litro.

## EL DESTINO DEL EL DEL ALCOHOL EN EL CUERPO

El análisis del alcohol nos confronta inmediatamente a la toxicología forense al detectar y aislar el alcohol en el cuerpo para el propósito de determinar la conducta humana.

Como cualquier otro depresor, el alcohol tiene su efecto principal en el sistema nervioso central. La magnitud de la depresión es proporcional a la concentración del alcohol en las células nerviosas. El nervio es más susceptible bajo la acción del alcohol este esta formado en la superficie den cerebro anterior o proencefalo.

Muchos factores determinan la proporción de alcohol que es absorbido en el torrente sanguíneo. Esto incluye el tiempo total de toma al consumir la bebida, el contenido de alcohol del brebaje, el consumo asciende, y la cuantificación, el tipo de comida presente en el estomago y el tiempo en que se bebió.

La cromatografía de gas ofrece al toxicólogo un amplio acercamiento para determinar los niveles de alcohol en sangre

## **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.

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 está 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:

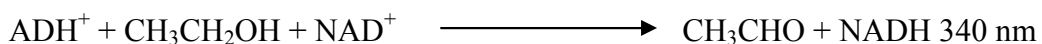
1) dicromato de potasio ( $K_2Cr_2O_7$ ) amarillo+  $H_2SO_4$ . → sulfato de cromo verde

2) permanganato de potasio  $KMnO_4$  (morado) +  $H^+$ . → ion magnesio ( $Mg^{+2}$ )

3) pentóxido de yodo (incoloro) . → 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<sup>+</sup> y la cuantificación se realiza espectrofotométricamente.



## 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.

### **Cromatografía de gases**

En la cromatografía de gases la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de una fase móvil de gas inerte. A diferencia de los otros tipos de cromatografía, la fase móvil no interacciona con las moléculas del analito; su única función es la de transportar el analito a través de la columna. Existen dos tipos de cromatografía de gases (GC): la cromatografía gas-sólido (GSC) y la cromatografía gas-líquido (GLC), siendo esta última la que se utiliza más ampliamente, y que se puede llamar simplemente cromatografía de gases (GC). En la GSC la fase estacionaria es sólida y la retención de los analitos en ella se produce mediante el proceso de adsorción. Precisamente este proceso de adsorción, que no es lineal, es el que ha provocado que este tipo de cromatografía tenga aplicación limitada, ya que la retención del analito sobre la superficie es semipermanente y se obtienen picos

de elusión con colas. Su única aplicación es la separación de especies gaseosas de bajo peso molecular. La GLC utiliza como fase estacionaria moléculas de líquido inmovilizadas sobre la superficie de un sólido inerte.

### ***Instrumentación***

El cromatógrafo de gases consta de diversos componentes como el gas portador, el sistema de inyección de muestra, la columna (generalmente dentro de un horno), y el detector.

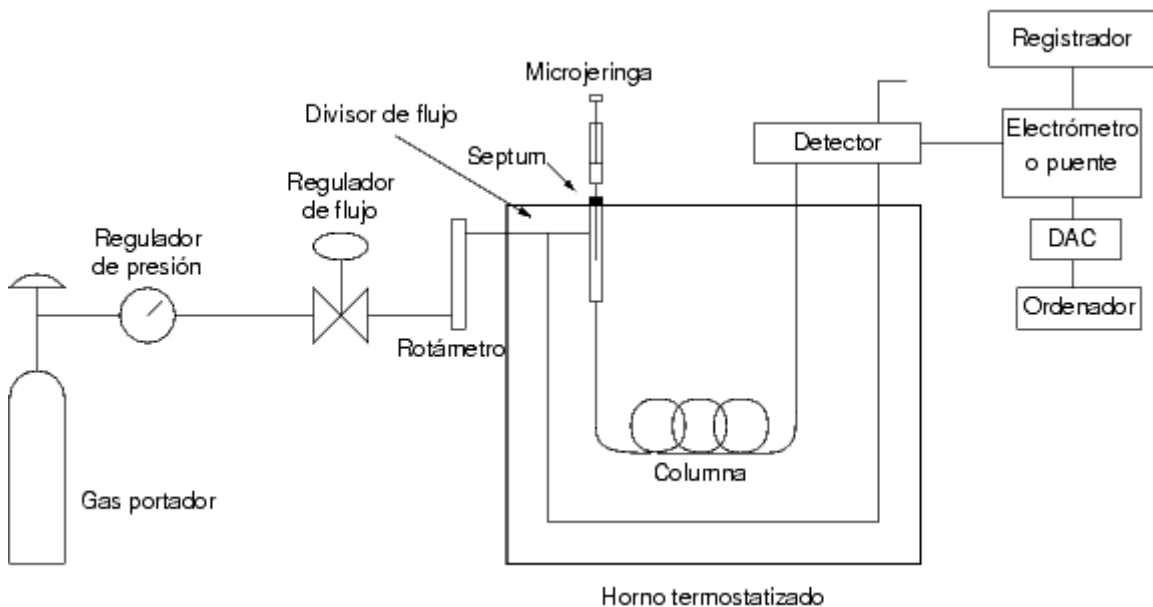


Diagrama de un cromatógrafo de gases

### **Gas portador**

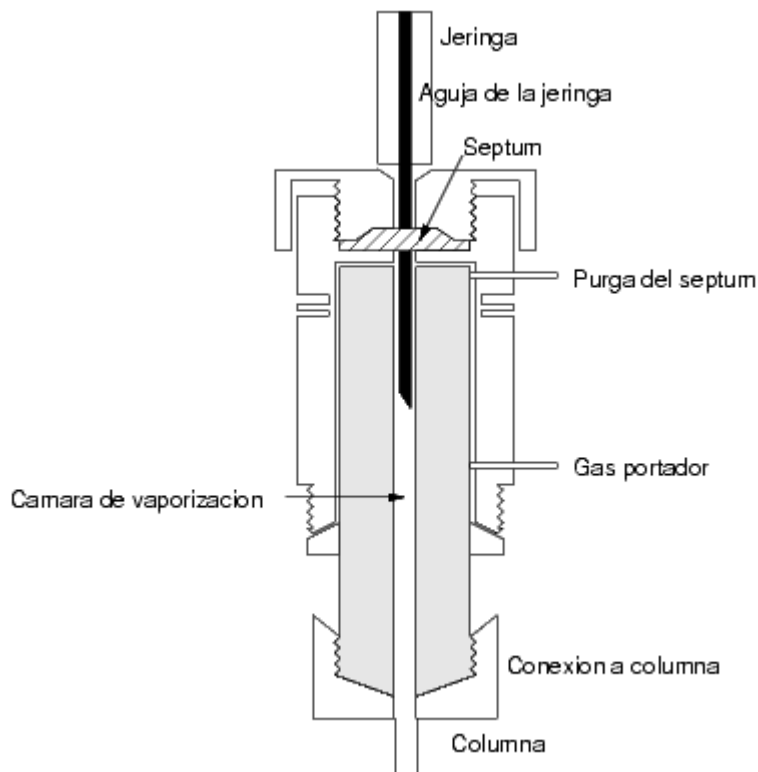
El gas portador debe ser un gas inerte, para prevenir su reacción con el analito o la columna. Generalmente se emplean gases como el helio, argón, nitrógeno, hidrógeno o dióxido de carbono y la elección de este gas en ocasiones depende del tipo de detector empleado. El almacenaje del gas puede ser en balas normales o empleando un

generador, especialmente en el caso del nitrógeno y del hidrógeno. Luego tenemos un sistema de manómetros y reguladores de flujo para garantizar un flujo estable y un sistema de deshidratación del gas, como puede ser un tamiz molecular.

Generalmente la regulación de la presión se hace a dos niveles: un primer manómetro se sitúa a la salida de la bala o generador del gas y el otro a la entrada del cromatógrafo, donde se regula el flujo. Las presiones de entrada varían entre 10 y 25 psi lo que da lugar a caudales de 25 a 150 mL/min en columnas de relleno y de 1 a 25 mL/min en columnas capilares. Para comprobar el caudal se puede utilizar un rotámetro o un simple medidor de pompas de jabón, el cual da una medida muy exacta del caudal volumétrico que entra a la columna.

### **Sistema de inyección de muestra**

La inyección de muestra es un apartado crítico, ya que se debe inyectar una cantidad adecuada, y debe introducirse de tal forma (como un "tapón de vapor") que sea rápida para evitar el ensanchamiento de las bandas de salida; este efecto se da con cantidades elevadas de analito. El método más utilizado emplea una microjeringa (de capacidades de varios microlitros) para introducir el analito en una cámara de vaporización instantánea. Esta cámara está a 50°C por encima del punto de ebullición del componente menos volátil, y está sellada por una junta de goma de silicona septa o *septum*.



### Inyector de muestra para un GC

Si es necesaria una reproducibilidad del tamaño de muestra inyectado se puede usar una válvula de seis vías o válvula de inyección, donde la cantidad a inyectar es constante y determinada por el tamaño del bucle de dicha válvula.

Si la columna empleada es ordinaria, el volumen a inyectar será de unos 20  $\mu\text{l}$ , y en el caso de las columnas capilares dicha cantidad es menor, de  $10^{-3}$   $\mu\text{l}$ . Para obtener estas cantidades, se utiliza un divisor de flujo a la entrada de la columna que desecha parte del analito introducido.

En caso de muestras sólidas, simplemente se introducen en forma de disolución, ya que en la cámara de vaporización instantánea el disolvente se pierde en la corriente de purga y no interfiere en la elusión.

## Columnas y sistemas de control de temperatura

En GC se emplean dos tipos de columnas: las empaquetadas o de relleno y las tubulares abiertas o capilares. Estas últimas son más comunes en la actualidad (2005) debido a su mayor rapidez y eficiencia. La longitud de estas columnas es variable, de 2 a 50 metros, y están construidas en acero inoxidable, vidrio, sílice fundida o teflón. Debido a su longitud y a la necesidad de ser introducidas en un horno, las columnas suelen enrollarse en una forma helicoidal con diámetros de 10 a 30 cm, dependiendo del tamaño del horno.

La temperatura es una variable importante, ya que de ella va a depender el grado de separación de los diferentes analitos. Para ello, debe ajustarse con una precisión de décimas de grado. Dicha temperatura depende del punto de ebullición del analito o analitos, y por lo general se ajusta a un valor igual o ligeramente superior a él. Para estos valores, el tiempo de elusión va a oscilar entre 2 y 30-40 minutos. Si tenemos varios componentes con diferentes puntos de ebullición, se ajusta la llamada **rampa de temperatura** con lo cual ésta va aumentando ya sea de forma continua o por etapas. En muchas ocasiones, el ajustar correctamente la rampa puede significar separar bien o no los diferentes analitos. Es recomendable utilizar temperaturas bajas para la elusión, pero conforme la temperatura es mayor la elusión es más rápida, pero corriendo el riesgo de descomponer el analito.

### Detectores

El detector es la parte del cromatógrafo que se encarga de determinar cuándo ha salido el analito por el final de la columna. Las características de un detector ideal son:

- **Sensibilidad:** Es necesario que pueda determinar con precisión cuándo sale analito y cuando sale sólo el gas portador. Tienen sensibilidades entre  $10^{-8}$  y  $10^{-15}$  g/s de analito.
- **Respuesta lineal al analito** con un rango de varios órdenes de magnitud.
- **Tiempo de respuesta corto**, independiente del caudal de salida.



- **Intervalo de temperatura de trabajo amplio**, por ejemplo desde temperatura ambiente hasta unos 350-400°C, temperaturas típicas trabajo.
- **No debe destruir la muestra.**
- **Estabilidad y reproducibilidad**, es decir, a cantidades iguales de analito debe dar salidas de señal iguales
- **Alta fiabilidad y manejo sencillo**, o a prueba de operadores inexpertos.
- **Respuesta semejante para todos los analitos**, o
- **Respuesta selectiva y altamente predecible** para un reducido número de analitos.

Algunos tipos de detectores:

- Detector de ionización de llama (FID, Flame Ionization Detector).
- Detector de conductividad térmica (TCD, Thermal Conductivity Detector).
- Detector termoiónico (TID, ThermoIonic Detector).
- Detector de captura de electrones (ECD, Electron-Capture Detector).
- Detector de emisión atómica (AED, Atomic Emission Detector).

Otros detectores comúnmente usados son el detector fotométrico de llama (PFD), empleado en compuestos como pesticidas e hidrocarburos que contengan fósforo y azufre. En este detector se hace pasar el gas eluido por una llama hidrógeno/oxígeno donde parte del fósforo se convierte en una especie HPO, la cual emite a  $\lambda = 510$  y 526nm, y simultáneamente el azufre se convierte en S<sub>2</sub>, con emisión a  $\lambda = 394$ nm. Dicha radiación emitida se detecta con un fotómetro adecuado. Se han podido detectar otros elementos, como algunos halógenos, nitrógeno, estaño, germanio y otros.

En el detector de fotoionización (PID), el gas eluido al final de la columna se somete a una radiación ultravioleta con energías entre 8,3 y 11,7 eV, correspondiente a una  $\lambda = 106$ -149 nm. Mediante la aplicación de un potencial a la celda de ionización se genera una corriente de iones, la cual es amplificada y registrada.

- **Columnas de relleno**

Las columnas de relleno consisten en unos tubos de vidrio, metal (inerte de ser posible, tal como el acero inoxidable, cobre o aluminio) o teflón, de longitud de 2 a 3 metros y un diámetro interno de unos pocos milímetros, típicamente de 2 a 4. El interior se rellena con un material sólido, finamente dividido para tener una máxima superficie de interacción y recubierto con una capa de espesores entre 50 nm y 1  $\mu\text{m}$ . Para que puedan introducirse en el horno, se enrollan convenientemente.

El material de relleno ideal consiste en pequeñas partículas, esféricas y uniformes, con una buena resistencia mecánica, para tener una máxima superficie donde interaccionan la fase estacionaria y el analito. La superficie específica mínima ha de ser de 1  $\text{m}^2/\text{g}$ . Como todos los componentes de columnas para GC, debe ser inerte a altas temperaturas ( $\sim 400^\circ\text{C}$ ) y humectarse uniformemente con la fase líquida estacionaria durante el proceso de fabricación. El material preferido actualmente (2005) es la tierra de diatomeas natural, debido a su tamaño de poro natural. Estas especies, ya extinguidas, utilizaban un sistema de difusión molecular para tomar nutrientes del medio y expulsar sus residuos. Por tanto, debido a que el sistema de adsorción superficial del analito y la fase estacionaria es parecido, son materiales especialmente útiles.

El tamaño es crítico a la hora de darse el proceso de interacción con el analito, y a menores tamaños la eficacia de la columna es mejor. Pero existe el problema de la presión necesaria para hacer circular un caudal estable de gas portador por la columna, ya que dicha presión es inversamente proporcional al cuadrado del diámetro de dichas partículas. Así, el tamaño mínimo para usar presiones máximas de 50 psi es de 250 a 149  $\mu\text{m}$ .

### **Columnas capilares**

Las columnas capilares son de dos tipos básicos: las de pared recubierta (WCOT) y las de soporte recubierto (SCOT). Las WCOT son simplemente tubos capilares donde la pared interna se ha recubierto con una finísima capa de fase estacionaria. Las columnas SCOT tienen en su parte interna una fina capa de material adsorbente como el empleado en las columnas de relleno (tierra de diatomeas) donde se ha adherido la fase estacionaria. Las ventajas de las SCOT frente a las WCOT es la mayor capacidad de

carga de esta última, ya que en su fabricación se emplean mayores cantidades de fase estacionaria, al ser la superficie de intercambio mayor. Por orden de eficacia, en primer lugar están las WCOT, luego las SCOT y por último las columnas de relleno.

Las columnas WCOT se fabrican a partir de sílice fundida, conocidas como columnas tubulares abiertas de sílice fundida o FSOT. Estas columnas se fabrican a partir de sílice especialmente pura, sin apenas contenido de óxidos metálicos. Debido a la fragilidad inherente a este material, en el mismo proceso de obtención el tubo se recubre con una capa de polimida de esta forma la columna puede enrollarse con un diámetro de unos pocos centímetros. Estas columnas, con propiedades como baja reactividad, resistencia física y flexibilidad, han sustituido a las WCOT clásicas.

Las columnas FSOT tienen diámetros internos variables, entre 250 y 320  $\mu\text{m}$  (para columnas normales) y 150-200  $\mu\text{m}$  para columnas de alta resolución. Estas últimas requieren menor cantidad de analito y un detector más sensible, al eluir menor cantidad de gas. Existen asimismo columnas macrocapilares con diámetros de hasta 530  $\mu\text{m}$ , que admiten cantidades de analito comparables a las de relleno pero con mejores prestaciones.

En estas columnas existe un problema debido a la adsorción del analito sobre la superficie de la sílice fundida, adsorción debida a la presencia de grupos silanol (Si-OH), los cuales interaccionan fuertemente con moléculas molares orgánicas. Este inconveniente se suele solventar inactivando la superficie por sililación con dimetilclorosilano (DMCS). La adsorción debida a los óxidos metálicos se ve paliada en gran parte por la elevada pureza de la sílice empleada.

### **La fase estacionaria**

Las propiedades necesarias para una fase estacionaria líquida inmovilizada son:

1. Características de reparto (factor de capacidad  $\kappa'$  y factor de selectividad  $\alpha$ ) adecuados al analito.
2. Baja volatilidad, el punto de ebullición de la fase estacionaria debe ser al menos 100°C mayor que la máxima temperatura alcanzada en el horno.
3. Baja reactividad.

4. Estabilidad térmica, para evitar su descomposición durante la elusión.

Existen por mucho una docena de disolventes con estas características. Para elegir uno, debe tenerse en cuenta la polaridad del analito, ya que a mayor polaridad del analito, mayor polaridad deberá tener la fase estacionaria. Algunas fases estacionarias utilizadas actualmente (2005) son:

- **Polidimetilsiloxano**, fase no polar de uso general para hidrocarburos aromáticos, polinucleares, drogas, esteroides y PCBs
- **Poli(fenilmetidifenil)siloxano** (10% fenilo), para ésteres metílicos de ácidos grasos, alcoles, drogas y compuestos halogenados.
- **Poli(fenilmetil)siloxano** (50% fenilo), para drogas, esteroides, pesticidas y glicoles.
- **Poli(trifluoropropildimetil)siloxano**, para aromáticos clorados, nitroaromáticos, bencenos alquilsustituídos.
- **Poli(etilenglicol)**, para compuestos como glicoles, alcoholes, éteres, aceites esenciales.
- **Poli(dicianoalildimetil)siloxano**, para ácidos grasos polinsaturados, ácidos libres y alcoholes.

Generalmente, en columnas comerciales, la fase estacionaria se presenta enlazada y entrecruzada para impedir su pérdida durante las operaciones de elución o lavado. De esta forma se obtiene una monocapa adherida químicamente a la superficie de la columna. La reacción implicada suele ser la adición de un péroxido al líquido a fijar, iniciándose una reacción por radicales libres, que tiene como resultado la formación de un enlace carbono-carbono que además incrementa su estabilidad térmica. Otra forma es la irradiación con rayos gamma.

Otro tipo de fase estacionaria son las quirales, lo cual permite resolver mezclas enantioméricas. Este tipo de fases suelen ser aminoácidos quirales o algún derivado adaptado al trabajo en columna.

El grosor de la película varía entre 0,1 y 5  $\mu\text{m}$ ; el grosor depende de la volatilidad del analito. Así, un analito muy volátil requerirá una capa gruesa para aumentar el tiempo de interacción y separar más efectivamente los diferentes componentes de la mezcla.

Para columnas típicas (diámetros internos de 0,25 o 0,32 mm) se emplean grosores de 0,25  $\mu\text{m}$ , y en las columnas macrocapilares el grosor sube hasta 1  $\mu\text{m}$ . El grosor máximo suele ser de 8  $\mu\text{m}$

### **ANÁLISIS DE SANGRE EN CROMATOGRAFÍA DE GAS.**

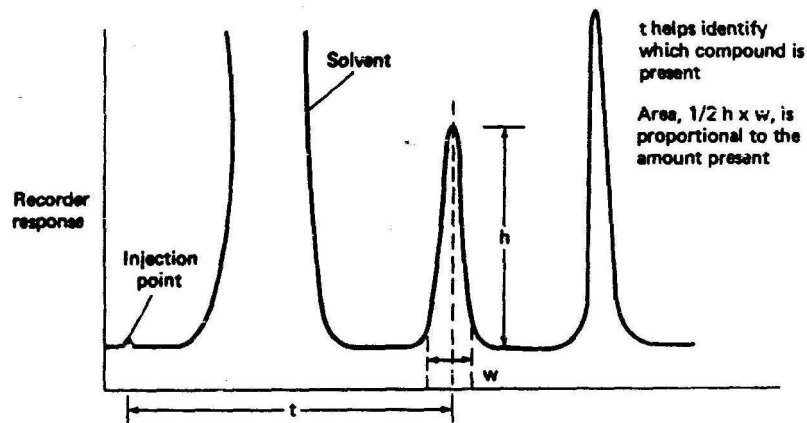
Usando un detector de conductividad térmica.

La cromatografía de gas es una medida de cuantificación de venenos, drogas, y alcohol en sangre y muestras de orina.

Una muestra (líquido o gas) se inyecta hacia una columna caliente con un material capaz de separar los componentes de una mezcla dentro de las partes individuales.

Muestras conocidas o desconocidas solo son inyectadas dentro de la misma columna, los componentes desconocidos son identificados, usando las concentraciones de los ejemplos de los estándares conocidos permitirán la cuantificación de un compuesto desconocido por una comparación de las muestras será asignada la cuantificación de las muestras desconocidas para un ejemplo de área máxima de muestra el o alturas como se muestra en el papel registrador la gráfica.

Figura 4. Muestra un típico cromatograma. Para las crestas máximas, la altura es proporcional para concentración a un tiempo amplio.



Se usó un cromatógrafo de gas con un detector de conductibilidad térmica (TC). El instrumento no es capaz de detectar concentraciones muy bajas de compuestos que deben estar en la forma de un gas por lo que las cantidades pequeñas de alcohol en sangre no serían útiles para el análisis. En cambio, su muestra será una mezcla de dos alcoholes, un etanol, y n-propanol. El n-propanol se usarán como un comparación del compuesto (estándar interno), y el etanol es la sustancia a ser medida. La mezcla se inyecta en el cromatógrafo de gas, vaporizado por el bloque inyección caliente, y entonces atraviesa la columna. Los componentes están separados por la columna que condensa el material y pasan encima del elemento del detector. La interacción de las moléculas con filamentos del detector se convierte en una señal eléctrica, pasado a un dispositivo magnetofónico, e impreso fuera como una cresta en una gráfica. La altura de la cresta se usará como una representación de la cantidad de sustancia detectada, y por consiguiente, presente en la muestra.

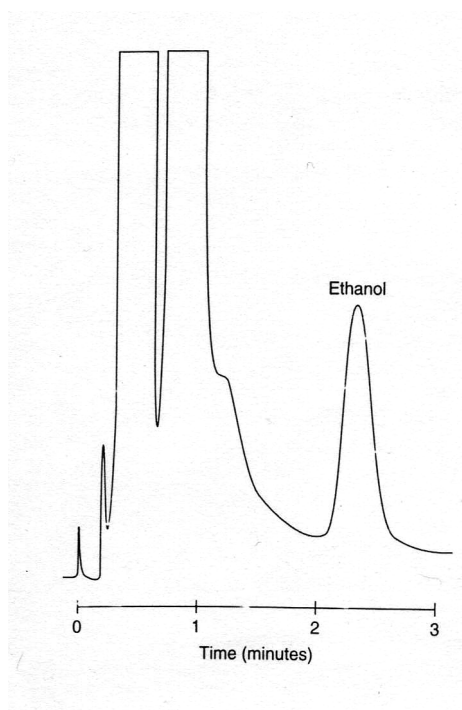
## **EL ANÁLISIS DEL ALCOHOL EN SANGRE POR CROMATOGRAFÍA DE GAS-LÍQUIDO USANDO UN DETECTOR EN IONIZACIÓN DE LLAMA (AVANZADOS)**

El análisis dado es un método para determinar el contenido de alcohol por el porcentaje normal en una muestra de orina o de sangre. Este análisis es útil cuando un operador del vehículo es sospechoso de la ser bajo la influencia del alcohol.

La cromatografía de gas empleado en el análisis está provisto equipo de detector de ionización de flama. Este detector es muy sensible para cantidades de alcohol muy pequeñas. Este detector es aproximadamente 100 veces más sensible que los detectores de TC. Esto hace que el detector sea muy útil para el análisis del alcohol o drogas en muestras de sangre u orina.

Otro procedimiento desarrollado para el análisis del alcohol involucra la oxidación del etanol. Esta reacción se lleva a cabo en presencia de la enzima alcohol deshidrogenasa y de un dinucleotido la coenzima NAD.

Como se da el proceso de oxidación el NAD se convierte en otra especie química en NADH.



**Cromatografía de gas.  
Determinación de etanol  
en sangre.**

El grado de esta conversión es medida por espectrofotometría y es relativo a la concentración de alcohol.

Este ensayo se aproxima al alcohol en sangre es normalmente asociados con instrumento usados en clínicas y hospitales.

Por otro lado los laboratorios forenses normalmente utilizan cromatografía de gas para determinar el contenido de alcohol en sangre.

Los tiempos de almacenamiento prolongado, reduce los niveles de alcohol en sangre.

La colección de muestras de sangre después de la muerte para determinación de alcohol requiere precauciones en comparación de la colección para individuos vivos. El etanol en individuos muertos generalmente hay acción bacteriana. En consecuencia el número es superior en las muestras de sangre de diferentes partes del cuerpo

Esto puede ser demostrado usando humor vítreo y sangre no experimenta después de la muerte.

**D) FOTOMÉTRICO:** atenuación de la energía de radiación en la reacción de acoplamiento donde  $ADH^+$  cataliza la oxidación del etanol y el  $NAD^+ + H$  se reoxida en presencia de una diaforasa con la reducción del idonitrotetrazolio violeta a formazan. Este producto absorbe a 492 nm en un espectro de emisión fluorescente.

**E) ELECTROANALÍTICO.** (+0.8v vs. ag/agcl) determinación electroquímica de la formación de  $NAD^+ + H$  en la oxidación por  $ADH^+$ .

#### **F) DETERMINACIÓN DE ALCOHOL ETÍLICO POR MICRODIFUSIÓN (MÉTODO DE CONWAY)**

Este método se basa en que si una sustancia volátil y un disolvente puro se mantienen en compartimentos separados pero en contacto con la misma atmósfera el soluto volátil.

Tendería a disolverse en el disolvente puro. Finalmente, esto implicará una difusión del soluto desde la solución original al disolvente. Este proceso ocurrirá hasta alcanzar el



equilibrio, pero si en lugar del disolvente 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.

Experimentalmente se realiza la difusión del alcohol sobre una mezcla oxidante del dicromato de sodio o dicromato de potasio en ácido sulfúrico.

La primera publicación sobre un análisis de humor vítreo, con objetivo toxicológico, fue el análisis de etanol en 1966, cuando dos autores Stuner y Coumbis, (8) se propusieron comparar los niveles de alcohol etílico en sangre y humor vítreo y sus respectivas desviaciones estándar. Contemplaron que el promedio de la desviación estándar es de 0,011 y consideraron que hay una variación mayor en los casos con niveles elevados de alcohol etílico. En dos casos, hallaron niveles bajos de alcohol etílico en humor vítreo, uno de 0,037 y otro de 0,029 mg por 100 ml y no encontraron alcohol etílico en sangre. Reflexionaron que hay una íntima correlación entre los niveles de alcohol etílico en sangre y el humor vítreo.

Leahy (9) en 1968, con la reducción del dicromato de potasio, observó en 20 casos, buena concordancia entre las concentraciones de alcohol etílico en sangre y humor vítreo, principalmente cuando la concentración en sangre es menor a los 0.20 g /100 ml; en el aumento de las concentraciones de alcohol etílico en sangre, aumentan las concentraciones de etanol en humor vítreo. Con la enzima alcohol deshidrogenasa observó en 10 casos, concentraciones positivas de etanol en sangre y humor vítreo y determinó que existe una buena correlación entre los valores de sangre y humor vítreo; buena correlación de los resultados con los procedimientos del dicromato y enzimático; esto quiere decir que los alcohólicos tienen mas etanol en humor vítreo que en sangre.

Olsen (10) en 1971, en un estudio y con una nueva técnica in vivo, sobre la relación de la penetración de alcohol al humor vítreo, de un conejo albino, y referente a las concentraciones de alcohol en sangre y humor vítreo en relación con el tiempo; observó desde el punto de vista gráfico, que la concentración de alcohol en sangre mostró una caída casi lineal, mientras que la concentración de alcohol en humor vítreo registró un ascenso lineal hasta lograr un equilibrio después de 210 minutos (relación alcohol= 0,79); después de este tiempo, ambas concentraciones tuvieron una caída paralela, Relación alcohol=alcohol sangre/ alcohol humor vítreo.

Norheim (11), observó en 1972, que la determinación de alcohol *postmortem* es una parte importante en la práctica de la química forense que, además de la sangre se deben estudiar otros más convenientes en algunos casos puede ser de gran interés conocer algo acerca del intervalo de tiempo a partir del consumo de alcohol al momento del fallecimiento, varios autores también ya habían hecho determinaciones simultáneas de alcohol en sangre y en humor vítreo, por lo que Norheim elaboró su estudio, para determinar simultáneamente la concentración de alcohol en sangre y en humor vítreo de 73 cuerpos, con el método de alcohol deshidrogenasa. En sus resultados observó que el contenido de alcohol en las diferentes muestras de sangre /humor vítreo.

La relación entre el contenido de alcohol en sangre y en humor vítreo puede ser en algunos casos de valor para calcular el tiempo entre el consumo de alcohol y la muerte.

Coe (12) En 1976, observó 10 casos positivos para etanol, como resultado del embalsamamiento. En ocho de estos diez casos la diferencia de la concentración entre el ojo derecho pre-embalsamado y el ojo izquierdo post-embalsamado fue insignificante. Las concentraciones de alcohol en el ojo derecho variaron de 0,05 a 0,26% (50 a 260 mg/100 mL), de éstas en cuatro fueron de 0,21 a 0,26% (210 a 260 mg/100 mL); las concentraciones de alcohol en el ojo izquierdo variaron de 0,02 a 0,21% (20 a 210 mg/100 mL), de éstos en dos casos fue de 0,21% (210 mg/100 mL).

Caughlin (13) en 1983, concluyó en su estudio en el que determinó la concentración de etanol en sangre obtenida de corazón intacto o de vena femoral y de especímenes de humor vítreo, obtenidos de 61 cadáveres que, no existe una relación de distribución exacta, que pueda ser empleada para convertir una concentración de alcohol en humor vítreo a una concentración de alcohol en sangre, en cualquier momento. Estudios previos habían demostrado relaciones de distribución que variaban con un promedio que generalmente era mayor al que se esperaba teóricamente, estos estudios debían ser considerados a la luz de varios factores, como: error del método analítico, una predisposición inadvertida a partir del número de especímenes estudiados, la naturaleza *postmortem* de los especímenes de sangre y de humor vítreo y la fase de la curva de alcohol en sangre al tiempo del fallecimiento; factores que pueden llevar a cabo la relación de distribución sangre / humor vítreo. Cuando estos factores son eliminados o controlados en razón de datos a partir de la fase de eliminación de la curva de alcohol en

sangre, entonces la relación de distribución se aproximará a 0,81, como se predijo a partir de consideraciones teóricas. Caughlin hizo énfasis que, si el analizador tenía muestras de sangre y de humor vítreo, era esencial establecer la integridad de la concentración de alcohol de cada uno de los especímenes, principalmente de la sangre, antes de hacer cualquier conclusión, en cuanto a la fase de la curva de alcohol en sangre al tiempo del fallecimiento. Para este autor, en su trabajo, fue conveniente emplear una relación de distribución teórica de 0,81 para acercarse a una concentración de alcohol en sangre, de una persona quien hubiese fallecido en la fase de eliminación de su curva de alcohol en sangre. Este procedimiento se calcularía la concentración de alcohol en sangre de una persona que haya fallecido en su fase de absorción. Generalmente esto es considerado, salvo desde un punto de vista forense. En una u otra situación, se debe buscar otra evidencia para corroborar, apoyar o negar cualquier suposición que se haya llevado a cabo. Para un investigador o para un tribunal de justicia, debe ser claro que este tipo de interpretaciones son de ayuda, pero que tienen varias limitaciones sobre su confiabilidad que dependen de la situación del caso.

Jollymore y col, (14) en 1984 elaboraron un estudio, en el cual, se propusieron un doble objetivo. En primer lugar, determinar la relación de alcohol en sangre / humor vítreo con base a un caso disponible. En segundo lugar, se esperó que este estudio reprodujera los datos del trabajo de Caughlin(13) de 1983, aun prestando apoyo a su evidencia a través de una distribución bimodal de relaciones ya sea en fase de absorción o de eliminación. Estos autores a través de su estudio demostraron una relación media de alcohol sangre / humor vítreo de 0,80, con una desviación estándar de 0,4 y una variación de 0,57-1,75. Estos datos para Jollymore y colaboradores representaron un acuerdo muy cercano con las relaciones medias esperadas de 0,79 ó de 0,81. Caughlin un año antes, en 1983, había publicado una hipótesis para explicar los resultados de su trabajo en base a una distribución bimodal. Empero, Jollymore y colaboradores con su estudio no pudieron apoyar la hipótesis de Caughlin; para ellos fue evidente que el factor de conversión de 0,81 lleva a un nivel de alcohol en sangre calculado, el cual, es mayor al nivel de alcohol en sangre observado en el 66% de los casos, es decir en 27 de 41 casos. Esto, para dichos autores, tiene situaciones importantes, debido a que el nivel de alcohol en sangre que se basa en el nivel de alcohol en humor vítreo, puede ser aceptado como evidencia en un tribunal de justicia. Por lo tanto, para que haya más confiabilidad en un nivel determinado de alcohol en sangre a partir de un nivel de

alcohol en vítreo, se debe usar la relación más baja de sangre / humor vítreo. El valor en este estudio de Jollymore y colaboradores fue de 0,57. Empleando tal valor y una concentración de alcohol en sangre de 80 mg/dl, el nivel de alcohol en humor vítreo sería de 140 mg/dl. Así, cuando el nivel de alcohol en humor vítreo es de 140 mg/dl ó mayor, el nivel de alcohol en sangre correspondería a 80 mg/dl ó mayor. Esto no significa una media, sin embargo, la relación teórica de alcohol sangre / humor vítreo de 0,79 ó de 0,81 es errónea. En principio, después de una ingesta de alcohol, aumenta más rápidamente la concentración de alcohol en sangre, que la concentración de alcohol en humor vítreo. Por lo tanto, la relación de alcohol sangre / vítreo, sería elevada. Conforme el equilibrio se va alcanzando, la relación de alcohol sangre / humor vítreo tiende a disminuir y se va acercando al valor teórico de 0,81. En equilibrio la distribución es de 0,81. Hentsch y Muller, (15) sugirieron que el equilibrio se alcanza a las dos ó tres horas después de la ingesta de alcohol. Felby y Olsen (16) en 1969, sugirieron que una relación de alcohol sangre / humor vítreo mayor de uno indica que el fallecimiento se presentó antes de que la fase de equilibrio se haya alcanzado. En dos casos del estudio de Jollymore y col., la relación de alcohol sangre / humor vítreo fue mayor de 1,0 (1,30 y de 1,75); los autores investigaron la historia de cada uno de los casos; en uno fue por suicidio violento y la relación fue de 1,75, es posible que el alcohol haya sido ingerido por la fuerza y poco antes del suicidio; la manera del fallecimiento del segundo caso fue accidental, por ahogamiento, dónde otra vez, es factible que el alcohol lo haya ingerido poco antes del accidente, y es concebible que sea un factor mayor de contribución. En el estudio de Jollymore y col., no se presentó ninguna reproducción de los datos del trabajo de Caughlin (13) fue evidente que la relación promedio y teórica de sangre / humor vítreo no era conveniente para ser empleada en un contexto médico-legal. Dado que se puede presentar en un tribunal de justicia, un nivel de alcohol en sangre, fundamentado en una concentración de alcohol en humor vítreo, es importante que no se presente un sobre cálculo del nivel de alcohol en sangre. Por eso es razonable emplear la relación más baja de alcohol sangre / humor vítreo en dichas relaciones. En el estudio de estos autores, la relación de distribución más baja fue de 0,57. Esto media que, un nivel de alcohol en humor vítreo de 140 mg/dl corresponderá a una concentración de alcohol en sangre de 80 mg/dl. Cualquier nivel de alcohol en humor vítreo por debajo de 140 mg/dl puede ser importante, sin embargo, como esto indica en si mismo una ingesta de alcohol, puede representar cierto grado de deterioro.

Yip(17) observó en 1995 que, a Pounder y Kuroda(21) les fue inadvertido el artículo de Chao(18) de 1993 sobre la relación entre los niveles de etanol en humor vítreo y sangre. Chao y col., reprodujeron la distribución bimodal y obtuvieron resultados similares, empleando el método de Yip y Shum(19) sobre la correlación de los niveles de alcohol en humor vítreo y sangre en la fase de absorción tardía y en la de eliminación. Yip y Shum emplean con seguridad las ecuaciones de regresión derivadas de los datos indicados por los niveles de alcohol en orina / sangre, para tener que calcular, a partir de casos post-equilibrio el nivel mínimo de alcohol en sangre con el nivel de alcohol en humor vítreo, en casos dónde la sangre está contaminada ó no está disponible. Además, Chao menciona en su artículo que la interpretación de alcohol en especímenes *postmortem* es complicada por la presencia de alcohol producido por fermentación microbiana, y aclara que, este problema es minimizado por el análisis de humor vítreo, ya que este líquido esta razonablemente protegido de la actividad microbiana y permanece relativamente constante después de la muerte, por consiguiente la concentración de alcohol en humor vítreo es usada comúnmente para confirmar la determinación de una concentración de alcohol en sangre *postmortem*. En un caso donde la orina no esta disponible la relación de alcohol en sangre / humor vítreo también puede ser empleada con seguridad para deducir si el individuo murió durante la fase de absorción o no. Para Yip y Shum los niveles de alcohol en humor vítreo son de valor limitado en la mayoría de las circunstancias.

Kraut (20) también observó en 1995 que, Pounder y Kuroda (21) concluyeron en su trabajo que, el cálculo de una concentración de alcohol en sangre a partir de una concentración de alcohol en humor vítreo fue de poco valor práctico debido a la inseguridad asociada con el cálculo. Kraut reflexionó que, estaría buscando la manera de hacer un cálculo para una concentración de alcohol en sangre a partir de una concentración de alcohol en humor vítreo de más valor para el investigador que la publicada por Pounder y Kuroda (21) en 1994; estos autores determinaron la inseguridad del cálculo de la concentración de etanol en la sangre por el empleo de un intervalo de predicción que se basa en una distribución tomada como normal para cada concentración de humor vítreo; que los resultados analíticos fueron mucho más cercanos a la línea de regresión que, a la línea de predicción del 95%, particularmente con los datos en la variación de 0-200 mg/% (0-200 mg/100 ml). Kraut con su experiencia de más de 350 casos en la primera propuesta que hace en un caso típico, es

una relación de CAHV / CAS de 1,1-1,5, y es lo que emplea para calcular una concentración de alcohol en sangre a partir de una muestra de humor vítreo aceptable, haciendo dos suposiciones básicas: (1) que no haya bebidas alcohólicas importantes dentro de los 30 minutos del suceso; (2) que el fallecimiento haya ocurrido dentro de los 30 minutos de la ingesta de bebidas alcohólicas.

Kraut,(20) Pounder y Kuroda no propusieron una variación para una relación que pudiera ser empleada al valorar si una concentración de alcohol en humor vítreo corrobora una concentración de alcohol en sangre. Si la variación es equivalente a su intervalo de predicción, luego una concentración de alcohol en humor vítreo dada corroborará una variación amplia de la concentración de alcohol en sangre. Además se deben considerar otros factores, principalmente si la relación CAHV / CAS no cae dentro de la variación 1,1-1,5 y tales factores serían: condición de la muestra, fuente de la muestra, condición del cuerpo, estado de putrefacción, intervalo de tiempo entre el incidente y el fallecimiento, tiempo entre el último trago y el incidente, enfermedad, tratamiento hospitalario y volúmenes de líquidos administrados.

Pounder y Kuroda (21) en 1995, contestaron a Yip y Shum(19) y a Kraut(20), que ellos se dirigieron al problema de predecir la concentración del alcohol de la sangre (CAS) a partir de la concentración de alcohol de humor vítreo (CAHV) en un caso individual en el cual eran desconocidas las circunstancias asociadas al consumo del alcohol y muerte y ninguna de éstas era asumida. Los datos de referencia que los autores usaron eran los apropiados para este problema. Sin embargo, Kraut (20) estaba en lo correcto al señalar que si la información de las circunstancias eran disponibles ó si las tomas se hicieron entonces puede ser posible estrechar el rango del CAS predicho. Desgraciadamente, para muchos casos esta información, fue incompleta, y esto sucedió así en 47 de los 117 casos estudiados por Kraut (20). Aunque Pounder y Kuroda no se encerraron en su publicación, ellos observaron la posibilidad de mejorar la predicción de la CAS desarrollando las ecuaciones de regresión para los diferentes rangos de CAHV, pero ninguna mejora importante se llevó a cabo. Ellos pensaron que cualquier cálculo de la concentración de alcohol en sangre basado sobre CAHV en un caso individual de fatalidad debe por necesidad, proporcionar en ambas concentraciones un rango de predicción y un grado de certeza con los cuales el verdadero valor caerá dentro de este rango. Kraut (20) usó un rango de CAHV / CAS de proporciones de 1,1-1,5 y no estuvo

claro en sus publicaciones, por qué estos puntos de reducción ó eliminación específica fueron tomados. Sin embargo, usando este acercamiento, una CAHV de 90 mg% (90 mg/100 mL) predice una CAS de 60-82 mg/100 ml (grado de certeza desconocido). La fórmula de Pounder y Kuroda (21) predeciría una CAS de 29-131 mg/100 ml (con 95% de certeza). En un caso forense en particular, trabajar el intervalo de predicción para un caso en especial sería necesario un intervalo de predicción más amplio para la media de la población en conjunto. En otras palabras, si la relación media de la CAHV / CAS para la población en general es de  $1,3 \pm 0,1$ , entonces ese no es el rango verdadero de la relación CAHV / CAS de 1,1 – 1,5 que pueda ser aplicado a un caso individual de fatalidad para predecir la CAS con 95% certeza. Pounder y Kuroda (21) observaron que sus colegas de Hong Kong y Singapur también usaban las relaciones en lugar de las ecuaciones de regresión con los intervalos de confianza, para calcular la CAS a partir de una CAHV; también estos investigadores dividían los casos, en una categoría de absorción temprana ó en una categoría en fase absorción tardía / eliminación sobre las bases a la relación de la CAO / CAS (concentración de alcohol de orina / concentración del alcohol de sangre); no obstante, estos últimos autores reconocen que no existe una certeza total entre los dos grupos. Para la categoría en fase de absorción tardía / eliminación la CAS fue calculada por la fórmula  $CAS = (0,89) CAHV$ . Sin embargo, 0,89 sólo es la relación media y el rango para esta relación en esa categoría fue de 0,32-1,28, desviación estándar 0,19. Por consiguiente Pounder y Kuroda no pudieron estar de acuerdo en el uso seguro de esta aproximación, Sin embargo, reconocen o están de acuerdo con Kraut y Yip que, en casos individuales un informe adicional puede permitir el rango de predicción para ser aún más estrecho. Pounder y Kuroda (21) concluyeron finalmente que, los tribunales requieren de un perito experto y de un testimonio con cierto grado de certeza, calculando la CAS a partir de una CAHV los tribunales de justicia serán mejor advertidos ante una opinión que se basa en el análisis de la regresión proporcionando así un intervalo de predicción del 95%; sin embargo, reconocen, como Kraut y Yip señalaron, que una información adicional puede permitir estrechar el rango predicho en casos individuales.

O'Neal y Poklis (22) en 1996, observaron en los resultados de su estudio que la calidad y lugar de la muestra colectada, traumas en cuerpo, duración entre el tiempo de muerte y la autopsia, presencia de microorganismos en el cuerpo, difusión de bebidas

alcohólicas presentes en el estómago dentro del fluido pericárdico, y difusión de etanol en vómito aspirado dentro de la sangre cardiaca, son factores que influyen en la interpretación de la concentración de etanol en especímenes *postmortem*, entre ellos el humor vítreo.

Hardin (23) en el año 2002, reportó un caso en el cual, la concentración de etanol en sangre tomada de cavidad torácica fue de 0,32 g/dl; el juez, sin más explicación determinó que esta concentración era excesiva: la concentración de etanol en humor vítreo fue de 0,09 g/dl y la relación de CAHV / CAS fue de 0,28. Él reportó que la concentración de etanol en sangre puede estar elevada en relación con la concentración de etanol en humor vítreo por: a) la difusión de etanol del estómago intacto, hacia la sangre de la cavidad torácica durante el intervalo que hay entre el fallecimiento y la autopsia, b) la ingestión de una gran cantidad de etanol poco antes del fallecimiento, y c) contaminación de la cavidad torácica por sangre durante la extracción del corazón y partes óseas.

La concentración de etanol en sangre por si misma habría sugerido que el fallecimiento fue por intoxicación aguda al tiempo del fallecimiento. Este reporte demuestra la importancia de obtener y analizar simultáneamente, muestras de sangre y de humor vítreo al fallecimiento, principalmente en fallecimientos traumáticos. La importancia de la concentración de etanol en humor vítreo es que, 1) puede ser más confiable en casos de toxicología *postmortem* y, 2) que puede poner en duda la concentración de etanol en sangre al tiempo del fallecimiento.

Briglia y col.,(24) en 1992, observaron que, las concentraciones de etanol en humor vítreo son mayores en relación a las concentraciones de sangre de vena femoral, de aurícula derecha y de aorta ascendente; también observaron que las concentraciones de etanol en líquido pericárdico son mayores a las concentraciones de etanol en humor vítreo y a todas las anteriores en el 30,2%; estos autores además, vieron que en veinte ó 33,3% de sesenta casos, las concentraciones de etanol variaron ampliamente entre las diversas muestras de sangre tomadas de un mismo caso y concluyeron que, sus resultados están de acuerdo con el hecho bien establecido que el alcohol se diluye con el agua del cuerpo. Briglia y col., también concluyeron que no hay diferencia significativa en las concentraciones de etanol entre los especímenes tomados de los diferentes sitios



*postmortem*, sin embargo, es evidente que los toxicólogos forenses deben de proceder con extrema precaución en la interpretación de los resultados de alcohol *postmortem*.

Singer y Jones (25) en 1997, estudiaron las concentraciones de etanol, acetona, isopropanol y acetato en un caso forense y observaron, en cuanto a la distribución de etanol, que ésta estuvo muy fuera de lo común observando concentraciones en mg/100 ml en: sangre femoral, 257 y 273 (dos muestras); sangre de corazón, 643; humor vítreo, 763; orina, 84; bilis, 616; hígado, 250; y contenido gástrico, 4660 (2470 mg/53 g). Consideraron que las elevadas concentraciones de etanol en humor vítreo se pueden explicar debido a que el etanol se pudo difundir a través del ojo durante la fase de agonía o *postmortem* por aspiración de contenido gástrico con concentraciones muy elevadas de etanol. Estos autores concluyeron en su estudio que, la causa de la muerte fue atribuida a la combinación tóxica de etanol, acetona, e isopropanol; éste caso demostró la dificultad de usar un solo espécimen *postmortem* para calcular la probable concentración de alcohol en sangre inmediatamente antes de la muerte.

**Fórmulas para obtener la concentración de alcohol en sangre (CAS), a partir de la concentración de alcohol en humor vítreo (CAHV).**

Felby y Olsen (16) en 1969 determinaron en 27 casos, las concentraciones de alcohol, por el método de oxidación con dicromato de potasio y por el método de la alcohol deshidrogenasa, en sangre tomada de vena femoral, corazón, humor vítreo de ambos ojos y de músculos, las concentraciones del alcohol en sangre se compararon con las del humor vítreo de ambos ojos, y con las de los músculos. Los valores de humor vítreo se dieron como valores medios de ambos ojos. Se observó que, con ambos métodos, los valores encontrados representan las concentraciones de alcohol al tiempo del fallecimiento y buena correlación entre los valores encontrados. En 25 de los 27 casos, los valores de humor vítreo fueron más elevados que los valores de la sangre, debido probablemente al contenido más bajo de sustancia seca en éste órgano, el cual es de 1,3%; la relación de las concentraciones de alcohol en sangre a humor vítreo promediaron de 0,7 a 0,8 y está de acuerdo con la relación de los contenidos de agua de la sangre y de humor vítreo la cual es de aproximadamente de 0,8 y con la suposición que el alcohol se distribuye por difusión de una manera equitativa por todos los líquidos

del cuerpo. Observaron que, cuando se ha alcanzado el equilibrio de difusión del alcohol en los líquidos del cuerpo, se debe aplicar la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{Concentración de alcohol en sangre}}{\text{Concentración de alcohol en vítreo}} = \frac{\text{Contenido de agua en sangre}}{\text{Contenido de agua en vítreo}} = \frac{78}{99} = 0.79$$

Estos mismos autores también observaron que, cuando el fallecimiento se presenta, y cuando el equilibrio de difusión ha tenido el tiempo para haber sido alcanzado, entonces:

$$\text{CAS} = 0,73 \times \text{Concentración de alcohol en humor vítreo.}$$

El valor medio de 0,73 es más bajo que el calculado de 0,79, probablemente a que el promedio de sustancia seca en sangre postmortem es superior al 22% debido a la hemoconcentración. Además observaron que, las concentraciones de alcohol en humor vítreo son mucho más elevadas que, en sangre de vena femoral, sangre de corazón, y que en músculos de extremidades superiores e inferiores.

Felby y Olsen, concluyeron en su trabajo que la concentración de alcohol en sangre, dentro de los límites de seguridad, puede ser calculada a partir de las concentraciones de alcohol en humor vítreo, empleando la ecuación de concentración alcohol en sangre:  $\text{CAS} = 0,73 \times \text{CAHV}$ .

Coe y Sherman (40) en 1970, en un estudio de 460 casos, se llevaron a cabo las determinaciones simultáneas de alcohol en sangre y humor vítreo; de éstos, 174 tuvieron alcohol demostrable en sangre, humor vítreo o en ambos especímenes. Por el análisis estadístico de los datos de los 174 casos y por el cálculo del factor de conversión más adecuado, para convertir la concentración del alcohol de humor vítreo a concentración de alcohol en sangre con el 95% de confiabilidad, se obtuvo un valor de  $0,89 \pm 0,023$ , que es para determinar la concentración de alcohol en sangre a partir de un valor medido en humor vítreo. El mejor cálculo para obtener la concentración de alcohol en sangre es  $= 0,89 (\pm 0,023) \times \text{concentración de alcohol en humor vítreo}$ .

Los autores revisaron los resultados de tres series previamente publicadas y los trataron con el método del cálculo del factor de conversión (Tabla 5) y observaron que la relación en estas tres series varió de 0,75 a 1,01, probablemente, por: (1) diferencias en la especificidad del método analítico empleado, (2) errores de laboratorio, y (3) prejuicios inadvertidos a partir del número de casos en cualquiera de las dos fases, de absorción o de eliminación del alcohol en el cuerpo, en particular en una serie pequeña de casos.

**Tabla 5. Factor de conversión encontrado por diversos autores**

<i>Autor</i>	<i>Año</i>	<i>No. casos</i>	<i>Factor de conversión*</i>
Sturner y Coumbis	1966	40	0,01 ( ± 0,04 )
Leahy et al	1968	20	0,92 ( ± 0,03 )
Felby y Olsen	1969	27	0,75 ( ± 0,05 )
Coe y Sherman	1970	174	0,89 ( ± 0,02 )

\* El paréntesis contiene el 95%, el límite de confiabilidad del cálculo.

Las variaciones anteriores están de acuerdo con los trabajos de investigación básica, que han reportado que el etanol puede pasar rápidamente al ojo. Se ha observado que, en la penetración simultánea al humor vítreo, de 21 animales, de alcohol etílico y de otras sustancias no electrolíticas como etilurea, metilurea, tiourea y creatinina, el alcohol etílico es el que pasa con mayor celeridad al humor vítreo, y su máxima concentración en equilibrio se encuentra en menos de treinta minutos.

Backer y Pisano (26) en 1980, encontraron que, cualquier cálculo sobre la concentración de alcohol en sangre, fluido fisiológico ó tejido, sólo se puede expresar dentro de un rango amplio de concentración (Tabla 6).

**Tabla 6. Rangos de concentración para alcohol en diversos fluidos**

<i>Fluidos biológicos/casos</i>	<i>Rango de alcohol en sangre g/100 mL</i>	<i>Proporción media</i>	<i>Rango</i>
Vítreo / sangre 110	0,046-0,697	1,05 0,48-	1,72
Cerebro / sangre 33	0,072-0,388	0,86 0,64-	1,20
Bilis / sangre 89	0,046-0,697	0,99	0,48-2,04
Fluido espinal / sangre 54	0,046-0,697	1,14	0,79-1,64
Orina / sangre 92	0,046-0,697	1,16 0,53-	2,17

**Tabla 7. Predicciones de la CAS en diversos fluidos para etanol**

<i>casos</i>	<i>correlación</i>	<i>m</i>	<i>b</i>	<i>Estimación de error estándar</i>
Vítreo / sangre	0,92	0,96	0,029	± 0,051
Cerebro / sangre	0,91	0,86	0,000	± 0,035
Bilis / sangre	0,92	0,99	0,005	± 0,048
Fluido espinal / sangre	0,96	1,03	0,028	± 0,041
Orina / sangre	0,88	0,91	0,029	± 0,063

Backer y Pisano (26) también expusieron que la fórmula para calcular la concentración de alcohol en sangre, es a partir de la concentración de alcohol en otro fluido ó tejido es:  $a - b / m$ , donde:  $a$  = concentración medida,  $m$  = pendiente de la línea de regresión lineal, y  $b$  = a la intercepción de la línea de regresión lineal. Estos autores observaron que, durante el cálculo se puede presentar dos veces el error estándar, el cuál se puede agregar ó substraer de la concentración de alcohol en sangre (CAS) calculada, para así lograr un nivel de confianza del 95%. Así, un cálculo de la muestra usando los datos de la Tabla 7 y una concentración de alcohol dada en humor vítreo de 0,20 g/100 ml sería:

$$\frac{0,20 - 0,029}{0,96} = 0,17 \quad 2 \times 0,05 = 0,10 \quad \text{CAS} = 0,17 \pm 0,10$$

Los autores observaron que, pocos estómagos exceden niveles de alcohol de 5000 mg/100 ml en contenido gástrico. Este hecho les indicó que la absorción de alcohol en estómago es muy rápida y eso dio apoyo a la teoría de que esa fase puede predecirse en

base a los niveles de alcohol en estómago. En su estudio, los niveles de alcohol de 0,5 g/100 ml fueron escogidos arbitrariamente como la media entre la fase de absorción y post-absorción. Los casos con concentraciones de alcohol menores a 0,5 g/100 ml de contenido gástrico fueron considerados en la fase de post-absorción y los otros fueron considerados en fase de absorción. Los datos también revelaron que la distribución teórica de los valores de alcohol en muchos casos, eran muy cercanos al valor real cuando la concentración de alcohol en el estómago fue menor a 0,5 g/100 ml. Recalculando la concentración de alcohol en sangre y de la concentración de alcohol en cerebro, humor vítreo, fluido espinal, y orina se mejoró significativamente el error estándar del calculado para casos en los cuales la concentración de alcohol en estómago fue menor a 0,5 g/100 ml. Ya Felby y Olsen en 1969 habían excluido esos casos, en los cuales el valor de alcohol en humor vítreo era menor al valor de alcohol en sangre, por consiguiente limitando sus casos a esos que eran más probablemente post absorbidos.

Backer y Pisano (26) concluyeron, que en la ausencia de sangre para análisis cuando la concentración de alcohol en el estómago es menor a 0,5 g/100 ml, entonces el cerebro, fluido espinal ó humor vítreo se pueden emplear para calcular la concentración de alcohol en sangre.

Por lo tanto, el humor vítreo puede ser un espécimen muy confiable para calcular la concentración de alcohol en sangre, en los casos en los cuales, la concentración de alcohol en el estómago sea menor de 0,5 g/100 ml y cuando la concentración de alcohol en el estómago no se obtenga ó sea mayor a 0,5 g/100 ml, el uso de bilis podría ser el más recomendado para calcular la concentración de alcohol en sangre, esto fue porque la bilis tuvo el error más pequeño, cuando la concentración de alcohol en estómago fue mayor de 0,5 g/100 ml.

Yip y Shum (19) en 1990, con los resultados de su trabajo concluyeron que, si es permitido un margen de error adecuado, entonces se podrá usar con toda seguridad la ecuación  $S = 0,76 V + 4,7$  para calcular el nivel mínimo de alcohol en sangre en casos donde la sangre no sea la adecuada o no este disponible para hacer el cálculo de alcohol. Esto podría subestimar el nivel de alcohol en casos de muerte ocurrida en la fase de absorción, pero en una situación médico-legal sería más conveniente para un patólogo forense basar sus opiniones sobre niveles mínimos en los cuales el pueda estar seguro en casos donde la orina no se pueda obtener, la relación sangre / humor vítreo puede ser

usada para inferir la fase en la cual la muerte ocurrió: una relación de sangre / humor vítreo más grande que 0.95 indica muerte en la fase de absorción. Debe notarse que la proporción inversa no es válida.

Pounder y Kuroda (21) en 1994, midieron las concentraciones de etanol en humor vítreo y sangre de 345 casos, a través de una ecuación de regresión lineal simple, la cual describe una relación entre la concentración de etanol en humor vítreo y la concentración de etanol en sangre en la fase absorbente *postmortem*. La ecuación de regresión ( $n = 345$ ) con intervalo de predicción de 95% fue para la concentración de alcohol en sangre =  $3,03 + 0,852 \text{ CAHV} \pm 0,019$  y con el intervalo de predicción del 99% que fue para la CAS =  $3,03 + 0,852 \text{ CAHV} \pm 0,025$ . La desviación estándar residual de la CAHV fue de 26 mg /%, el error estándar del declive 0,0098 y el intervalo de confianza del 95% para el declive 0,833-0,871. El error estándar de la ordenada fue de 2,34 y el intervalo de confianza de 95% para la ordenada  $-1,57$  a  $7,63$  no siendo significativamente diferente de cero. Aunque el análisis de regresión, permite el desarrollo de un modelo para predecir la concentración de alcohol en sangre dando un valor específico a la concentración de alcohol en humor vítreo, este análisis da origen a un intervalo de predicción muy amplio, como para ser de uso práctico real, a partir de una perspectiva cuantitativa. Sin embargo, las mediciones de alcohol en humor vítreo son un medio muypreciado para corroborar el valor de alcohol en sangre ya conocido. El reanálisis de los datos proporcionados en estudios previos confirma este punto de vista. El intervalo de predicción no puede ser perfeccionado ó mejorado apreciablemente por el desarrollo de series de casos más grandes. Sin embargo, las determinaciones de alcohol en humor vítreo permanecen o están como un medio valioso para corroborar un valor de alcohol en sangre ya conocido.

Caplan y Levine (27) en 1990, elaboraron un estudio de 347 casos con etanol positivo en sangre y observaron que la relación media de las concentraciones de etanol en sangre a etanol en humor vítreo es de 1,7, la cual es consistente con las consideraciones teóricas y con los datos previamente reportados. El estudio lo dividieron en tres grupos: el primer grupo, consistió de 41 casos que tuvieron etanol positivo en sangre mayor de 0,01 g/dl y etanol en humor vítreo menor de 0,01 g/dl; esto sugirió a los autores, que el etanol detectado en la sangre a una concentración mayor de 0,01 g/dL asociado a una concentración de etanol negativa en humor vítreo, que resulta de la formación endógena

de etanol por fermentación *postmortem* más que del consumo antemortem de etanol. El segundo grupo de 101 casos, 67 tuvieron etanol en sangre una concentración de menos de 0,10 g/dl y etanol en humor vítreo dentro de 0,02 g/dl. El tercer grupo de 205 casos con etanol positivo en sangre en una concentración igual a / ó mayor a 0,10 g/dL; para estos casos, el etanol en humor vítreo en relación con el etanol en sangre se tuvo que calcular. Caplan y Levine (27) concluyeron en base a sus grupos, que una concentración de etanol en sangre de 0,05 g/dl tiene la oportunidad del 87% de estar asociado a una concentración positiva de etanol en humor vítreo; así mismo que una concentración de etanol en sangre mayor a 0,05 g/dl, tiene la posibilidad del 99% de estar asociada a una concentración positiva de etanol en humor vítreo. Las concentraciones de etanol en sangre de menos de 0,03 g/dl frecuentemente están asociadas con concentraciones negativas de etanol en humor vítreo, lo que implica que pudo haber ocurrido fermentación *postmortem*.

Levine y Caplan (27) en 1993, observaron que la concentración de etanol en sangre postmortem especialmente de aquella de menos de 0,05 g/dl, puede ser dudosa debido a que puede ser el resultado de una formación de etanol *postmortem*. Los autores observaron que para eliminar esta incertidumbre existe un método usado por los toxicólogos que es el análisis de múltiples especímenes para etanol. Dos de los especímenes más usados por dicho método es el análisis de humor vítreo y orina, porque son los menos susceptibles al proceso de putrefacción. En los casos con una concentración de alcohol en sangre de 0,01 g/dl el 54% se asocia a una concentración positiva de etanol en humor vítreo y orina, este porcentaje se incrementa al 63% cuando la concentración de alcohol en sangre es igual a 0,02 g/dL. 73 y 92% de los casos tuvieron un espécimen alterno positivo si la concentración de alcohol en sangre fue de 0,03 g/dl y 0,04 g/dl, respectivamente. Esto sugirió a los autores que en la ausencia de información adicional, una concentración de alcohol en sangre de 0,04 g/dl o más alto probablemente resulta de un consumo de etanol. Levine y Caplan (26) concluyeron que, una suposición en la interpretación de los datos, es que un CAHV y / o CAO positivo indica consumo antemortem y no formación de etanol *postmortem*. Aunque la glucosa esté presente en el humor vítreo, la contaminación del fluido por microorganismos es limitada durante etapas tempranas del proceso de descomposición.

Clark y Jones (29) en 1982, estudiaron el humor vítreo y la sangre de 26 cadáveres intactos de 4 horas de fallecimiento y en refrigeración, para ver si era posible la síntesis de etanol, por acción de las bacterias sobre la glucosa de la sangre de estos cadáveres. Observaron que el alcohol no se detectó en el humor vítreo ni en la sangre; en ningún caso hubo un valor de etanol en humor vítreo o en sangre mayor de 10 mg/dl; los valores de etanol fueron de menos de 10 mg/dl en 13 casos con resultados de cultivo negativo; estos datos sugirieron que la producción de etanol de nuevo por el metabolismo microbiano no se presenta en cuerpos intactos; la detección de etanol bajo tales condiciones indica que el etanol se consumió en vida poco antes al fallecimiento.

Zumwalt y Bost (30) en 1982, estudiaron 130 cuerpos humanos en descomposición para valorar el grado de putrefacción y para cuantificar las concentraciones de etanol en sangre, orina y humor vítreo de estos cuerpos. Los autores observaron en sus resultados, síntesis endógena de etanol; en sangre en 23 de los 130 cuerpos en descomposición. En 19 de los 23 casos los niveles fueron de 70 mg/dl o menos; en los otros cuatro casos fueron de 110, 120, 130, y 220 mg/dl. La síntesis de etanol endógeno en humor vítreo fue negativa. En el estudio bacteriano del humor vítreo, observaron que, tres no desarrollaron bacterias, tres desarrollaron escasas colonias bacterianas y en uno se desarrollaron media docena de bacterias Gram positivas, es decir, observaron desarrollo de muy pocas bacterias; aun en cultivos de cuerpos en descomposición moderada, la producción endógena de etanol por bacterias en humor vítreo es insignificante. Aunque el humor vítreo contiene glucosa, la infiltración bacteriana no se presentó, ésta se desarrolla en el período tardío del proceso de putrefacción. Así, si se encuentra etanol en humor vítreo éste será de origen exógeno. Estos autores concluyeron que, el humor vítreo tiene preferencia sobre la orina como una muestra fiable en la determinación de alcohol endógeno ó exógeno; además, el humor vítreo por su gran calidad y disponibilidad debe ser empleado con más frecuencia.

Gilliland y Bost (31) en 1993, hicieron un estudio retrospectivo de los resultados de 286 cuerpos en descomposición de los cuales: 64 se encontraron levemente descompuestos (22,4%), 42 presentaron de leve a moderada descomposición (14,7%), 90 mostraron descomposición moderada (31,5%), y 90 estuvieron marcadamente descompuestos (31,5%); y observaron que, la formación *postmortem* ó endógena de alcohol ocurrió en 55 (19,2%) del total de 286 casos descompuestos, similar al 18,7% encontrado en el



estudio original de Zumwalt y Bost (30). En este estudio se observó producción endógena de alcohol, cuyas concentraciones de alcohol se encontraron elevadas en sangre, y en la bilis mientras que las concentraciones de alcohol en humor vítreo y orina fueron negativas o más bajas como para dar una relación atípica de humor vítreo / sangre u orina / sangre. La contaminación bacteriana se presenta en sangre antes que en el líquido del humor vítreo. La concentración de alcohol en sangre más elevada por producción endógena fue de 0,07% (70 g/100 ml), en los casos con otros líquidos negativos. La concentración media de alcohol en sangre fue de 0,06% (60 g/100 ml) y varió de tan elevado como 0,16% (160 g/100 ml) en casos que tienen relaciones atípicas. Los autores concluyeron que la mayoría de los casos con producción endógena de alcohol en sangre alcanzan una concentración de alcohol en sangre tan elevada como 0,15% (150 g/100 ml).

Lima y Midio (32) en 1999, estudiaron las muestras de sangre de cavidad torácica, orina, y humor vítreo de 27 cuerpos con ligera, moderada y severa descomposición, para determinar las concentraciones de alcohol en sangre desde un punto de vista médico legal y para demostrar la utilidad del humor vítreo como líquido biológico para una determinación indiscutible del origen del etanol en cuerpos descompuestos para propósitos forenses. Los autores concluyeron de acuerdo con sus resultados que, la determinación del alcohol en humor vítreo es fundamental para determinar el origen del etanol detectado en la sangre de la cavidad torácica de los cuerpos descompuestos.

Devgun y Dunbar(33) en 1985, estudiaron por primera vez los niveles de gamma-glutamyl transferasa (GGT) en humor vítreo, de 14 individuos que habían fallecido súbitamente o debido a una enfermedad crónica; consideraron que los niveles de gamma-glutamyl transferasa en humor vítreo pudieran ser un buen indicador del abuso crónico de alcohol en individuos que hubiesen fallecido en un accidente automovilístico en carretera. De los 14 casos, solamente en tres muestras de humor vítreo estuvo presente la gamma-glutamyl transferasa, uno de estos fue por intoxicación aguda de alcohol.

Sadler y Pounder (34) en 1996, emplearon, el valor diagnóstico *postmortem* de gamma-glutamyl transferasa (GGT) y transferrina deficiente en carbohidrato (TDC), como marcadores de alcoholismo crónico. La enzima gamma-glutamyl transferasa en

suero (GGT) es una de los marcadores clínicos más frecuentes y tiene una sensibilidad reportada de 39-87% pero una especificidad de 11-50%. Esta pobre especificidad se debe principalmente a las interferencias que producen las enfermedades hepáticas y la terapia con fármacos aunque puede ser espontáneamente elevada por difusión. La transferrina deficiente en carbohidrato (TDC) ha tomado gran interés como marcador clínico del alcoholismo, ofreciendo 83-90% de sensibilidad y 99% de especificidad, pero la fuerza de este valor en el uso *postmortem* es aún desconocido.

Osuna y col., (35) en el año 2000, observaron que los niveles más elevados en humor vítreo de transferrina deficiente en carbohidrato y de alanina- aminotransferasa (ALT), se obtuvieron en el grupo de casos con diagnóstico previo de alcoholismo; 24 de 38 casos (63,15%) mostraron valores, de transferrina deficiente en carbohidrato, mucho más elevados a las 7 UI/L, las cuales, son el valor medio de la transferrina deficiente en carbohidrato en el grupo de no alcohólicos; los niveles de la transferrina deficiente en carbohidrato en el humor vítreo, entre los alcohólicos, varió de 4,7 a 24,5 UI/L. Estos autores sugirieron que los niveles de transferrina deficiente en carbohidrato en humor vítreo son útiles en los casos donde el diagnóstico *postmortem* de alcoholismo se hace difícil por lo inespecífico de los datos disponibles.

### **Pruebas y técnicas recientes para detección de alcohol en humor vítreo.**

Pentilla y col.,(36) en 1990, realizaron un estudio con la prueba de tira de alcosan, para hacer la depuración de alcohol en 52 muestras de humor vítreo y en 41 especímenes de orina de casos de autopsia de tipo forense y de 112 muestras de saliva, de conductores de automóviles con sospecha de ebriedad. La prueba sugiere validez para la depuración cualitativa de alcohol en muestras biológicas, además da información semicuantitativa al instante y confiable; observó que el etanol fue el único hallazgo positivo en todas las muestras analizadas químicamente; esta prueba se comparó con las determinaciones de alcohol en sangre, humor vítreo y orina llevadas a cabo con cromatógrafo de gases con head-space estándar y se observó que hace una buena correlación, con las concentraciones de alcohol en sangre. Este estudio observó finalmente, que la concentración de etanol en humor vítreo con el cromatógrafo de gases con head-space, tiene un coeficiente de correlación de 0,63; y un valor de medida promedio con 1 g/L y con 2 g/L de alcohol acuoso estándar de  $172 \pm 19$  (DS.,n =13) y de  $274 \pm 30$  (DS.,n

=12) respectivamente. El método no da falsos positivos ni falsos negativos. Además, el método da información al instante y es confiable desde el punto de vista semicuantitativo sobre la presencia de alcohol y los resultados sugieren el valor de la prueba en la detección preeliminar de alcohol en muestras de autopsia de tipo forense.

Ferslew y col., (37) en 1995, estudiaron humor vítreo entre otros especímenes con la cromatografía capilar electrocinética micelar (CCEM), con esta ofrecen una nueva técnica analítica para barbitúricos, que es aplicable al análisis forense para líquidos biológicos entre ellos el etanol.

Engelhart y Jenkins(38) en el año 2001, hicieron un estudio para precisar si el dispositivo QED es un aparato útil para determinar los niveles de etanol *postmortem* en saliva y humor vítreo, en casos donde se necesita un resultado rápido. El estudio con el dispositivo QED se llevó a cabo en 165 de 171 casos y demostró que el humor vítreo es la muestra de elección, así mismo el estudio se elaboró hasta con un mínimo de 0,25 ml de humor vítreo, proporcionó resultados exactos empleando una relación promedio de etanol humor vítreo / sangre de 1,2 para concentraciones mayores de 0,04 g/dl. Los resultados del estudio con el dispositivo QED se compararon con los resultados del estudio de las mismas muestras (saliva y humor vítreo) hechas con cromatografía de gases con head-space, observándose un coeficiente de correlación de 0,9931.

Spinosa y Cinira (39) en el 2002 demostraron que, en la micro extracción en fase sólida usando una fibra polar de 85 µm de poliacrilato y cromatografía de gas capilar, es una metodología selectiva y conveniente para la determinación de etanol y otros componentes volátiles en sangre, orina, y humor vítreo. El procedimiento presentado fue simple, sensible, reproducible y permite una excelente cuantificación.

Silvester y col. (41) realizaron pruebas comparativas para determinar la concentración de etanol en humor vítreo y en diferentes partes del cuerpo.

Ellos encontraron que la concentración de alcohol etílico en humor vítreo en relación a la concentración a la vena femoral es (0.94 y 0.98).

La importancia de esta medida es que se usa como evidencia en la corte para determinar en juicios delictivos y civiles.

Se ha encontrado variabilidad en la concentración del alcohol en sangre entre sitios diferentes de la toma de muestra. El objetivo principal de este estudio es determinar el grado de variabilidad, midiendo las concentraciones del alcohol en sangre de cinco diferentes sitios vasculares en nueve casos de personas ya fallecidas.

Las muestras se transfirieron inmediatamente en fluoruro al 2% en un tubo a -18°C. Las muestras se analizaron por cromatografía de gases. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

Los resultados confirman que hay un potencial de error en el análisis de la concentración del alcohol de sangre después de la muerte. Ha sido demostrado en modelos cadavéricos que el alcohol puede difundir del lumen gástrico al ventrículo. Mientras este estudio no buscó demostrar este mecanismo, la magnitud del error que fácilmente se probó en sangre después de la muerte indistinta puede alterar la importancia dada al alcohol como un factor que contribuye a las circunstancias y causa de muerte.

### Concentraciones de alcohol postmortem (mg/100 ml.)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	proporción	rt
Vena femoral	134	256	360	265	26	236	213	102	244	0.94	0.98
Vena axilar	125	253	350	241	16	227	208	80	263	0.85	0.96
Vena yugular	87	246	344	230	19	218	205	57	225	0.77	0.97
Humor vítreo	138	294	-----	294	25	239	249	121	230	-----	-----

La concentración de alcohol en humor vítreo se reflejó más estrechamente con la concentración de alcohol en sangre de la vena femoral.

La relación de sangre y humor vítreo para la concentración de alcohol tiende a mostrar variación entre la absorción y la eliminación de fases en el metabolismo de alcohol en vivo.

Jones AW, Norberg A(42), investigaron la concentración de etanol en sangre arterial, venosa y en aliento después de una infusión intravenosa.

El etanol (0.40g /kg) fue administrado a 13 hombres por vía intravenosa, infusión constante por 30 minutos. La concentración de etanol en sangre arterial, venosa y por aliento fue medida exactamente en 17 intervalos. El etanol en sangre fue determinado por cromatografía de gas y en aliento fue medida con un analizador infrarrojo. La concentración de etanol en aliento fue multiplicado por 2300 a estimar la concentración de alcohol en sangre. La concentración de alcohol en sangre venosa por 10 mg/dl sobre el tiempo y ABAC fue también más alto que BrAC X 2300 alrededor de 4 mg/ dl en promedio. Cuando la infusión de alcohol en ABAC,VBAC, BrAC fue de 94.8 +/- 2.06, 84.7 +/- 1.54 y 89.3 +/- 2.10 mg/dl respectivamente. La concentración de alcohol en sangre en ABAC y VBAC y el aliento decrece bruscamente después de la administración de la obstrucción del alcohol y por 5 minutos posinfusión. Las

diferencias en A-V en concentración de etanol fueron pequeñas o insignificantes. El período aparente de distribución surgen de 7 a 8 mm, ya que alrededor de algunos para ABAC, VBAC, BrAC. El % de etanol desvanecido fue de 15.5 +/- 0.55 mg/dl/h para sangre arterial, 15.2 +/- 0.49 mg /dl /h para sangre venosa y 16.3 +/- 0.73 mg/l/h para aliento no fueron significantes las diferencias (promedio mayor de 0.05). Fue concluido que las diferencias entre A-V en concentración de etanol existen durante la fase de carga pero es rápidamente disminuido cuando la administración de etanol termina, en la fase de absorción el etanol, es mezclado en el agua del cuerpo.

VABC excede a ABAC por aproximadamente 1-2 mg/100 ml en promedio.

Helander A, Jones AW. (43). Estos investigadores trabajaron con 5-HTOL un nuevo marcador bioquímico de alcohol con aplicaciones forenses.

La concentración de etanol en sangre y orina provee una importante evidencia en investigación criminal y litigación civil cuando los crímenes son investigados en relación al alcohol. La determinación de etanol en fluidos del cuerpo es procedimiento de rutina en Química forense y laboratorios de toxicología y en métodos de cromatografía de gas son usados para obtener resultados exactos y precisos. La relación de 5-HTOL/5-HIAA en orina provee un camino provechoso para distinguir entre etanol producido después de la muerte o generando in Vitro. Este artículo describe las aplicaciones de el 5-HTOL/5 – HIAA la proporción como un marcador bioquímico para toma de varias situaciones forenses. Los ejemplos incluyen conductores sospechosos, víctima de violación y autopsias medico-legales donde el análisis de etanol se requiere por el forense.

Levine B. y col. (44). Explican la concentración de etanol después de la muerte.

La interpretación después de la muerte de concentración de etanol (BAC), especialmente aquel que es menor de 0.05 g /dl , puede ser complicado por la formación del después del concentración del bajo de muerte de la del etanol. Un método usado por el toxicólogo a responder esta posibilidad de analizar múltiples especímenes para etanol.

Dos muestras útiles para analizar son humor vítreo y orina, porque estos son menos susceptibles a la putrefacción.

Una negativa de etanol en humor vítreo y orina desean sugerir que el resultado de la medida del etanol para formación después de la muerte.

Los datos fueron colectados por la oficina del jefe de medicina del estado de Maryland y el instituto de fuerzas armadas de patología sobre muestras de sangre con concentración de etanol menores a 0.05 g/dl a desarrollar un principio razonable para interpretación en la falta de otra especie de muestra un total de 38% casos con una BAC entre 0.01 y 0.04 g/dl fueron estudiados por un período de alrededor de 2 años. Los especímenes de humor vítreo y orina fueron disponibles donde se probaron. En un BAC de 0.01 g/dl , el 54% de los casos fueron asociados como positivo la concentración de etanol en orina y humor vítreo. Este % fue incrementado a 63 % en BAC equivalente 0.02 g/dl. El 73 % y 92% de los casos tenían espécimen alterado como positivo de la BAC fue de 0.3 g/dl y 0.04 g/dl respectivamente. En adición el 90% de los casos en donde fueron ambos humor vítreo y orina fueron analizados mostrando los resultados. Ambos especímenes fueron positivos o negativos. Esto es por la falta de información de BAC de 0.04 g/dl o alta probabilidad para la destrucción del etanol.

O'Neal CL, Poklis A. (45). Estos investigadores estudiaron los factores que influyen en la interpretación en la concentración de etanol después de la muerte.

El análisis de etanol es un ensayo realizado frecuentemente en los laboratorios de toxicología forense. La interpretación del hallazgo de etanol es frecuentemente confundido por producción de etanol. Muchas especies de bacterias, levaduras son capaces de producir etanol por una variedad de sustratos. La posibilidad de etanol después de la muerte incrementa la síntesis a una temperatura de almacenamiento y el intervalo entre la muerte y la autopsia. Esto es frecuentemente una dificultad entre la producción de etanol después de la muerte y antes de la ingestión de alcohol. Esta reexaminación presenta una discusión para la identificación de la síntesis de etanol después de la muerte y considerar factores en la interpretación de hallazgo de etanol después de la muerte.

La crítica incluye un caso histórico, de condición de especímenes presente tipos de microbios fluido atípico y distribución de etanol en el tejido. La concentración presente de Etanol y la concentración de otros alcoholes volátiles. Una interpretación válida de

origen del etanol, esta puede ser antes de la muerte la ingestión o después de la muerte la producción de etanol.

Jones A.W, P Holmgren. Estimaron la inseguridad en la concentración de etanol en sangre por análisis de humor vítreo.

Para determinar las concentraciones de etanol en sangre venosa y humor vítreo se obtuvieron durante una necropsia. Se calcularon las proporciones de la concentración de etanol en humor vítreo y sangre venosa (femoral), el intervalo de referencia y los límites de confianza asociados para proporcionar la información de la inseguridad estimando las concentraciones de etanol en sangre venosa indirectamente se midió en humor vítreo.

Las concentraciones de etanol fueron determinadas en las muestras de sangre venosa y en humor vítreo obtenido de 706 necropsias. Las muestras fueron analizadas por duplicado en cromatografía de gas (HS-GC), con una precisión (coeficiente de variación de 1.5% a una concentración pobre de 500 mg/l. El límite de detección de etanol en el cuerpo por HS-GC en un estudio de rutina fue de 100 mg/l.

En 34 casos el etanol fue en humor vítreo a una concentración inferior de 154 mg/l, puesto que la concentración de etanol en sangre venosa fue reportada como negativo (menor de 100 mg/l).

En estos casos se excluyeron de la forma de análisis estadístico. La concentración de etanol en FVB (sangre venosa femoral) fue más alta que en humor vítreo, en 93 casos, con una mínima diferencia de 160 mg/ l (rango de 0 a 900).

La concentración pobre de etanol en FVB (n= 672) fue de 1340 mg /l (SD, 990) comparando con 1580 mg/l (SD, 1190) en VH. La proporción VH (humor vítreo) / FVB etanol fue de 1.19 (SD, 0.285) y el rango de 95% fue de 0.63 a 1.75. La diferencia de la SD fue de 0.063 (SD, 0.109), lo cual da el 95 % de límite de concordancia (LOA) por -0.149 a 0.276. Transformando la parte posterior de la escala original de medida da una proporción de VH / FVB de 1.16 y 95% LOA por 0.71 a 1.89.

Este parámetro estimado están de acuerdo con la proporción de 1.18 y 2.5 th y 97.5 th centiles de 0.63 y 1.92.



La proporción de distribución del etanol (VH / FVB ) muestra un ancho de variación y esto requiere cautela cuando los resultados son analizados en HV en la necropsia se usa para estimar la concentración en FVB, dividiendo la concentración de etanol en VH por 2.00 proporcionarán una estimación de contenido de etanol en FVB, estando menos que el verdadero valor, con un alto grado de confianza.

## **OBJETIVOS**

- Aplicar métodos químicos de presunción y confirmativos de tipo toxicológico que permitan establecer la identificación de etanol, en muestras biológicas (sangre, humor vítreo).
- Reconocer la importancia que tienen los estudios toxicológicos del etanol en el ámbito legal.
- Demostrar las propiedades del humor vítreo y sangre como muestra biológica.
- Analizar la utilidad del humor vítreo y sangre como fluidos biológicos para calcular la concentración de etanol en el cuerpo.
- Presentar las ventajas y desventajas del uso de humor vítreo y sangre en la determinación de etanol, con fines forenses en nuestro país.

## **PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN**

No sería exagerado decir que el alcoholismo es uno de los problemas sanitarios más importantes a nivel mundial. Un consumo tan elevado de un tóxico que afecta directamente el sistema nervioso central y la mayoría de los órganos tiene su reflejo en alteraciones de la conducta y en una amplia y variada morbilidad y mortandad.

## **IMPORTANCIA DEL ESTUDIO**

La mayoría de la gente consume alcohol, esto conlleva a un problema de tipo social. Los problemas que el consumo de alcohol conlleva son incontables que van desde la desintegración de la familia hasta la muerte misma directa o indirectamente del individuo en cuestión. Por eso el estudio de este tipo de intoxicación es de suma importancia desde el punto de vista legal, ya que se puede determinar, en accidentes de tránsito si efectivamente estaba en estado de ebriedad o no, así como en homicidios o delitos sexuales.

Desde el punto de vista estrictamente médico-legal la importancia de la embriaguez surge de la especial resonancia jurídica que este estado tiene, motivada por la variada y completa legislación que abarca los distintos campos del derecho.

Para responder a las diversas exigencias judiciales respecto a la embriaguez, el perito debe establecer no sólo la naturaleza del cuadro clínico y su profundidad, sino también su origen. Dispone para ello de métodos clínicos y bioquímicos.

## LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Varias dificultades se ponen al diagnóstico clínico de la embriaguez. Ante todo, no existe ningún síntoma particular de la embriaguez por otra parte, la resistencia individual frente al tóxico es muy variable, por lo que el juicio, en cada caso concreto, debe ser prudente y nunca generalizador.

Son muchos los procesos que pueden remedar una intoxicación alcohólica, dado que la acción aguada del alcohol sobre el sistema nervioso central no es específica; otros agentes: microbianos, tóxicos, mecánicos y aun psíquicos, pueden producir los mismos efectos bifásicos sobre el cerebro: aparente excitación y luego inhibición. Así pueden suceder con procesos febriles, metabólicos, tóxicos, traumáticos y algunas enfermedades psíquicas.

El diagnóstico deberá hacerse a través de un análisis minucioso, la exploración física completa de los principales sistemas orgánicos, con las pruebas funcionales pertinentes, y los exámenes complementarios de laboratorio.

Los métodos bioquímicos consisten en la dosificación del alcohol en la sangre o en los humores orgánicos, desde donde se pueda deducir la impregnación alcohólica del organismo. Ciertamente la correlación entre el estado clínico y el grado de impregnación alcohólica no es absoluta, como ya se ha señalado, en virtud de ciertas diferencias individuales, tanto en el sentido de una mayor susceptibilidad a los efectos del alcohol en unos sujetos como en una tolerancia superior a la media en otros.

Pese a todo, las múltiples determinaciones han permitido comprobar que tales diferencias son, en general, escasas, por lo que no afectan sensiblemente los resultados. Por otra parte, la interpretación de éstos se hace de forma suficientemente amplia para cubrir las mayores diferencias individuales ya que el trabajo es bibliográfico y no experimental.

## TIPO DE ESTUDIO

Aunque existen investigaciones reportadas en la literatura especializada para determinar la correlación entre la concentración de alcohol etílico en sangre y efecto farmacológico manifiesto 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 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.

## DISCUSION

La alcoholemia es uno de los análisis más solicitados en Toxicología Forense, dada la importancia que el grado de impregnación alcohólica tiene en los distintos campos del Derecho. La determinación de alcoholemia en el cadáver presenta limitaciones analíticas condicionadas por la ausencia de signos clínicos, disponibilidad de muestras biológicas así como por la existencia de fenómenos *postmortem* que podrían modificar dichas tasas: fenómenos de redistribución, cambios físico-químicos, difusión de etanol desde el estómago, pérdidas de etanol y procesos de neoformación, siendo estos últimos los que poseen un origen más definido (síntesis de etanol por la actividad microbiana).

Los diferentes estudios sobre humor vítreo y etanol, han observado, que el humor vítreo por su situación anatómica aislada, está protegido del trauma, de la carbonización, contaminación y putrefacción. Leahy y Farber en 1967 mencionaron, que debido a su posición anatómicamente aislada y al contacto relativamente ligero con células que sufren autólisis después de la muerte, el humor vítreo parece estar menos sujeto a los cambios químicos *postmortem* y es además, fácilmente obtenible para el análisis químico. También, estos estudios han advertido que las muestras de humor vítreo en su momento se presentan ante el toxicólogo y químico forense, como una nueva fuente de

muestras para la determinación de alcohol etílico; son fáciles de obtener en la mayoría de los casos de autopsia; son serosas, claras; analíticamente, son fáciles de trabajar, tienen buena estabilidad química, permiten la interpretación toxicológica requerida en ausencia de una muestra de sangre digna de confianza. El humor vítreo tiene buena estabilidad en las concentraciones de alcohol, debido a la escasa probabilidad de que se desarrolle una microflora que dé origen a la formación de alcohol *postmortem*. Aunque el humor vítreo contiene glucosa, la infiltración bacteriana no se presenta, ésta se desarrolla en el periodo tardío de putrefacción; así, si se encuentra etanol en humor vítreo éste será de origen exógeno. La producción de etanol de nuevo por el metabolismo microbiano en humor vítreo no se presenta en cuerpos intactos, lo que indica que el etanol se consumió en vida poco antes al fallecimiento. En un estudio comparativo sobre la contaminación microbiológica en sangre y humor vítreo *postmortem* se observó que, en ninguna de las muestras de humor vítreo se detectaron números grandes de bacterias u hongos, sin embargo si se descubrieron muchos microorganismos en 32 de las muestras de sangre. En años recientes, algunos autores concluyeron de acuerdo con sus resultados, que la determinación del alcohol en humor vítreo es fundamental para determinar el origen de etanol detectado en la sangre de la cavidad torácica de cuerpos descompuestos. El humor vítreo no requiere de preparación especial para su análisis ya sea por el método de microdifusión o por el enzimático.

El humor vítreo *postmortem* es un medio satisfactorio para la cuantificación de alcohol etílico por métodos analíticos obtenibles en laboratorios químicos.

Estudios previos han mostrado cambios muy intensos y rápidos en la concentración de alcohol en sangre y en varios tejidos del cuerpo después de la muerte. Para obtener una concentración de alcohol en sangre válida y fiable, equivalente a la que circula a través del cuerpo en el momento de la muerte, se necesita analizar un tejido o fluido que esté físicamente aislado del resto del cuerpo y que sea menos sujeto a los cambios bioquímicos *postmortem*. Las mejores muestras son humor vítreo y fluido cefalorraquídeo. Si el equilibrio ha sido alcanzado antes de la muerte (esencialmente la absorción se había completado), esto producirá estimaciones muy confiables de la concentración de alcohol en el momento de la muerte, incluso en los cuerpos quemados (asumiendo que el humor vítreo y la columna vertebral no fueron violados y fueron

preservados). Si la absorción todavía estuviera llevándose a cabo en el momento de la muerte, el alcohol contenido de esos fluidos tendría que estar retrasándose en el resto del cuerpo y se desestimaría la concentración de alcohol en sangre al momento de la muerte.

Como se puede observar el humor vítreo, después de la muerte es una excelente muestra para determinar la concentración de alcohol etílico ya que los investigadores antes mencionados así lo corroboraron.

De todos los métodos descritos en esta investigación, el más adecuado para determinar la concentración de alcohol etílico es por cromatografía de gases por su exactitud y precisión que tiene.

## CONCLUSIONES

El abuso en el consumo de bebidas alcohólicas (alcoholismo), representa uno de los problemas de salud pública más importantes. El alcohol etílico es una sustancia capaz de afectar en mayor o en menor medida (dependiendo del consumo y la habitualidad), casi a la 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 endocrino y sistema inmunológico. Entre los procesos metabólicos que pueden alterarse, se mencionan el metabolismo de vitaminas, minerales, lípidos, proteínas carbohidratos hidratos de carbono. Su detección puede realizarse en sangre o en orina.

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 alteraciones 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.

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.

Se llegó a la conclusión que para la determinación de alcohol etílico *postmortem* las muestras de humor vítreo son muy confiables en comparación si se tomarán muestras de sangre de cualquier parte del cuerpo. Además el método más adecuado es la cromatografía de gases.



## **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)** Enrique Villanueva Cañada, Gisbert Calugig .Medicina Legal y toxicología. 6º ed. Ed. Mosson, Barcelona España 2004. pp 764-780.
  
- 4)** Craig R.C; Modern Pharmacology with clinical applications. 4<sup>th</sup> ed, Ed. Little, Brown and company, Boston. 1994. pp 439-443.
  
- 5)** Wesley Goth, Farmacología Médica.Ed. Mosby división de times Miror de España 1993. pp 342-344.
  
- 6)** Goodman y Gimán. Las bases Farmacológicas de la terapéutica. 8ª edición. Ed. Médica Panamericana. España 1993.pp 369-375.
  
- 7)** Smith. Farmacología. Ed. Médica Panamericana, México, D.F 1993.pp 254-269.
  
- 8)** Sturner W Q; Coumbis R J; The quantitation of ethyl alcohol, in vitreous humor and blood by gas chromatography; Am J. Clin.Pathol **1966;46**: 349-351.
  
- 9)** Leahy M S, Farber E R. Quantitation of ethyl alcohol in the postmortem vitreous humor. J Forensic Sci **1968;13**: 498-502.
  
- 10)** Olsen J E. Penetration rate of alcohol into the vitreous humor studied with a new in vivo technique. Acta ophthalmologica **1971;49**: 585-588.
  
- 11)** Norheim G. Postmortem alcohol in vitreous humor. Blutalkohol **1972;9**: 187-191.

- 12) Coe M D. Comparative postmortem chemistries of vitreous humor before and after embalming; **J Forensic Sci** **1976**;**21**: 583-586.
- 13) Caughlin J D. Correlation of postmortem blood and vitreous humor alcohol concentrations; **Can Soc For Sci J** **1983**;**16**: 61-68.
- 14) Jollymore B D, Fraser A D. Comparative study of ethyl alcohol in blood and vitreous humor; **Can Soc For Sci J** **1984**;**17**: 50-54.
- 15) Hentsch R, Muller H P. Tier experimentelle Untersuchung über die Konzentration von peroral zugeführtem Athanol in Blut und Glaskörper; **Arch Klin Exp Ophthalmol** **1965**;**168**: 330-334.
- 16) Felby S, Olsen J. Comparative studies of postmortem ethyl alcohol in vitreous humor, blood, and muscle; **J Forensic Sci** **1969**;**14**:93-101.
- 17) Yip DCP. Vitreous humor alcohol;**Forensic Sci Int** **1995**;**73**: 155.
- 18) Chao T C, Lo D S. Relationship between postmortem blood and vitreous humor ethanol levels; **Am J Forensic Med Pathol** **1993**;**14**: 303-308.
- 19) Yip D C, Shum B S; A study on the correlation of blood and vitreous humour alcohol levels in the late absorption and elimination phases; **Med Sci Law** **1990**;**30**: 29-33.
- 20) Kraut A; Vitreous alcohol; **Forensic Sci Int** **1995**;**73**: 157-158.
- 21) Pounder D J, Kuroda N; Vitreous alcohol: the author's reply; **Forensic Sci Int** **1995**;**73**: 159-160.
- 22) O'Neal C L, Poklis A. Postmortem production of ethanol and factors that influence interpretation. A critical review; **Am J Forensic Med Path** **1996**; **17**: 8-20.

- 23) Hardin G. Postmortem blood and vitreous humor ethanol concentrations in a victim of a fatal motor vehicle crash; **J Forensic Sci** 2002;47: 402-403.
- 24) Briglia E J; The distribution of ethanol in postmortem blood specimens; **J Forensic Sci** 1992;37: 991-998.
- 25) Singer P P, Jones G R; Very unusual ethanol distribution in a fatality; **J Anal Toxicol** 1997;21: 506-508.
- 26) Backer R C, Pisano R V; The comparison of alcohol concentrations in postmortem fluids and tissues; **J Forensic Sci** 1980;25: 327-331.
- 27) Caplan Y H, Levine B; Vitreous humor in the evaluation of postmortem blood ethanol concentrations; **J Anal Toxicol** 1990;14: 305-307.
- 28) Levine B, Caplan Y H; Interpretation of low postmortem concentrations of ethanol. **J Forensic Sci** 1993;38: 663: 667.
- 29) Clark M A, Jones J W; Studies on putrefactive ethanol production. I: lack of spontaneous ethanol production intact human bodies; **J Forensic Sci** 1982;27: 366-371.
- 30) Zumwalt R E, Bost R O; Evaluation of ethanol concentrations in decomposed bodies; **J Forensic Sci** 1982;27: 549-554.
- 31) Gilliland M G, Bost R O; Alcohol in decomposed bodies: postmortem synthesis and distribution; **J Forensic Sci** 1993;38: 1266 -1274.
- 32) Lima I V, Midio A F; Origin of blood ethanol in decomposed bodies; **Forensic Sci Int** 1999;106: 157-162.
- 33) Devgun M S, Dunbar J A; Post-mortem estimation of gamma-glutamyl transferase in vitreous humor and its association with chronic abuse of alcohol and road-traffic deaths; **Forensic Sci Int** 1985;28: 179-180.

- 34) Sadler D W, Pounder D J; Postmortem markers of chronic alcoholism; **Forensic Sci Int** 1996;82: 153-163.
- 35) Osuna E, y col.; Vitreous humor carbohydrate-deficient transferrin concentrations in the postmortem diagnosis of alcoholism; **Forensic Sci Int** 2000;108: 205-213.
- 36) Pentilla A, Karhunen P J; Alcohol screening with the alcscan test strip in forensic praxis; **Forensic Sci Int** 1990;44: 43-48.
- 37) Ferslew K E, Hagardorn A N; Application of micelar electrokinetic capillary chromatography to forensic analysis of barbiturates in biological fluids; **J Forensic Sci** 1995;40: 245-249.
- 38) Enhelhart D A y col.; Evaluation of an onsite alcohol testing device for use in postmortem forensic toxicology; **J Anal Toxicol** 2001; 25 : 612- 615.
- 39) Spinosa M B, Cinira S M; Automated headspace solid-phase micro-extraction and capillary gas chromatography analysis of ethanol in postmortem specimens; **Forensic Sci Int** 2002;128: 115-119.
- 40) Coe J I, Sherman R.E; Comparative study of postmortem vitreous humor and blod alcohol; **J.Forensic Sci** 1970; 15: 185-190.
- 41) Sylvester P.A, Wong; Unacceptably high site variability in postmortem blood alcohol analysis;**Clin Pathol** 1998;51:250-252.
- 42) Jones A W,Norberg A; Concentration-time profiles of ethanol in arterial and venous blood and end-expired breath during and after intravenous infusion; **J Forensic Sci.** 1997 Nov;42(6):1088-94.
- 43) Helander A, Jones A W; 5-HTOL – a new biochemical alcohol marker with forensic applications; **Lakartidningen.**2002 Oct 3 ;99(40):3950-4.

- 44) Levine B, Smith M, Smialek JE; Interpretation of low postmortem concentrations of ethanol; **J Forensic Sci.** 1993 May;**38 (3)**:663-7.
- 45) O'Neal CL, Poklis A; Postmortem production of ethanol and factors that influence interpretation: a critical review; **Am J Forensic Med Pathol.** 1996 Mar; **17 (1)**:8-20.
- 46) Jones A W, Holmgren P; Uncertainty in estimating blood ethanol concentrations by analysis of vitreous humour; **Clin Pathol** 2001;**54**:699-702.