



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**CUANTIFICACION DE METANOL COMO
PARAMETRO DE ALCOHOLISMO CRONICO EN
MUESTRAS PROVENIENTES DE CADAVERES
HUMANOS**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUÍMICO FARMACEUTICO BIÓLOGO**

P R E S E N T A:

LUIS ALBERTO SUAREZ REYES

Asesor externo:

M. en C. ERNESTO BERNAL MORALES

Asesor interno

Q.F.B. JOSE ANTONIO GARDUÑO ROSAS

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MEX.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE



ATN: L. A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos
comunicar a usted que revisamos la Tesis :

"Cuantificación de metanol como parametro de alcoholismo
crónico en muestras provenientes de cadáveres humanos".

que presenta el pasante: Luis Alberto Suárez Reyes
con número de cuenta: 09742078-5 para obtener el título de :
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en
el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 10 de Diciembre de 2007

PRESIDENTE	QFI. Leticia Zuñiga Ramírez	
VOCAL	Dra. Raquel López Arellano	
SECRETARIO	QFB. José Antonio Garduño Rosas	
PRIMER SUPLENTE	Q. Sonia Rincón Arce	
SEGUNDO SUPLENTE	Dra. Elizabeth García García	

Agradecimientos

Agradezco a Dios, por el infinito amor que le ha brindado a mi familia, porque sin el amor no fuese posible cristalizar este trabajo.

A mi madre, Asunción, por su amor eterno, por llevarme a culminar los sueños, por ser mi amiga, mi padre y mi madre. Por todos los días de sacrificio, por los días de dicha. Creo que ni las palabras más hermosas, ni las palabras del más grande escritor, podrían describir el eterno amor y agradecimiento que le tengo. Gracias por todo, por permitirme conocer el amor de un hermano, Edgar, al cual simplemente amo. A ustedes a quien le dedico la investigación.

A mi asesor el M en C. Ernesto Bernal, por su enseñanza, apoyo, la dedicación en tiempo a lo largo de la formación y culminación de esta investigación, por su amistad, muy agradecido siempre estaré con usted.

A mi asesor el Q.F.B. José Antonio Garduño, por creer en mi proyecto, por sus sabios consejos, por su paciencia.

A la Dra. Raquel López A. por enriquecer y contribuir a mejorar la calidad de esta investigación, por su tiempo brindado, gracias.

Al Q.F.B. Adrian Waldo, por su buen humor, por el apoyo incondicional a la culminación de este trabajo, por ser y hacer placentera mi estancia en el laboratorio de química, por su amistad.

A mi buen amigo, Víctor Castruita, por ayudarme en todo momento, y hacer el trabajo mas sencillo.

Al Entomólogo Arturo Gabriel Cortez, Iسس Ivonne Soriano, QFB Miguel Hernández, QFB Raúl Ramírez, Teresa Vega, QFB magnolia Cabrera, a la QFB Silvia Arceo[†], QBP Ana, Beto, por su amistad, por ser como una familia, por creer en mí, por ayudarme a realizar este trabajo, muy agradecido siempre estaré.

Luis Alberto Suárez Reyes

A ti Nancy D. Salazar, por amarme como lo haces, a ti Denisse, por darme alegría inmensa, a ustedes quien dios enlazo nuestros destinos, a ustedes quien amo.

En general al Servicio Médico Forense del Distrito Federal, por la oportunidad de permitirme desarrollar el presente trabajo.

A mis sinodales, Q.F.I. Leticia Zúñiga, Q. Sonia Rincón, Dra. Elizabeth García, por su colaboración y atinados comentarios a la corrección vertida a esta investigación.

Le dedico la tesis a todos mis amigos y familiares, Juan, Alejandro, David, Víctor Suarez, Daniel, Orlando, María Inés, Juana Suarez, Juan Antonio, Alejandro, a ti abuelita Felipa, Israel, Juan, Luis Fernando, Luis Francisco, a Luz Ma. Rayo, a la Familia López Carrillo...

En general, esta investigación la dedico y tómenla como suya, a todas las personas que influyeron en cumplir el sueño de ser profesionista.

La presente tesis fue realizada en el Laboratorio de química del Servicio Medico Forense del Distrito Federal, Niños Héroes 102, Col Doctores, CP. 06720, México, D.F. bajo la dirección y asesoría del M en C. Ernesto Bernal Morales

Parte de este proyecto fue aprobado por el comité del ICATDS/TIAF 2007 para presentarse en el “**International Council on Alcohol, Drugs and Traffic Safety**” y el “**The International Association of Forensic Toxicologists**”, los días 26 al 30 de agosto del 2007 en la ciudad de Seattle Washington U.S.A.



Methanol as an Alcohol Abuse Marker in Forensic Samples

Luis Alberto Suarez^{1,2}, Ernesto Bernal¹ and Adrián Waldo¹

¹Forensic Medical Service of Mexico City, Mexico City, Mexico; ²National Autonomous University of Mexico, Cuautitlan Izcalli, Mexico

AIMS: Alcoholism is one of the main health problems in the world; therefore, detecting this condition is important in legal, labor and health areas. Different substances have been proposed as alcoholism markers, among which methanol stands out because of the availability of standards and because most of the forensic laboratories have reliable techniques to determine its presence. Several contributors have studied the usefulness of methanol as an alcoholism marker in samples obtained from living people. However, to date no work has been carried out in post-mortem samples.

METHODS: In this study, methanol in post-mortem samples from alcoholics with and without ethanol present at the time of death, social drinkers and teetotallers (negative control group), was determined with gas chromatography with headspace injection to study the possibility of using methanol as an alcoholism marker in post-mortem samples.

RESULTS AND CONCLUSIONS: As expected, a higher methanol concentrations were found in samples from alcoholics positive for (Table 1), followed by social drinkers and alcoholics negative for ethanol. All of these groups had significantly more methanol than the teetotallers group.

Table 1 Methanol and ethanol concentrations (mg/dl) in the four groups studied

Studied Groups	Teetotallers (n=94)	Social drinkers (n=22)	Alcoholics without ethanol (n=28)	Alcoholics w/ ethanol (n=42)
MeOH mean (SD)	0.363 (0.338)	3.391 (3.200)	2.039 (2.162)	6.051 (10.252)
MeOH range	0-1.544	0.705-12.188	0 - 10.458	0.453-62.062
EtOH range	< 20	42 - 362	< 20	27 - 368

After eliminating some abnormally high values from people suffering metabolic disorders like diabetes in the teetotallers group, a normal distribution was found allowing this group to be considered as a negative control (\bar{x} = 0.313 mg/dl, SD=0.248 mg/dl).

In contrast to controlled studies in living subjects, more methanol was found in post-mortem specimens in all groups studied. In addition, the distribution of results was less homogeneous.

A weak correlation ($r= 0.4179$) between methanol and ethanol was found in social drinkers suggesting that methanol found in this group came partially from alcoholic beverages. A similar correlation was not found ($r= -0.047$) in the alcoholic group.

Methanol concentrations in the social drinkers was not statistically different from methanol found in the alcoholic groups therefore when ethanol is present, the specificity of methanol as marker for alcoholism low and consequently could be used as a valid alcoholism marker only when ethanol is not present.

Methanol concentrations in alcoholics negative for ethanol were particularly heterogeneous ranging for negative to high. These reflect the end of ethanol elimination and different stages of methanol elimination and can be related to ethanol withdrawal and the time since ethanol was last consumed.

Key words: Alcoholism, Alcoholism Markers, Methanol

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
Resumen	1
1. Introducción	2
2. Antecedentes (marco teórico)	3
2.1. Definición de alcoholismo.....	3
2.2. Farmacología del etanol.....	4
2.3. Farmacología del metanol.....	9
2.4. Marcadores de alcoholismo.....	11
2.4.1 Definición.....	11
2.4.2 Clasificación de los marcadores biológicos.....	11
2.4.3 Marcadores de estado.....	13
2.4.3.1 Cocatilen (Cocatileno).....	13
2.4.3.2 Etil ester de ácidos grasos (FAEEs).....	14
2.4.3.3 Etil glucurónido.....	15
2.4.3.4 Fosfatidil etanol.....	16
2.4.3.5 5-HTOL/5-HIAA.....	17
2.4.3.6 Marcadores Bioquímicos.....	17
2.4.3.7 Metanol.....	18
2.4.4 Marcadores de rasgo.....	19
2.4.4.1 Monoamino-oxidasa (MAO).....	19
2.4.4.2 Transferrina deficiente de carbohidratos.....	19
2.4.5 Aplicación de los marcadores.....	20
2.5. Introducción a la cromatografía	21
2.5.1 Definición de la cromatografía.....	21
2.5.2 Clasificación de la cromatografía.....	21
2.5.3 Análisis de volátiles por cromatografía.....	25
3. Objetivo general	27
3.1. Objetivos particulares	27
4. Materiales y métodos	28
4.1. Instrumentación y reactivos.....	28
4.2. Preparación de soluciones y muestras.....	29
4.3. Condiciones instrumentales del método.....	31

4.4. Toma de muestra y material biológico.....	32
4.5. Metodología y Esquema del ensayo de cuantificación.....	33
5. Resultados y análisis de resultados.....	35
5.1. Desarrollo del método analítico.....	35
5.2. Validación del método analítico.....	44
5.3. Aplicación.....	55
i. Análisis estadístico de la concentración de metanol por grupos (ANOVA).....	57
1. Análisis estadístico de la concentración de metanol incluyendo múltiples variables.....	59
5.2. Relación Metanol– Etanol (grupos, ARPE y BS).....	64
5.3.4 Producción de metanol y propanol en muestras sanguíneas, como consecuencia de la putrefacción	67
6. Conclusiones.....	74
7. Anexo.....	76
8. Bibliografía.....	83

Abreviaturas

Acetaldehído	ADI
Alcohol deshidrogenasa	ADH
Alcohólicos negativos a etanol	ARNE
Alcohólicos positivos a etanol	ARPE
Aldehído deshidrogenasa	ALDH
Análisis de Varianza	ANOVA
Aspartato aminotransaminasas	AST
Alanina aminotransaminasas	ALT
Bebedores sociales	BS
Beta-hexosaminidasa	HEX
Clasificación Internacional de Enfermedades	CIE
Coefficiente de correlación	r
Coefficiente de determinación	r ²
Concentración del Estándar	CONC. EST
Concentración de metanol en mg/dl	conc. MeOH
Concentración de propanol en mg/dl	conc. Prop
Coefficiente de Variación	C.V.
Coefficiente de variación	C.V. %
Cromatografía de gases con inyección Headspace	CG-HS
Cromatografía de líquidos de alta resolución	HPLC
Desviación Por ciento de	% DESV
Detectores de ionización de flama	FID
Desviación estándar	Desv. Est.
Diámetro interno	d.i.
Ecuación de la recta	Y = b + m*X
Estándar interno Isobutanol	Isob
Etanol ó alcohol etílico	EtOH
Gamma glutamil transferasa	GGT
Grados centígrados	°C
Grados de libertad	g.l
HeadSpace (espacio de cabeza)	HS
Litros por kilogramo	L/Kg
Nicotinamida adenina dinucleótido	NAD
No- alcohólicos (control normal)	NA
Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales	DSM-IV
Metanol	MeOH
Microorganismos	m.o.
Miligramos /decilitro	mg/dl
Milímetros de mercurio	mmHg
Münchener Alkoholismus Test	MALT
Ordenada al origen (intercepto)	b
Organización Mundial de la Salud	OMS
Partes por millón	ppm
Pendiente	m
Pico Ampers	pA*s
Propanol	Prop
Sistema Nervioso Central	SNC
Sistema microsomal oxidante	MEOS
Uridil-difosfato (Uridin-difosfato)	UDP
Volumen corpuscular medio	MCV

Índice de Figuras.

FIGURA	TITULO	Página
1	Esquema representativo de la farmacocinética del etanol.....	6
2	Metabolismo oxidativo del etanol.....	7
3	Metabolismo oxidativo y no-oxidativo del etanol.....	7
4	Enzimas que participan en el metabolismo del etanol y metanol en el organismo.....	9
5	Metabolismo de la cocaína sin/con alcohol etílico en sangre.....	13
6	Etilésteres de ácidos grasos (FAEEs).....	14
7	Estructura del etilglucuronido, metabolito de la degradación del alcohol etílico.....	15
8	Metabolismo de la fosfatidilcolina con/sin etanol.....	16
9	Diagrama básico de los componentes de un Cromatógrafo de Gases.....	23
10	Modelo del funcionamiento del detector de ionización de flama.....	24
11	Modo de extracción e inyección de la muestra con el Headespace, utilizando el sistema pressurised loop.....	26
12	Diagrama del ensayo de cuantificación de metanol y propanol.....	34
13	Rampa de calentamiento del horno del CG, donde la temperatura inicial es de 85°C/2', y aumenta 30°C/min. hasta llegar a 120°C.....	36
14	Cromatograma para el análisis cualitativo y cuantitativo de metanol y propanol, donde se observa el tiempo de retención de cada analito de interés.....	37
15	Grafica representativa del cambio en el área del pico de isobutanol y metanol con diferentes concentraciones de nitrito de sodio. Área en counts*s.....	39
16	Grafica representativa del cambio en el área del pico de isobutanol y metanol con diferentes concentraciones de nitrito de sodio. Área en counts*s.....	39
17	Grafica representativa del cambio en el área del pico de isobutanol y metanol con diferentes concentraciones de nitrito de sodio.....	40
18	Grafica representativa del cambio en el área del pico de isobutanol y metanol con diferentes concentraciones de nitrito de sodio.....	40
19	Grafica del tiempo de incubación de la muestra a 60°C, comparando altura y área del pico, para isobutanol y metanol (Área en counts*s).....	42
20	Grafica del tiempo de incubación de la muestra a 60°C, comparando la relación Metanol/Isobutanol de la altura y área del pico (Área en counts*s).....	43
21	Grafica de regresión lineal para metanol, donde la línea central es la repuesta, seguidas de los intervalos de confianza al 95% y por último los límites de predicción.....	47
22	Grafica de regresión lineal para propanol, donde la línea central es la repuesta, seguidas de los intervalos de confianza al 95% y por último los límites de predicción.....	47
23	Grafica de modelo lineal, estimación por extrapolación del valor del límite de detección y cuantificación de metanol. Donde la línea central es la repuesta, seguidas de los intervalos de confianza al 95%.....	53
24	Grafica de modelo lineal, estimación por extrapolación del valor del límite de detección y cuantificación de propanol. Donde la línea central es la repuesta, seguidas de los intervalos de confianza al 95%.....	53
25	Grafica de residuos del muestreo de los diferentes grupos con respecto a la cuantificación de metanol.....	55
26	Medias (asterisco) e intervalos al 95% de Diferencia mínima significativa (líneas) para la determinación de metanol en los diferentes grupos de estudio por CG-HS....	58
27	Grafica de barras referente a la probabilidad de influencia (%) de los diferentes factores evaluados sobre la cuantificación de metanol en muestras post-mortem.....	61
28	Grafica de regresión lineal para etanol-metanol de las muestras de sujetos alcohólicos bajo la influencia del alcohol etílico. La línea de tendencia es la central, seguidas de los intervalos de confianza al 95%.....	65
29	Grafica de regresión lineal para etanol-metanol de las muestras de bebedores sociales bajo la influencia del alcohol etílico. La línea de tendencia es la central, seguidas de los intervalos de confianza al 95%.....	66

30	Grafica de producción de metanol al transcurrir diferentes días de almacenamiento en refrigeración, los rombos representan la 1 ^{er} corrida (día cero) de la muestra de un sujeto y los cuadrados indican la 2 ^{da} corrida del mismo sujeto pero en el día correspondiente, 3, 7,10 14, etc.....	69
31	Grafica de producción de metanol al transcurrir diferentes días de almacenamiento a temperatura ambiente, los rombos representan la 1 ^{er} corrida (día cero) de la muestra de un sujeto y los cuadrados indican la 2 ^{da} corrida del mismo sujeto pero en el día correspondiente 1, 2, 3, 4, etc.....	69
32	Grafica de producción de propanol al transcurrir diferentes días al almacenarse en refrigeración, los rombos representan la 1 ^{er} corrida (día cero) de la muestra de un sujeto y los cuadrados indican la 2 ^{da} corrida del mismo sujeto pero en el día correspondiente, 3, 7,10, 14, etc.....	70
33	Grafica de producción de propanol al transcurrir diferentes días al almacenarse a temperatura ambiente, los rombos representan la 1 ^{er} corrida (día cero) de la muestra de un sujeto y los cuadrados indican la 2 ^{da} corrida del mismo sujeto pero en el día correspondiente 1, 2, 3, 4, etc.....	70
34	Grafica de la relación metanol-propanol, de muestras almacenadas en refrigeración, tras en monitoreo en diferentes días en una segunda cuantificación (2 ^{da} corrida), de acuerdo al día correspondiente. La línea de tendencia se enmarca con un punteado.....	71
35	Grafica de la relación metanol-propanol, de muestras almacenadas a temperatura ambiente, atrás en monitoreo en diferentes días en una segunda cuantificación (2 ^{da} corrida), de acuerdo al día correspondiente. La línea de tendencia se enmarca con un punteado.....	72

Índice de Tablas

TABLA	TITULO	PAGINA
1	Síntomas de supresión de alcohol.....	8
2	Ventana de detección para el metabolito Cocatilén.....	13
3	Características de los etilésteres de ácido grasos.....	14
4	Características del etilglucurónido.....	15
5	Parámetros del laboratorio para el diagnostico de alcohol y alcoholismo de acuerdo con Gilg(6).....	18
6	Tipos de cromatografía de gases.....	22
7	Detector de Ionización de Flama (manuales Agilent Technologies).....	24
8	Condiciones de Operación de los Detectores comúnmente utilizados con CG Capilar.....	25
9	Propiedades físico-químicas de los reactivos.....	28
10	Preparación de los sistemas.....	30
11	Preparación de la curva de calibración y su concentración en el sistema (vial), volumen total en el vial 2 ml.....	30
12	Parámetros cromatográficos experimentales de interés del estándar 7 (por cuadruplicado).....	36
13	Búsqueda de la concentración optima de nitrito de sodio, para aumentar el área del pico de metanol e isobutanol.....	37
14	Búsqueda de la concentración optima de nitrito de sodio, para aumentar la altura del pico de metanol e isobutanol.....	38
15	Evaluación del efecto del tiempo de calentamiento sobre el área del pico de cada analito de interés.....	41
16	Evaluación del efecto del tiempo de calentamiento sobre la altura del pico de cada analito de interés.....	41
17	Linealidad del método analítico (metanol).....	44
18	Linealidad del método analítico (Propanol).....	45
19	Resumen de los parámetros estadísticos de la regresión lineal para metanol.....	46
20	Análisis de varianza del sistema, linealidad (metanol).....	46
21	Análisis de varianza del sistema, linealidad (propanol).....	46
22	Repetibilidad del método analítico. Concentración teórica de metanol 0.8mg/dl, propanol 2.00 mg/dl.....	48
23	Reproducibilidad del método para metanol (muestra real de un alcohólico positivo a etanol 115 mg/dl).....	49
24	Tabla de análisis de varianza (anidado) de la reproducibilidad del método para metanol.....	49
25	Reproducibilidad del método para propanol (muestra real de un alcohólico positivo a etanol 115 mg/dl).....	50
26	Tabla de análisis de varianza (anidado) de la reproducibilidad del método para propanol.....	50
27	Exactitud del método analítico para metanol y propanol.....	51
28	Curva de calibración para la determinación de límite de detección y cuantificación.....	52
29	Análisis de varianza de la curva para detectar limite de detección y cuantificación (metanol).....	52
30	Análisis de varianza de la curva para detectar limite de detección y cuantificación (Propanol).....	52
31	Límite de detección y cuantificación teóricos para metanol y propanol.....	53
32	Réplicas para determinar límites de detección y cuantificación.....	54
33	Descripción de datos de no alcohólicos y alcohólicos.....	55
34	Media y desviación estándar del marcador metanol, respecto a los 4 grupos.....	56
35	Análisis estadístico de la determinación de metanol (mg/dl) en los distintos grupos por CG- HS.....	57
36	Método: Diferencia mínima significativa (95%).....	58

37	Análisis de Varianza para MeOH [mg/dl]. Análisis por regresión múltiple.....	59
38	Suma de Cuadrados Tipo III, donde se observa la probabilidad de influencia de los 9 factores estudiados.....	61
39	Prueba de múltiples rangos, para metanol (incluyendo múltiples variables).....	62
40	Resumen de los parámetros estadísticos de la regresión lineal para la relación etanol-metanol, para el grupo ARPE y BS.....	65
41	Análisis de varianza, para la relación etanol-metanol en el grupo ARPE.....	65
42	Análisis de varianza, para la relación etanol-metanol en el grupo BS.....	65
43	Análisis de varianza (95% de confianza), para la segunda corrida (metanol-propanol) en muestras refrigeradas.....	72
44	Análisis de varianza (95% de confianza), para la segunda corrida (metanol-propanol) en muestras guardadas a temperatura ambiente.....	73

Resumen.

Para evaluar la posibilidad de utilizar el metanol como marcador de alcoholismo en muestras de sangre de cadáveres humanos, se desarrollo un método por cromatografía de gases con inyección por HeadSpace para detectar y cuantificar trazas de metanol. Con el método desarrollado se analizaron muestras de sujetos sin antecedentes de alcoholismo y sin estar bajo la influencia del alcohol etílico, en bebedores sociales (positivos a alcohol etílico), en alcohólicos con y sin estado etílico.

Se encontró que existe una relación entre el aumento del metanol en aquellos sujetos que consumen alcohol indiscriminadamente (alcohólicos) con respecto a los que no son alcohólicos, esta diferencia se corrobora al comparar los resultados del grupo de no-alcohólicos con respecto a el grupo de los alcohólicos, por lo que, se puede utilizar la detección y cuantificación del metanol como marcador de alcoholismo en cadáveres humanos en casos legales. De manera simultanea, se encontró que los principales factores que influyen en la concentración de metanol en sangre, por el consumo de etanol por alcohólicos, es la presencia de hígado graso y la pancreatitis hemorrágica, mientras que los factores como la cirrosis hepática no tiene efecto sobre la concentración de metanol encontrada.

1. INTRODUCCIÓN:

El consumo indiscriminado de bebidas embriagantes es uno de los mayores problemas de salud pública a nivel mundial, incluido México, por lo tanto, la identificación temprana de individuos en riesgo de desarrollar dependencia al alcohol, incrementa la posibilidad de un tratamiento favorable, reduciendo así los costos de dicha dependencia. Para determinar si una persona es alcohólica o estuvo bajo los efectos de alcohol etílico, así como, en la evaluación de los programas de tratamiento, se realiza el monitoreo de marcadores de alcoholismo, los cuales nos ayudan a esclarecer distintos aspectos medico legales, tales como, accidentes automovilísticos, la patria potestad de los menores de edad, medicina laboral, homicidios, etc.

Los marcadores de alcoholismo deben de reflejar, tanto un consumo crónico de alcohol en los individuos, como uno agudo. En general un marcador de estado debe de mostrar una alta sensibilidad y especificidad, y discernir entre el consumo social y el excesivo; adicionalmente este marcador no debe de encontrarse a elevadas concentraciones en órganos dañados por causas ajenas al consumo de alcohol etílico. Tradicionalmente se han utilizado distintas sustancias como marcadores de alcoholismo, tales como enzimas hepáticas [Gamma glutamil transferasa (GGT), aspartato y alanina aminotransaminasas (AST, ALT), AST mitocondrial, beta-hexosaminidasa (HEX)], el volumen corpuscular medio (MCV) y cuestionarios psiquiátricos como el DSM-IV y el CIE 10; sin embargo ninguno de ellos tiene la sensibilidad y especificidad necesaria, además de que solo se pueden aplicar en personas vivas. Por lo que, en los últimos años, se han buscado otros marcadores de alcoholismo más sensibles y específicos. Dentro de estos marcadores destaca el metanol debido a que los laboratorios forenses cuentan con el equipo necesario para su análisis y por la disponibilidad de estándares; diversos trabajos han probado la validez del metanol como marcador de alcoholismo en muestras provenientes de personas vivas, pero, hasta la fecha no se han hecho trabajos en muestras post-mortem; donde el análisis de marcadores de alcoholismo es importante para establecer responsabilidades en hechos criminales, aun cuando no se encuentre alcohol etílico o en el caso de muestras putrefactas para determinar el origen del alcohol etílico encontrado en sangre.

Dentro del marco legal puede haber situaciones donde es necesario determinar si una persona es adicta al alcohol etílico en muestras post-mortem, en estas circunstancias la cuantificación de etanol no brinda la información necesaria para esclarecer el problema, por lo que es necesario utilizar otras sustancias como marcadores de alcoholismo. Por lo que, en el presente trabajo se determinó, por medio de la técnica de cromatografía de gases con inyección por headspace, la cantidad de metanol, como marcador del consumo de alcohol

etílico, presente en muestras provenientes de alcohólicos bajo el influjo de alcohol etílico, alcohólicos no intoxicados, bebedores sociales y un grupo control negativo, necropsiados en el SEMEFO de D.F.

2. ANTECEDENTES (marco teórico)

Existen reportes escritos del consumo de cerveza, vinos y otras bebidas alcohólicas que datan desde 3000 años A. de C. Pero el proceso de destilación, introducido por los árabes en Europa [1], aplicado a las bebidas fermentadas se remonta alrededor del año 800. Este proceso ha permitido la preparación de licores altamente potentes (*whisky*).

Dado que el consumo de alcohol etílico forma parte de las costumbres sociales, pues su consumo se permite y se promociona, es en la actualidad uno de los grandes problemas de salud pública en la mayoría de los países.

2.1. DEFINICIÓN DE ALCOHOLISMO

No existe una definición que englobe todo el concepto de alcoholismo, los siguientes conceptos abarcan en conjunto un concepto más entendible, los cuales son los siguientes:

- El alcoholismo es una enfermedad crónica, progresiva y a menudo mortal; es un trastorno primario y no un síntoma de otras enfermedades o problemas emocionales.
- La OMS define el alcoholismo como...la ingestión diaria de alcohol superior a 50 gramos en la mujer y 70 gramos en el hombre...
- El alcoholismo es producido por la combinación de diversos factores fisiológicos, psicológicos y genéticos. Se caracteriza por una dependencia emocional y a veces orgánica del alcohol.

¿Como se determina que una persona es alcohólica *in vivo*?

Existen diferentes test para el diagnóstico de alcoholismo dentro de los cuales se ha recomendado el cuestionario MALT (Münchener Alkoholismus Test) para el diagnóstico de alcoholismo en mujeres, donde los pacientes se identifican como bebedores de riesgo a través de cuestionarios. El objetivo de este cuestionario es comprobar sus propiedades psicométricas en la población femenina.

Los criterios nosológicos que se establecen en la cuarta edición del manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (DSM-IV, APA, 1995) así como los que se incluyen en la 10ª edición de la Clasificación Internacional de Enfermedades (CIE-10, OMS, 1992)

coinciden en que el diagnóstico de alcoholismo (síndrome de dependencia alcohólica) debe hacerse siguiendo los mismos criterios que para la dependencia de sustancias psicoactivas, de forma que incluya aquellos casos en que el consumo reiterado de bebidas alcohólicas repercute de forma negativa en la vida individual, familiar, social y laboral del sujeto [2]. (Los criterios se encuentran en el Anexo 1).

2.2. FARMACOLOGÍA DEL ETANOL

En la actualidad se reconoce que el valor terapéutico del etanol es relativamente limitado, y que su ingestión crónica en cantidades excesivas es un problema social y médico de primer orden, debido a los accidentes automovilísticos y los decesos provocados por manejar en estado de ebriedad. Las bebidas alcohólicas se consideran como estimulantes, pero el etanol ante todo es un depresor del SNC.

Pruebas recientes sugieren que las concentraciones bajas de etanol pueden incrementar la función de ciertas sinapsis neuronales excitadoras, la estimulación aparente resulta, en gran medida, por la depresión de los mecanismos inhibidores de control en el cerebro. Los primeros procesos mentales que se efectúan son los que dependen de la capacitación y la experiencia previa; se embotan y, a continuación, pierde memoria, concentración e intuición. Sobreviene una oleada de confianza, la personalidad se vuelve expansiva y vivaz, y pueden hacerse evidentes cambios incontrolados del talante y arranques emocionales. Estos cambios psicológicos concurren con trastornos sensoriales y motores. Cuando la intoxicación es más grave, sobreviene un trastorno general de la función nerviosa, y prevalece por último un estado de anestesia general. Sin embargo, hay poco margen entre la dosis anestésica completa y aquella a la cual se pone en peligro la respiración.

Consecuencias de la ingestión excesiva crónica, esta relacionada directamente con trastornos neurológicos y mentales graves (*p. eje.*, lesión cerebral, pérdida de la memoria, trastornos del sueño y psicosis). Los individuos que ingieren con regularidad etanol experimentan también un riesgo mayor de sufrir convulsiones no provocadas. Además, las deficiencias nutrimentales y vitamínicas coincidentes con la mala nutrición o las funciones gastrointestinal y hepática deficientes del individuo alcohólico, parecen contribuir a los síntomas neuropsiquiátricos que son comunes en los alcohólicos, como encefalopatía de Wernicke, psicosis de Korsakoff, polineuritis, etc [1].

En 1974, Pirola y Lieber mencionaron que el etanol contribuye a la producción de lesiones del esófago y el duodeno, y es también un factor causal en la pancreatitis aguda y crónica [1]. La pancreatitis parece deberse a que el etanol no sólo incrementa la secreción, sino que también causa obstrucción del conducto pancreático.

Hígado. La ingestión aguda de etanol, incluso en dosis intoxicantes, tal vez produzca pocos cambios duraderos en la función hepática. Sin embargo, si se consume de manera regular da lugar a una constelación de efectos adversos relacionados con la dosis que parecen resultar, principalmente, de su metabolismo [Lieber, 1994]. Aunque la desnutrición puede intensificar la lesión hepática, un estado nutricional excelente no previene la hepatitis alcohólica ni su degeneración en cirrosis.

La acumulación de grasa en el hígado es un suceso incipiente, y puede producirse en sujetos normales después de la ingestión de cantidades relativamente bajas de etanol. Esto se debe a la inhibición tanto del ciclo del ácido tricarboxílico como de la oxidación de la grasa, en parte por la generación de NADH en exceso por la acción de la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH). Una parte del alcohol ingerido se metaboliza por acción de las oxidasas microsómicas de función mixta que están sujetas a la inducción por el etanol y otros agentes. El producto de todas estas reacciones, el acetaldehído, que es una sustancia reactiva y tóxica que puede formar uniones con proteínas y otros compuestos, lo que redundaría en inhibición de gran variedad de enzimas y generación de derivados inmunógenos. Otros efectos adversos del acetaldehído, es incrementar la peroxidación de lípidos y lesión de las membranas mitocondriales y celulares de otras clases, agotamiento del glutatión y la secreción de proteínas a causa de inhibición de polimerización de la tubulina. Lo anterior puede explicar la ingurgitación de los hepatocitos con proteínas, grasas y agua, que progresa hasta la necrosis y la fibrosis que se encuentran en el hígado cirrótico, lo mismo que los diversos trastornos metabólicos observados en los individuos alcohólicos. Más aún, es posible explicar la relación entre la ingestión crónica de etanol y el aumento de la incidencia de cáncer y la toxicidad intensificada de ciertos fármacos (*p. ej.*, acetaminofén) por la inducción de las oxidasas microsómicas aunada a agotamiento del glutatión, lo que da por resultado acumulación incrementada de carcinógenos activados o de metabolitos tóxicos [1].

FARMACOCINÉTICA.

ABSORCIÓN: Este fenómeno se produce a nivel de estómago, intestino delgado, colon, etc. (Fig. 1). El etanol es una molécula pequeña con una parte polar y una no-polar, por ello atraviesa las membranas celulares.

Es importante mencionar algunos factores que contribuyen a la absorción o no del alcohol, como el efecto del vaciamiento gástrico, mientras más vacío este el estómago más rápida y fácil es la absorción de alcohol, por el contrario si este está lleno el efecto de absorción se retarda. El azúcar beneficia la absorción del alcohol (al ser una bebida dulce, es más fácil su

ingestión, que una bebida fuerte, pero también el alcohol se pega a el azúcar y atraviesa mas rápido la membrana celular). La grasa por el contrario retarda la absorción.

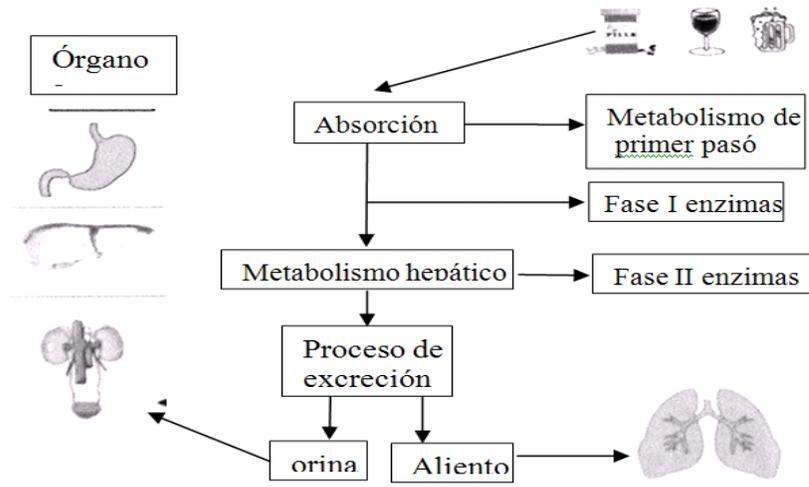


Figura 1. Esquema representativo de la farmacocinética del etanol [3].

DISTRIBUCIÓN: Después de su absorción, el etanol por ser altamente soluble (o sea polar) se distribuye con facilidad en el torrente sanguíneo y alcanza todos los tejidos, y por su parte no polar atraviesa barrera hematoencefálica produciendo así los efectos en el cerebro.

BIOTRANSFORMACIÓN: Se oxida por completo una proporción de 90 a 98 % del etanol (dependiendo de la concentración en sangre, si es alta, el 10% escapa a la oxidación) que entra en el cuerpo y el restante sufre un metabolismo no-oxidativo, pero puede ser eliminado sin metabolizar (Fig.3). El metabolismo del etanol difiere de la mayor parte de las sustancias en que la tasa de oxidación es relativamente constante en relación con el tiempo, y en que se incrementa muy poco al elevar la concentración de etanol en la sangre (cinética de orden cero) [1]. En el adulto la tasa promedio que se puede metabolizar de etanol es de 120 mg/kg por hora, o cerca de 30 ml en tres horas. Se da principalmente a nivel de hígado, por la enzima alcohol deshidrogenasa [que es una metaloenzima, que contiene zinc y que recurre al NAD (co-enzima) como aceptor de hidrógeno], donde, transforma el alcohol en acetaldehído (ADI), que es el principal metabolito de la biotransformación del etanol (Fig. 2).

El etanol también es metabolizado por el sistema microsomal oxidante (MEOS), trabaja con NADPH + H (reducido) con O₂, produciendo peróxido y acetaldehído. Y por otro lado la enzima catalasa (de los peroxisomas) transforma etanol a acetaldehído. Cualquiera de estas produce acetaldehído y este pasa a acetato por la acción de la enzima acetaldehído deshidrogenasa, este se une a una coenzima A, acetyl-Co A entra a el ciclo de Krebs (como acetato activo) o servirá en las diversas regiones anabólicas que participan en la síntesis de colesterol, ácidos grasos y otros constituyentes tisulares.

Metabolismo Oxidativo del Etanol

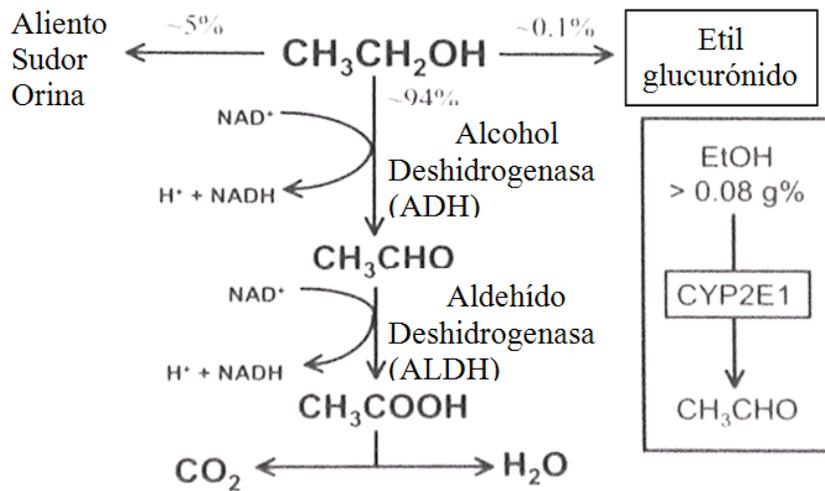


Figura 2. Metabolismo oxidativo del etanol [3].

El etanol produce modificación de la relación entre NADH Y NAD⁺ en citosol, se incrementa el NADH, esto produce inhibición o inversión de reacciones de la célula como en el ciclo de Krebs el malato, piruvato (esto inhibe la gluconeogénesis y por eso da hipoglucemia), etc. En condiciones normales de “salud”, cerca del 2% del etanol ingerido escapa a la oxidación. En circunstancias especiales, y cuando se ha consumido una gran dosis, este valor puede llegar al 10% [1].

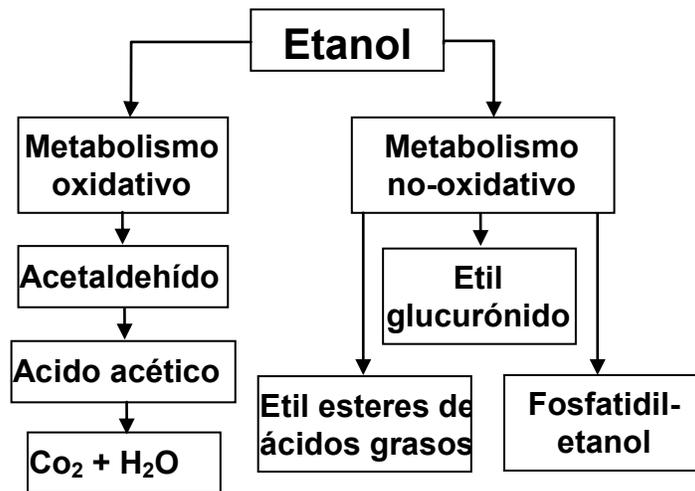


Figura 3. Metabolismo oxidativo y no-oxidativo del etanol [4].

ELIMINACIÓN. Se da principalmente por las vías urinarias aunque también se elimina por el sudor y por exhalación (Fig. 2). De hay que se pueda realizar estudios de cuantificación de etanol, en orina y aliento, con carácter medico-legal.

Mecanismo de acción. El etanol actúa sobre el SNC, provocando sus efectos en la función de los canales de iones activados por aminoácidos tanto excitatorios (glutamato) como inhibidores (GABA). El etanol tiene la capacidad de incrementar la inhibición sináptica mediada por GABA, lo mismo que los flujos de cloruro. Aunque el etanol puede inhibir las corrientes de iones activadas por glutamato, el etanol afecta predominantemente a los receptores de NMDA del glutamato a las concentraciones de este alcohol a las que llega durante la intoxicación leve. El consumo crónico de etanol causa incremento de la expresión de los receptores NMDA, lo que puede contribuir a la hiperexcitabilidad durante la supresión de este alcohol [1].

Tolerancia, dependencia física y supresión. El consumo frecuente de bebidas embriagantes puede producir mayor tolerancia (tolerancia adquirida), de modo que se pueden encontrar concentraciones sanguíneas altas en extremo (300 a 400 mg/dl) en alcohólicos que no parecen estar muy sedados [1]. En estos casos, la dosis mortal no se eleva de manera proporcional con la dosis sedante, y por tanto disminuye el margen de seguridad (índice terapéutico) [1]. Los consumidores de alcohol no sólo adquieren tolerancia, sino que, de manera inevitable, generan un estado de dependencia física. El síndrome de supresión de alcohol (Tabla 1) depende, en general, del tamaño de la dosis diaria promedio, y suele “tratarse” reanudando la ingestión.

El alcohol produce tolerancia cruzada a otros sedantes, como las benzodiazepinas. Esta tolerancia es operativa en los alcohólicos abstinentes, pero mientras el alcohólico está bebiendo, los efectos sedantes del alcohol se suman a los de los fármacos, lo que hace más peligrosa la combinación alcohol-sedante.

Tabla 1. Síntomas de supresión de alcohol [1].

Deseo vehemente de beber, Temblor, irritabilidad, Náusea, Trastorno del sueño, Taquicardia, Hipertensión, Sudación, Deformación perceptual.
Convulsiones (18 a 24 h después de la última copa)
Dilirium tremens (raro en la abstinencia no complicada)
Agitación grave
Confusión
Alucinaciones visuales
Fiebre, sudoración abundante
Taquicardia, Náusea
Pupilas dilatadas, diarrea

2.3. FARMACOLOGÍA DEL METANOL

PROPIEDADES QUÍMICAS Y FARMACOCINÉTICA.

El metanol es un líquido volátil, incoloro, con olor característico, soluble en agua, alcoholes, cetonas, ésteres e hidrocarburos halogenados; su densidad es de 0.79 g/ml, el punto de fusión es de -97°C , punto de ebullición de 65°C , presión de vapor de 125 mmHg(a 25°C) y una concentración máxima permisible de 200 ppm.(en el aire).

El metanol presenta un volumen de distribución de 0.6-0.7 L/Kg, no tiene unión a proteínas, razones por las cuales es una sustancia que se puede dializar. Presenta una muy buena absorción por todas las vías tanto oral, dérmica e inhalatoria, estas 2 últimas frecuentes en niños y trabajadores industriales respectivamente; por tracto gastrointestinal se absorbe totalmente entre 30-90 minutos, tiempo en el cual alcanza su máxima concentración plasmática; tiene una vida media a bajas dosis y sin presencia de etanol concomitante de 3 horas o menos, mientras que en la intoxicación leve es de 14-20 horas, en la grave aumenta a 24-30 horas y hay reportes aún de 52 horas; se metaboliza entre un 75-85% en el hígado, 10-20% se excreta sin cambios por los pulmones y un 3% por los riñones.

METABOLISMO

El metanol es metabolizado por la enzima alcohol deshidrogenasa, la misma que metaboliza al etanol, pero esta enzima es 22 veces más afín por el etanol que por el metanol, razón por la cual se utiliza el etanol como antídoto de esta intoxicación, ya que al preferir la enzima como sustrato al etanol, se evita la formación de los metabolitos tóxicos del metanol, causante de los síntomas, los cuales son el formaldehído y el ácido fórmico (ver figura 4).



Figura 4. Enzimas que participan en el metabolismo del etanol y metanol en el organismo.

Es importante conocer que una vez se inicie el metabolismo del metanol a formaldehído, este es un producto muy reactivo, por lo cual no se puede detectar, más no así el ácido fórmico el cual se puede medir en sangre y orina aún cuando los niveles de metanol en sangre sean negativos; la eliminación de ácido fórmico aumenta en presencia de ácido fólico, ya que este último promueve la conversión del ácido fórmico a dióxido de carbono y agua, evitando de esta manera la toxicidad.

PRODUCCIÓN DE METANOL ENDÓGENO

Trazas de metanol (menor que 0.27mg/dl) son producidos en el organismo por el curso del metabolismo intermediario, estos niveles endógenos se incrementan durante un periodo de consumo alto de alcohol etílico [5].

Cuando los alcohólicos consumen alcohol sobre un periodo de varios días o semanas, los niveles de metanol en sangre y orina se incrementan debido a que la eliminación de metanol se retrasa por detrás del etanol por 12 a 24 hrs., al eliminarse el etanol, el metanol empieza a ser metabolizado y sus niveles disminuyen hasta alcanzar niveles normales. Para que se lleve acabo el metabolismo del metanol, tiene que disminuir la concentración de etanol en sangre cerca de los 10 mg/dl de etanol, ya que la enzima aldehído deshidrogenasa (ADH) en hígado no esta muy saturada con etanol como sustrato y el metabolismo del metanol puede por tanto comenzar. A bajas concentraciones, la eliminación de etanol continua con una cinética de primer orden con una vida media de 15 minutos. La vida media del metanol es diez veces mayor, por tanto, los niveles elevados de metanol persistirán en la sangre alrededor de 10 hrs. después de que el etanol haya desaparecido, y puede servir como un marcador reciente de un consumo elevado de alcohol etílico [6,7].

2.4. MARCADORES BIOLÓGICOS DE ALCOHOLISMO.

2.4.1 Definición.

Un marcador biológico de alcoholismo, se define como un parámetro analítico que puede indicar la exposición ha alcohol etílico o un efecto a su exposición, pudiendo detectarse en un medio biológico particular [8], como: sangre, orina y cabello.

Las características ideales para detectar un sujeto alcohólico, es el de tener una alta especificidad y sensibilidad, no debe de ser una prueba invasiva (para el caso propio de cadáveres no se toma en cuenta esta última), y deberá diferenciar entre consumo moderado y excesivo. Generalmente, no debe estar elevado cuando hay un daño en los órganos, como resultado de alguna patología ajena (cirrosis por infección viral al consumo de alcohol etílico. La sensibilidad de los marcados de alcoholismo, tiene que ser altamente dependiente de la vida media de la molécula en el organismo, y del tiempo transcurrido entre la ultima ingesta de alcohol y la toma de muestra (sangre u orina).

2.4.2 Clasificación de los marcadores biológicos

Existen distintas clasificaciones, en función del objetivo de cada grupo de trabajo y de las características particulares de los propios marcadores. A continuación se presenta dos de estas clasificaciones, la primera clasifica a los marcadores como, marcadores directos e indirectos [9], mientras que la segunda los clasifica como marcadores de estado y marcadores de rasgo.

Marcadores directos e indirectos.

Los marcadores directos, es decir aquellos productos del metabolismo del alcohol, que contienen átomos de carbono procedentes de la molécula de etanol como son el etilglucurónido, los etilésteres de ácidos grasos y el cocaetileno, la información que nos puedan aportar, tanto por el marcador en sí mismo, como por la muestra en que se puede determinar (orina, sangre o cabello), nos ofrece la posibilidad de poder utilizarlos como marcadores de consumo agudo o de consumo crónico.

Marcadores directos:

- ❖ Cocaetileno
- ❖ Etilésteres de ácidos grasos
- ❖ Etilglucurónido
- ❖ Fosfatidiletanol

Los marcadores indirectos, son productos de un cambio patológico del metabolismo causado por el alcohol. Los marcadores indirectos pueden dar producto de otras causas patológicas.

❑ Marcadores indirectos:

- ❖ Acido 5-hidroxiindolacetico/5-hidroxitriptofol (5-HIAA/5-HTOL)
- ❖ Dolicol
- ❖ Gamma-glutamyl-transpeptidasa (GGT)
- ❖ Metanol
- ❖ Transferrina deficiente de carbohidratos (CDT)
- ❖ Volumen corpuscular medio (VCM)

Marcadores de estado y marcadores de rasgo.

Marcadores de estado: estos se modifican en relación al patrón de consumo de alcohol, y se han empleado en la monitorización de los resultados de los tratamientos y en el curso de la enfermedad, ya que estos se normalizan con la abstinencia. Suelen llamarse también marcadores de consumo agudo o de recaída.

Marcadores de rasgo: se consideran estables en el tiempo, es estable durante la vida entera de un individuo, e independientes del consumo reciente, o no, de alcohol, debido a que la alteración de sus valores indican normalmente una disfunción orgánica,

Los marcadores de rasgo, también son considerados marcadores genéticos y su identificación permitiría la predicción de la vulnerabilidad genética y de los sujetos supuestos de alto riesgo [8, 10].

❑ Marcadores de estado

- ❖ Etilésteres de ácidos grasos (FAEEs)
- ❖ Metanol
- ❖ 5-HIAA/5-HTOL
- ❖ Metilesteres de ácidos grasos (FAMEs)

❑ Marcadores de rasgo

- ❖ GGT
- ❖ VCM
- ❖ Transferrina deficiente de carbohidratos (CDT)

❖ Marcadores genéticos

- ADH & ALDH (polimorfismos)
- MAO

2.4.3 Marcadores de estado.

2.4.3.1 COCAETILÉN (o Cocatineno).

Este marcador se forma por la esterificación del etanol y la cocaína en las células del hígado y riñón [11]. Esta reacción es catalizada por una carboxilesterasa no específica, la cual da lugar a benzoilecgonina en ausencia de etanol y cocaetilén en presencia de etanol (fig. 5).

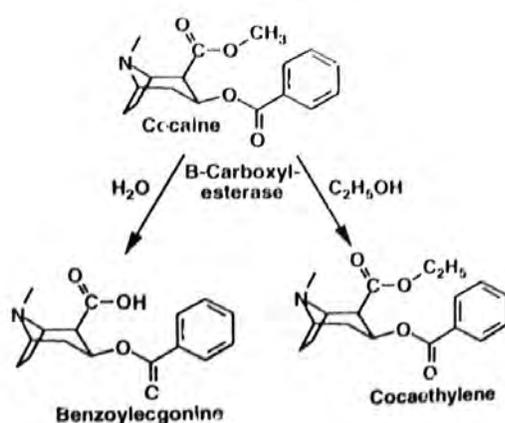


Figura 5: Metabolismo de la cocaína sin/con alcohol etílico en sangre [11].

Se detecta en consumo simultáneo de etanol-cocaína, pero su relación entre los niveles de etanol y cocaína no están claramente establecidos. Su efectos farmacológicos duran 2h y se puede detectar en orina, sangre y cabello (Tabla 2). El uso del cocaetilén como marcador del consumo de alcohol está limitado a aquellos que consumen conjuntamente alcohol y cocaína, lo que puede aportar dos dependencias en casos forenses [2]

Tabla 2: Ventana de detección para el metabolito Cocaetilén [9].

Tipo de muestra	Ventana de Detección	Intervalo de conc.	Observaciones
Orina		10-9500 ng/ml	Marcador a corto y mediano plazo Complementario alcoholemia y consumo de cocaína
Sangre		10-110 ng/ml	Marcador a corto y mediano plazo Complementario alcoholemia y consumo de cocaína
Cabello	Meses/años (long. Mechón)	2.5-30 ng/mg	Marcador consumo crónico

2.4.3.2 ETILÉSTERES DE ÁCIDOS GRASOS (FAEEs).

Se describieron (Figura 6) en el miocardio de conejo en 1981, por G. Lange, como productos del metabolismo no oxidativo del etanol, y dentro de sus síntesis implica a dos enzimas la Acil-CoA:etanol O-aciltransferasa (AEAT) y FAEE sintetasa. Se dice que en ciertas enfermedades asociadas con enzimas de hepatocitos (transaminasas) ↑ actividad de FAEE sintetasa en sangre [9].

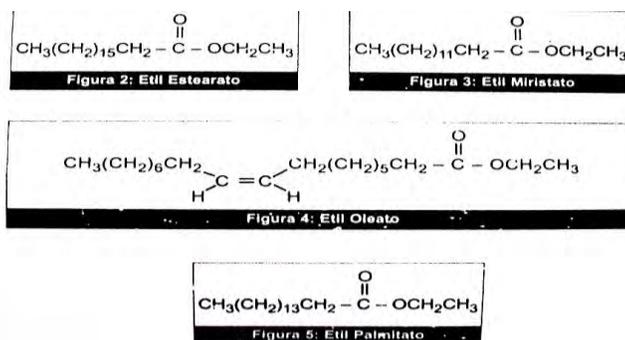


Figura 6: Etilésteres de ácidos grasos (FAEEs) [9].

Se detectan concentraciones elevadas en órganos comúnmente dañados por el alcohol y se ha propuesto que son mediadores tóxicos del daño inducido en las células y puede estar relacionado en los cambios patológicos del metabolismo lipídico, originando hígado graso y en la pancreatitis inducida por el alcohol. Las concentraciones encontradas de FAEEs son útiles como marcadores a corto o largo termino (Tabla 3), por ejemplo: Bebedores sociales <0.4 ng/mg, alcohólicos crónicos >1ng/mg de cabello. Se puede detectar hasta 24h, después de dejar de beber, en sangre (estas concentraciones corren de forma paralela a la concentración sanguínea de etanol cuando es > 150mg/dl, siendo además detectable incluso a las 24hrs de la ingesta de alcohol, pero la concentración de FAEEs a las 24 hrs no puede ser extrapolada a una concentración de alcohol dada [9], pero se realizan investigaciones para proponer un algoritmo de Dx de ingesta reciente de etanol), su acumulación es principalmente en tejido graso así como en hígado y pelo, por lo que se puede utilizar como marcador post-mortem, en sangre está unido a albúmina y otras lipoproteínas.

Tabla 3: Características de los etilésteres de ácido grasos [9].

Tipo Muestra	Ventana de detección	Interv. Conc.	Observaciones
Suero/plasma	EtOH+/FAEEs: 0-6 h.	0.6-0.9 nmol/l	Marcador a corto plazo Complementario alcoholemia
	EtOH-/FAEEs+:4-24 h EtOH+/FAEEs-: NO		
Cabello	Meses/años (Longitud del mechón)	0.01-15 ng/mg	Marcador consumo crónico

2.4.3.3 ETIL GLUCURÓNIDO.

Es un metabolito directo y minoritario del alcohol etílico [16], descrito por primera vez en 1952 por Kamil y colaboradores, no es volátil, es soluble en agua, se puede determinar en fluidos biológicos como en muestras de cabello [9] (Fig. 7).

Este metabolito se forma cuando el etanol se conjuga con el ácido glucurónico activo en presencia de la UDP glucuronil transferasa en el retículo endoplásmico, predominantemente de las células del hígado, y en menor extensión en células de la mucosa intestinal, pulmón y localizaciones, representando el 0.02-0.06% del metabolismo del alcohol (reacción de conjugación Fase II) [12].

La formación depende de la concentración plasmática de etanol, y aparece después de 2 y 3.5 horas del máximo de etanol, La vida media de este metabolito es estimada entre 2-3 horas después de que el etanol ha sido eliminado de la sangre. Pero puede determinarse en suero hasta 8 horas después de eliminación del etanol del cuerpo y hasta 72 horas en orina. Las concentraciones en suero de etil glucuronido son más altas en bebedores regulares comparadas con los bebedores sociales [9].

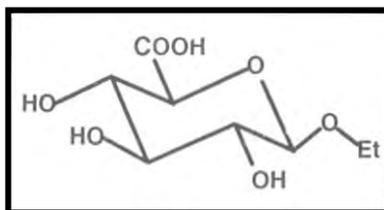


Figura. 7: Estructura del etilglucurónico, metabolito de la degradación del alcohol etílico.

Hasta la fecha, no se han medido concentraciones detectables en sangre y orina, de personas no bebedoras y niños, así como en abstinencia probada.

No hay valores definidos que distingan un consumo moderado, de un consumo de alcohol crónico. Se puede asumir que niveles de etilglucurónico (Tabla 4) en suero mucho mayor de 0.5 mg/dl cuando la concentración de alcohol etílico en sangre es menor de 100mg/dl.

Tabla 4: Características del etilglucurónico [9].

TIPO DE MUESTRA	TIEMPO DE DETECCIÓN	INTERV. DE DETECCIÓN	OBSERVACIONES
Orina	A partir 1-3 h. Hasta 90 h.	70-7000ng/ml	Marcador a corto y mediano plazo Complementario alcoholemia
Sangre	A partir 1 h. Máximo a 2-3 h. Hasta 8-36 h.	30-7000ng/ml	marcador a corto y mediano plazo Complementario alcoholemia
Cabello	Meses/años (long. mechón	0.002-5ng/mg	Marcador consumo crónico

2.4.3.4 FOSFATIDILETANOL.

El fosfatidiletanol es un fosfolípido anormal [10] formado en las membranas celulares en presencia de etanol por acción catalítica de la enzima fosfolipasa D (PLD) sobre la fosfatidilcolina [11] [13] (figura 8).

La degradación de fosfatidiletanol es lenta en comparación a su formación [11]. Si la presencia de etanol es prolongada se puede acumular en algunas células en torno al 1-2% de la reserva celular de fosfolípidos. Por su elevada especificidad y lenta eliminación es por lo que se ha propuesto como marcador de abuso de alcohol étílico, además se sabe que su vida media es de aproximadamente 4 días y su concentración en sangre es de 2.5 ± 0.9 $\mu\text{mol/L}$ y su concentración en eritrocitos $1.9 \pm 1.1 \mu\text{mol/L}$ y se puede cuantificar en sangre, eritrocitos, cerebro e hígado [9, 13].

El cabello humano al tener un contenido muy bajo de fosfolípidos, no se ha descrito todavía experimentos para su detección en cabello.

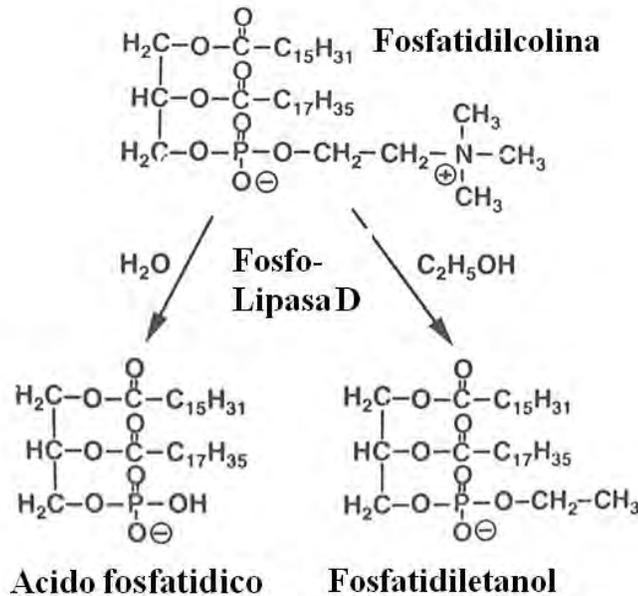


Figura 8: Metabolismo de la fosfatidilcolina con/sin etanol [11].

2.4.3.5 RELACIÓN ENTRE EL 5-HIDROXITRIPTOFOL Y EL ÁCIDO 5-HIDROXIINDOLACÉTICO (5-HTOL/5-HIAA).

El 5-hidroxitriptofol (5-HTOL) y el ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) son productos del metabolismo de la serotonina, normalmente el 5-HIAA es el metabolito principal donde la ruta catabólica normal consiste en la desaminación oxidativa del intermediario 5-hidroxiindolacetaldehído (5-HIA) por acción de la ALDH a 5-HIAA, o reducido a 5-HTOL. La excreción urinaria de 5-HTOL está facilitada por la formación de los derivados conjugados a glucuronido o sulfato, pero el consumo de alcohol produce un cambio en el metabolismo de la serotonina hacia el incremento de 5-HTOL (en orina) por la inhibición de la aldehído deshidrogenasa (ALDH) y/o por el aumento en el cociente de NADH/NAD. Como su excreción no retorna a valores normales hasta horas después de que el alcohol en sangre ha desaparecido, se le ha propuesto como marcador de consumo reciente de bebidas embriagantes al relacionar el cociente 5-HTOL/5-HIAA ya que de esta manera se aumenta su sensibilidad. Así se evita las fluctuaciones de la ingesta de serotonina y/o la excreción de creatinina influenciada por la actividad muscular.

El 5-HTOL no se forma en orina después de la muerte [11], por lo que, puede utilizarse para diferenciar una ingesta de alcohol producida ante-mortem y distinguirla de una producción pos-mortem. No hay investigaciones publicadas de su investigación en cabello. [9,14].

2.4.3.6 MARCADORES BIOQUÍMICOS.

Los marcadores bioquímicos para el alcoholismo incluyen la GGT y Transferrina deficiente de carbohidratos (CDT) [15], esta última promete ser un buen marcador postmortem de alcoholismo, pero en México no se cuentan con los estándares pertinentes para realizar estudios en muestras post-mortem, tal como sucede con el etilglucurónido, donde los estándares son de un precio elevado (oscila entre los \$15000 pesos), así como los marcadores expuestos en el presente trabajo, por lo que se optó por evaluar la utilidad del metanol (por la disposición de estándares en los laboratorios forenses) en los casos medico-legales, para determinar sujetos alcohólicos.

Tabla 5: Parámetros del laboratorio para el diagnóstico de alcohol y alcoholismo de acuerdo con Gilg (8).

	Rango normal	Reacción después de beber	Diagnostico sensibilidad (%)	Diagnostico especificidad (%)	Practicabilidad	Normalización después de dejar de beber
<i>Enzimas</i>						
GGT	<28 U/l	-	50-90	~ 70	++++	2-5 S
ASAT	<18 U/l	-	30-50	~90	++++	1-3 S
ALAT	< 22 U/l	-	20-45	~70	++++	1-4 S
GLDH	<4 U/l	-	5-60	?	+++	?
β-HEX ,	<6.2 U/l	+	alto		?	1 2-4 d
<i>Parámetros hematológicos</i>						
MCV ,	<92/100 fl	-	40/70 - 96	~ 60-90	++++	1-3 m
CDT ,	<20/26 U/l	-	50-90	90-100	(++)	~2 S
HDL chol. ,	<50 mg/dl	-	50-90	alto	+++	1-4 S
Apolipop. A1/2		-	>45	alto	++	~2 S
<i>Metabolitos</i>						
Acetaldehído		(+)	-	-	+	
Acetato	0.75 mM	-?	-	-	(++)	?
2-Propanol	< 2 mg/l	(+)	-	?	(++)	hs
Acetona,	<7 mg/l	-	-	-	(++)	hs
Metanol	<10 mg/ l	(++)	~80	alto	(++)	hs-1 d
<i>Orina /(sangre)</i>						
5-HTOL/5-HIAA	<20	+	60	alto	+	hs
Dolicol	<4.7 ng/ml	+	bajo	?	+	ds-S
TIQ y THBC (SAL)					+	

Sensibilidad: % de resultados positivos para alcohólicos; especificidad: % de resultados negativos para no-alcohólicos. +: Laboratorios especiales; ++: métodos especiales fuera del laboratorio; +++: test especiales en una rutina de laboratorio; ++++: métodos simples de rutina en el laboratorio clínico. S: semanas; d: días; m: meses.

2.4.3.7 METANOL

El metanol es el alcohol mas simple y, es conocido por estar presente como una sustancia endógena normal en concentraciones en suero de ~0.03-0.27mg/dl (o 0.0002%), aunque hay estudios que marcan que existe un rango de 0.0mg/dl hasta 1.0mg/dl de metanol en sangre [14] (Tabla 5). El metanol es metabolizado por la misma enzima que metaboliza al etanol. El tiempo de vida media del metanol es de 1.4-3.3 hrs. En su primera fase produce formaldehído y dióxido de carbono como metabolitos sucesivos, pero solo cuando el etanol no está presente en el cuerpo. El etanol compite con el metanol por estas enzimas y es preferentemente metabolizado. El alto consumo crónico de alcohol etílico provoca una acumulación de metanol por un tiempo en concentraciones que no son detectables por laboratorios de análisis para el etanol. Este es exacerbado por la presencia de metanol en bebidas alcohólicas. El metanol puede encontrarse en diversas bebidas como el brandy, whisky vino, vodka, cerveza etc.[14].

La presencia de etanol en sangre impide el metabolismo del metanol [17] en concentraciones mayores a 0.02% (20mg/dl).

En los casos forenses, la presencia de metanol arriba de 10 mg/Kg. es inusual, y sugiere alcoholismo crónico, un cuerpo embalsamado, o la ingesta de metanol, por lo que se tiene que tener en cuenta lo anterior para dar una conclusión certera de la presencia del metanol.

2.4.4 Marcadores de rasgo

2.4.4.1 MONOAMINO-OXIDASA (MAO).

La monoamino-oxidasa (MAO) es un marcador de rasgo o marcador de predisposición genética, si se identifican niveles bajos de la actividad de MAO con respecto a un control. Se ha planteado que la disminución de la actividad de la MAO plaquetaria puede estar asociada con factores responsables tanto para dependencia al alcohol etílico como a otras drogas. Otros autores señalan la relación de la disminución de la actividad de MAO y rasgos de la personalidad caracterizados por impulsividad, evitación de la monotonía y búsqueda de nuevas sensaciones. Por lo tanto se podría sugerir que la actividad de la MAO plaquetaria es un marcador biológico de rasgos de la personalidad que predispone al alcoholismo y al abuso de drogas (Nota: otros autores dicen que criminalidad = ↓ actividad de MAO).

La monoamino-oxidasa es una enzima que metaboliza las aminas biógenas, las de mayor interés para el propósito de este trabajo son las isoenzimas, la MAO-A y la MAO-B. Donde la MAO-A metaboliza la serotonina y norepinefrina, MAO B metaboliza feniletilamina y benzilamina [10].

Los niveles de actividad de la MAO están determinados genéticamente. La relación MAO-alcoholismo se han realizado en plaquetas y cerebro (autopsias). Los estudios se basan en la actividad enzimática mediante el uso de sustratos específicos para dicha enzima.

Dentro de las desventajas es que la mayoría de los estudios son con varones y no se ha tenido en cuenta el factor edad. La actividad se altera en otras patologías psiquiátricas: esquizofrenia, trastornos afectivos o trastorno antisocial de la personalidad. Además estas enfermedades pueden haber actuado como factor de confusión en dichos estudios.

2.4.4.2 TRANSFERRINA DEFICIENTE DE CARBOHIDRATOS (CDT).

La transferrina es una β -glicoproteína monomérica, se sintetiza en el hígado y tiene la función en la unión y transporte de hierro, en condiciones normales va unida a cadenas de ácido siálico y su semivida plasmática de la transferrina es de 6-14 días. Se ha descrito un déficit congénito en el que la transferrina no se une, o lo hace en muy poca cantidad, a las cadenas de ácido siálico. Este síndrome se caracteriza por hipotonía y debilidad muscular. Se ha observado que el consumo crónico de niveles altos de alcohol actúa sobre la transferrina, de forma que se une con menos radicales de ácido siálico de los habituales, conociéndose dicha molécula como transferrina deficiente en carbohidratos (CDT), el término se refiere a formas di- y mono- sialotransferrina.

La ingesta crónica de alcohol induce isoformas de CDT, disminuyendo la carga eléctrica negativa, pero para que se eleve la CDT, se necesita un consumo de unos 60 gr/día, durante 7 ó 10 días consecutivos [9,14].

2.4.5 Aplicación.

Aunque el consumo de alcohol etílico forma parte de las costumbres sociales, ya que se promueve y se permite su ingesta, es en la actualidad uno de los mayores problemas de salud pública en el país, por lo que es importante diferenciar un consumo reciente en bebedores sociales en situaciones inapropiadas o de riesgo. Como marcadores postmortem, en el caso de que la integridad de la muestra en análisis de alcohol esté cuestionada o no se encuentre disponible, para diferenciar la procedencia del etanol, es decir, si procede de una ingesta o se ha producido por la acción de los microorganismos.

Dentro de las aplicaciones están las siguientes:

- Medicina legal: se usa como marcadores de ingesta reciente, a corto o mediano plazo; como marcadores de consumo crónico, aun cuando el etanol haya sido eliminado puede ser utilizado, por ejemplo, para determinar responsabilidades en accidentes de tránsito
- Medicina laboral y alcoholismo durante el embarazo: identificar grupos de riesgo, ausentismo laboral, disminución en el rendimiento del trabajo, accidentes laborales
- Confirmar abstinencia en alcohólicos crónicos: que están sujetos a un tratamiento de deshabitación.

Las ramas de actividad con mayor número de problemas relacionados con el alcoholismo son la construcción, minería, química, transporte, etc., sin embargo paradójicamente todos sabemos quien bebió y en que cantidad y nadie dice nada.

2.5. INTRODUCCIÓN A LA CROMATOGRAFÍA

En 1906, el botánico ruso Mikhail Tswett (1872-1919) formalizó el uso de la cromatografía en estudios científicos [19], aplicándola a la separación de los pigmentos naturales que se encuentran en las plantas. Además le dio ese nombre a la técnica. Las características que distinguen a la cromatografía de la mayoría de los métodos físicos y químicos de separación, es que se ponen en contacto dos fases mutuamente inmiscibles. Una fase es estacionaria y la otra móvil. Una muestra que se introduce en la fase móvil es transportada a lo largo de la columna (colector) que contiene una fase estacionaria distribuida. Las especies de la muestra experimentan interacciones repetidas (repartos) entre la fase móvil y la fase estacionaria. Cuando ambas fases se han escogido en forma apropiada los componentes de la muestra se separan gradualmente en bandas en la fase móvil. Al final del proceso los componentes separados emergen en orden creciente en interacción con la fase estacionaria. El componente menos retenido en la columna emerge primero, el retenido más fuertemente eluye al último.

2.5.1. Definición de cromatografía.

La cromatografía es una técnica que permite separar, identificar y cuantificar los componentes de una mezcla de compuestos químicos.

2.5.2. Clasificación de la cromatografía.

La fase móvil puede ser un gas o un líquido, mientras que la fase estacionaria sólo puede ser un líquido o un sólido, como se muestra a continuación [1E].

Cromatografía

- Cromatografía de gases (Inicio en 1952 por James y Martín)
 - Gas-líquido (GLC)
 - Gas- Sólido (GSC)
- Cromatografía de líquidos
 - Líquido-Líquido (LLS)
 - Fase enlazada (BPC)
 - Líquido-Sólido (LSC)
 - Intercambio Iónico (IEC)
 - Pares de Iones
 - Exclusión (EC)

Cuando la separación involucra predominantemente un reparto simple entre dos fases líquidas inmiscibles, una estacionaria y la otra móvil, el proceso se llama **cromatografía líquido-líquido (LCC)**. Cuando en la aptitud retentiva de la fase estacionaria intervienen principalmente fuerzas físicas de superficie, el proceso se denomina **cromatografía líquido-sólido (LCS)**, por sus siglas en inglés) [19].

Otros dos métodos de cromatografía líquida difieren un poco en su modo de acción. En **cromatografía de intercambio iónico (IEC)**, por sus siglas en inglés), los componentes iónicos de la muestra se separan por el intercambio selectivo con iones de la fase estacionaria. En **cromatografía de exclusión (EC)**, de exclusion chromatography), la fase estacionaria proporciona una clasificación de moléculas basadas en su mayor parte en la geometría y el tamaño molecular. Este método también se llama cromatografía de permeación de gel, en la química de los polímeros y de filtración en gel, en la bioquímica.

Cuando la fase móvil es un gas, los métodos se llaman **cromatografía de gas-líquido (GLC)** y **cromatografía de gas-sólido (GSC)**.

Cromatografía de Gases.

Inició en 1952 por James y Martin, y para el propósito del estudio se utilizó la técnica de cromatografía de gas-líquido (tabla 6), donde el mecanismo de separación en cromatografía de gases es el coeficiente de distribución que está determinado únicamente por la afinidad del soluto por la fase estacionaria. De las características importantes de la muestra es que debe de ser volátil y debe resistir la temperatura elevada del puerto de inyección y de la columna capilar, se puede detectar compuestos polares o no polares, el disolvente debe ser volátil y normalmente con un punto de ebullición menor que el de los analitos, la fase móvil (gas) es sólo un portador de la muestra [19,20, 1E].

Tabla 6: Tipos de cromatografía de gases.

	Fase Estacionaria	Fase Móvil Gas Acarreador
Cromatografía Gas-Sólido (GSC)	Sólido	Gas
Cromatografía Gas-Líquido (GLC)	Líquido	Gas

Los componentes principales de un cromatógrafo de gases (Fig. 9) son: un inyector, el horno, columna, detector e integrador. Por medio del inyector se introduce la muestra; en los equipos mas modernos como el utilizado en este proyecto (GC Agilent modelo 6890 N) el inyector tiene la opción de introducir una porción de la muestra o toda la muestra (split/splitless), dependiendo de la cantidad a cuantificar [21], si cuantificáramos trazas, la opción mas viable es introducir toda la muestra, pero si la muestra esta muy concentrada se opta por introducir solo una parte para no saturar el detector. Cuando la muestra entra en contacto con la columna empieza la separación, con ayuda de los programas de temperatura del horno o rampas de calentamiento, se reduce el tiempo de análisis, obteniéndose picos más delgados, mejor reproducibilidad cuantitativa, especialmente en los últimos componentes que eluyen [24]. Se utilizó una columna capilar (polar), este tipo de columnas a diferencia de las columnas empacadas, son 10 veces mas largas y eficientes, utilizan una menor cantidad de muestra y exhiben la misma selectividad que las columnas empacadas. Cuando la muestra termina su recorrido por la columna pasa al detector el cual tiene la función de especificar el tipo de compuesto. El detector comúnmente empleado es el **detector de ionización de flama** (FID), en este detector los compuestos son quemados en una flama, produciendo iones (cationes) que son colectados y convertidos en corriente [22].

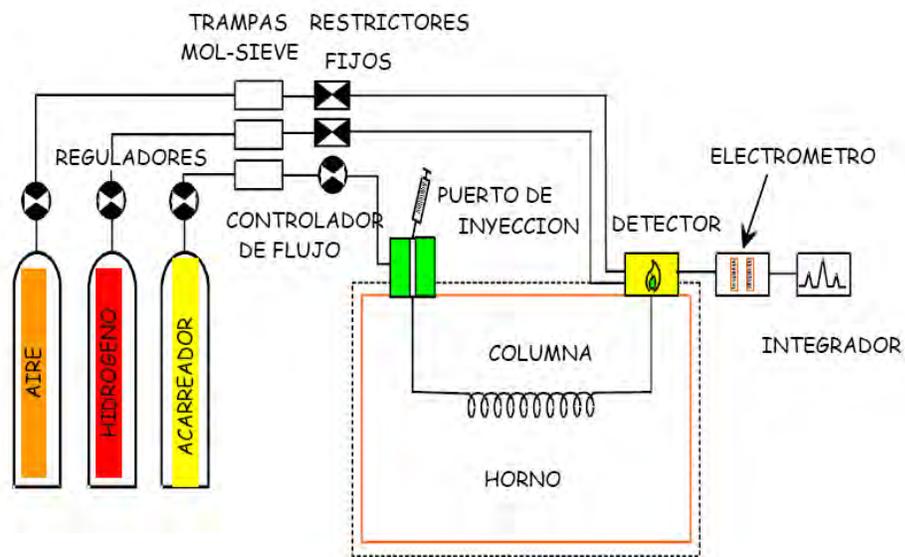


Figura 9: Diagrama básico de los componentes de un Cromatógrafo de Gases [22].

El detector FID es un detector destructivo de masa (fig. 10). Los cationes generados en la flama son colectados para producir una señal en el detector. Los analitos que tienen el número mayor de carbonos producen la señal mas grande, esta señal es transformada con un integrador en el que observamos los picos producidos indicándonos cada pico un compuesto orgánico, en la tabla 7 se presentan las condiciones y características de este detector. Además del detector FID, existen otros detectores con diferentes propiedades (Tabla 8).

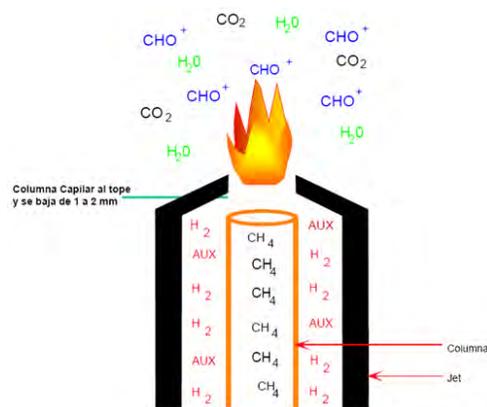


Figura 10: Modelo del funcionamiento del detector de ionización de flama.

Tabla 7: Detector de Ionización de Flama (manuales Agilent Technologies).

Determinación cuantitativa mínima	10 ⁻¹¹ g, alrededor de 10 ppb
Respuesta	Selectiva, sensible a compuestos orgánicos, No sensibilidad para permanentes, gases raros, Óxidos de Nitrógeno, Haluros de Silicón o Agua.
Estabilidad	Excelente (relativamente insensible a la temperatura y a los cambios de caudal)
Gas portador	Nitrógeno o Helio
Gases auxiliares	Aire e Hidrogeno
Temperatura limite	400 °C
Acción a la Muestra	Destructivo

Tabla 8: Condiciones de Operación de los Detectores comúnmente utilizados con CG Capilar.

Tipo	Muestras típicas	Rango de Sensibilidad	Acarreador + Auxiliar	Rango de flujo (ml/min.)	
				H2	Aire
FID	Hidrocarburos	10-100 pg 10 ppb-99%	20-60	30-40	200-500
TCD	General	5-100 ng 10 ppm-100%	15-30	n.a.	n.a.
ECD	Solventes y plaguicidas, órgano- halogenados clorados	0.05-1 pg 50 ppt-1 ppm	30-60	n.a	n.a.
NPD	Compuestos órgano fosforados y órgano nitrogenados	0.1-10 pg 100 ppt-0.1%	20-40	1-5	70-100
FPD(393 nm)	Compuestos azufrados	10-100 pg 10 ppb-100 ppm	20-40	50-70	60-80
MSD	Especies fragmentables	10 pg a 10 ng (dependiendo en SIM o scan)	0.5-30**	n.a.	n.a.
AED	Para metales	0.1 - 20 pg/sec (depende de los elementos)	60-70	presente	presente

2.5.3. Análisis de volátiles por cromatografía.

El muestreo de Headspace (Fig. 11) es una forma de introducir compuestos volátiles asociados a una muestra sin el uso de extracción por solventes [23]. En el headspace estático, la muestra es sellada dentro de un recipiente, calentada, y luego, una muestra de la atmósfera que rodea la muestra es tomada e inyectada al inyector del GC.

El muestreo de headspace dinámico es una técnica que utiliza el flujo de un gas acarreador a través del recipiente con la muestra para aumentar el tamaño de la muestra del headspace, y como consecuencia la sensibilidad del método. En lugar de permitir que la muestra llegue al equilibrio en un contenedor cerrado, la muestra es calentada y la atmósfera del headspace es continuamente purgada fuera del recipiente con la muestra a través de una trampa.

Así, los analitos son colectados, como en un análisis de purga y trampa, mientras el gas acarreador es venteadado. Luego la trampa es calentada y los componentes adsorbidos son enviados al GC para su análisis. “Debido a que no se utilizaron solventes para preparar la muestra, no habrá pico del solvente, ni “dilución” de los compuestos de interés, ni gasto de solvente”, aunque si existirá el pico del estándar interno para el propósito de este trabajo.

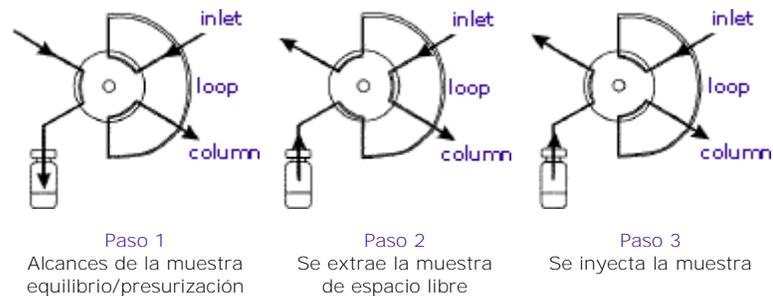


Figura 11: Modo de extracción e inyección de la muestra con el Headspace, utilizando el sistema pressurized loop [24].

Inyección con Headspace

Una porción de gas (headspace) que está en equilibrio de una muestra sellada, es calentada en un vial e inyectada en el puerto del cromatógrafo de gases.

Utilizado para analizar volátiles en:

- Muestras Sucias.
- Muestras Sólidas.
- Muestras que contienen compuestos de alto punto de ebullición y que no son de interés.
- Muestras con alto contenido de agua.

La muestra es colocada en un horno a temperatura constante y permitir llegar a una temperatura de equilibrio.

Una alícuota de gas en el espacio de cabeza, arriba de la muestra es tomada con una jeringa impermeable a gases (gas-tight) por otros medios.

El gas muestreado del espacio de cabeza es analizado utilizando el GC.

3. OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la concentración de metanol, en muestras de origen forense de cadáveres humanos, comparando individuos no-alcohólicos y alcohólicos, para utilizarlo como parámetro de alcoholismo en casos medico-legales.

3.1. OBJETIVOS PARTICULARES

- Seleccionar las condiciones instrumentales óptimas para la identificación y cuantificación de metanol en el cromatógrafo de gases acoplado al Headspace.
- Cuantificar metanol en muestras sanguíneas de individuos alcohólicos (alcoholismo crónico) y no alcohólicos, por CG-HS.
- Comparar los resultados de ambas muestras para determinar si el metanol puede utilizarse como marcador de alcoholismo dentro del ámbito legal.
- Evaluar los efectos de la putrefacción en la determinación y cuantificación de metanol y propanol, para sustentar el estado óptimo de la muestra analizada.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

LUGAR DONDE SE DESARROLLO LA TESIS.

Laboratorio de Química del Servicio Médico Forense del Distrito Federal

4.1. INSTRUMENTACIÓN Y REACTIVOS:

- Viales (capacidad 20 ml) para Headspace
- Engargoladora
- Septas
- Tapas
- Cromatógrafo de gases marca Agilent modelo 6890, Headspace marca Agilent modelo G1880, (Wilmington, De. USA).
- Matraz aforado de 25 ml, 50 ml y 100ml
- Vaso de precipitado de 50ml 100 ml y 250 ml
- Balanza analítica (Sartorius, M 2472, Gottingen, Alemania).
- Pipetas de 1ml, 2 ml, 5 ml y 10 ml
- Reactivos analíticos (J.T. Baker, Xalostoc, México)
 - Isobutanol
 - Metanol
 - Nitrito de sodio
 - Propanol
- Agua destilada



Tabla 9: Propiedades físico-químicas de los reactivos.

Reactivo	METANOL	PROPANOL	ISOBUTANOL	NITRITO DE SODIO
Formula	CH ₃ OH	CH ₃ CH ₂ CH ₂ OH		NaNO ₂
Sinónimos	Alcohol metílico, alcohol de madera.	1-propanol, alcohol propílico	2-metil-2propanol, tert-butyl alcohol	
Densidad d ₄ ^{25°C}	0.7866	0.8016	0.78086	
Peso Molecular	32.04 g/mol	60.1 g/mol	74.1 g/mol	68.999 g/mol
Pureza	99.9 %	99.9 %	99.2%	98.60 %
Punto de ebullición	63.5° a 65.7°C	Aprox. 96°C	82.41°C	

4.2 Preparación de soluciones y muestras.

Preparación de soluciones

Metanol (estándar externo)

Solución A

Preparación de una solución de concentración 1000 mg/100 ml, para ello agregar 0.318 ml de R.A. metanol y aforar a 25 ml.

Solución B

Preparación una de solución de concentración 10 mg/100 ml. De la sol A tomar 1 ml y aforar a 100 ml.

Propanol (estándar externo)

Solución A1

Preparación de una solución de concentración 1000 mg/100 ml, para ello agregar 0.312 ml de R.A. propanol y aforar a 25 ml.

Solución B1

Preparación de una solución de concentración 25 mg/100 ml. De la sol A1 tomar 2.5 ml y aforar a 100 ml.

Isobutanol (Estándar Interno).

Solución A2

Preparación de una solución de concentración 1000 mg/100 ml, para ello agregar 0.322 ml de R.A. Isobutanol y aforar a 25 ml.

Solución B2

Preparación de una solución de concentración 25 mg/100 ml. De la sol A2 tomar 2.5 ml y aforar a 100 ml.

Nitrito de sodio.

Preparación de una solución de nitrito de sodio (NaNO_2) 188 mM. Esta sal (0.6577g) se coloca a los estándares finales, que se aforan a 50 ml.

Esta sal ayuda a que en el sistema se libere mejor los alcoholes al evaporarse.

Muestras.

0.4 ml de sangre problema + 1.6 ml de E.I. (sol. C2, 0.25 mg/100ml) + nitrito de sodio 188 mM.

Soluciones patrón (estándares).

0.4ml de H₂O destilada (ó °HPLC) + 1.6 ml de solución estándar + nitrito de sodio 188 mM (ver Tabla 11).

Estándar interno.

Concentración final (0.25 mg/dl) al diluir 1.6ml en 2ml (0.2mg/dl).

a) preparar una solución de 25mg/ 100ml de isobutanol.

b) tomar 1ml de la solución anterior y aforar a 100 ml con H₂O destilada (ó °HPLC)

Sol. C2

Preparación de curva de calibración.

Para la cuantificación de metanol y propanol se prepararon inicialmente 5 soluciones de estándares (tabla 10), y de estos se tomo un volumen de 1.6ml del estándar correspondiente + 0.4ml de agua destilada de acuerdo a la tabla 11, para construir la curva de calibración por E.I., obteniéndose las concentraciones finales en los viales para su corrida por CG-HS.

Tabla 10. Preparación de los sistemas.

reactivos \ sistema	1	3	5	7	9
Metanol ml sol.B	0.5	1.5	2.5	4.0	7.0
Propanol ml sol. B1	0.5	1.5	2.5	4.0	7.0
Isobutanol ml sol. B2	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Nitrito de sodio, gramos	0.6577	0.6577	0.6577	0.6577	0.6577
Volumen de Aforo, ml	50	50	50	50	50
Concentración final Metanol, mg/dl	0.1	0.3	0.5	0.8	1.4
Concentración final propanol, mg/dl	0.25	0.75	1.25	2.0	3.5
Concentración final Isobutanol, mg/dl	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25

Tabla 11. Preparación de la curva de calibración y su concentración en el sistema (vial), volumen total en el vial 2 ml.

Sistema	1	3	5	7	9
Volumen de los sistemas, ml	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6
Volumen de agua destilada (ó °HPLC) ml	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
Volumen total en vial , ml	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
Concentración final Metanol mg/dl	0.08	0.24	0.4	0.64	1.12
Concentración final propanol mg/dl	0.2	0.6	1.0	1.6	2.8
Concentración final Isobutanol mg/dl	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2

4.3. Condiciones instrumentales del método:

Tipo de inyección: Headspace sampler.

Condiciones del Headspace

Temperaturas (°C)		Equilibrio del vial	10.0 min
Horno	60	Pressurization	1.0 min
Loop	120	Loop fill	0.015 min
Línea de transferencia	130	Equilibrio del Loop	0.05 min
Shaking	off	Inyección	1.0 min
		GC ciclo	5.2 min
Presión (psi)			
	Carrier 15 psi		vial 5.5 psi

Condiciones del cromatografo de gases.

Horno: temperatura inicial 85 °C, tiempo final 2.00 min.

Rampa:

#	Razón	Temp. Final	Tiempo final
1	30.00 °C	120 °C	2.00 min
2	0.00 °C		

Temperatura post.: 50 °C

Tiempo post. : 0.00 min

Tiempo de corrida: 3.17

Equilibrio: 1.00 min

Inyector (Inlets):

Modo: split (dividir); Temperatura inicial: 200 °C; Presión: 14.27 psi;

Proporción split: 1:1; Flujo split: 3.0 ml/min; Flujo total: 8.3 ml/min

Tipo de gas: Nitrógeno

Columna capilar.

Modelo No. J &W 123-1334 260°C Max. DB-624 , 30.0 m X 320 µm X 1.80 µm

Modo: flujo constante; Flujo inicial: 3.0 ml/min; Presión: 14.27 psi; Velocidad promedio: 49 cm/seg.

Detector (FID).

Temperatura: 250 °C; Flujo de hidrogeno: 35.0 ml/min; Flujo de aire: 450.0 ml/min; Flujo del makeup: 25.0 ml/min nitrógeno.

Señal: entrada de datos 5Hz.

Presión auxiliar: nitrógeno 5.5 psi tiempo inicial 0.0min

4.4. Toma de muestra y material biológico.

La barrera hematoencefálica tiene dentro de una de sus funciones la de no dejar pasar microorganismos nocivos al encéfalo, esta importante función evita que no exista la posibilidad de presencia bacteriana, por lo tanto, esta barrera nos provee de una muestra con menor o nula contaminación por parte de microorganismos productores de alcoholes, lo que reduce significativamente un error externo por microorganismos en el estudio de cuantificación de metanol endógeno y no de metanol exógeno producido por algún microorganismo los cuales toman como sustrato a los azúcares (glucosa, etc.) que contiene la sangre.

La muestra de sangre se obtuvo de cadáveres humanos con antecedentes de alcoholismo y no-alcoholismo. Se tomaron en cuenta aspectos patológicos (cirrosis hepática, hígado graso, páncreas hemorrágico, ascitis y edemas) siempre que estuvieron presentes y el estudio del expediente del sujeto de estudio para averiguar su actividad cotidiana, sus costumbres y hábitos.

Se optó por tomar muestra de la cavidad craneal y no de la cavidad torácico-abdominal, por que en esta última se corre el riesgo de obtener falsos positivos, ya que el alcohol al encontrarse en concentraciones elevadas en el estómago puede difundirse en esta cavidad y contaminar la sangre acumulada en este sitio. Las muestras obtenidas de la cavidad craneal son más adecuadas por que es difícil su contaminación exógena al tener como forma de resguardo al cráneo como tal.

Material biológico:

Sujetos analizados.

Para el estudio se analizaron un total de 186 muestras de cadáveres humanos, los que se dividen en las siguientes poblaciones:

No- alcohólicos. Esta muestra fue subdividida en 2 grupos; 90 muestras (grupo= NA) eran no alcohólicos. Un total de 28 sujetos bajo el efecto del alcohol etílico (grupo = BS), catalogados como bebedores sociales (23 hombres y 5 mujeres), tomando como referencia lo declarado por sus familiares en la averiguación previa.

Alcohólicos. El grupo clasificado como alcohólicos constaba de 68 individuos, donde se dividen en alcohólicos en estado de ebriedad (alcohólicos reacción positiva a etanol = ARPE) y los alcohólicos negativos a etanol (alcohólicos reacción negativa a etanol = ARNE).

Su estado de la salud y la historia de tomar drogas (en algunos sujetos) para los cuatro grupos fue confirmado en base a lo referido por sus familiares en la averiguación previa. Las principales enfermedades y/o patologías de algunos sujetos de estudio eran cirrosis hepática, el trastorno del metabolismo de grasa (hígado graso), ascitis, pancreatitis hemorrágica y diabetes, hallazgos que fueron detectados en la necropsia. Algunos sujetos dieron positivo para cocaína. Sin contar con el alcoholismo algunos pacientes tenían enfermedades del hígado.

El proceso de selección fue totalmente al azar, pues se agrupaba la muestra de acuerdo a la población y grupo correspondiente al término de la necropsia del cuerpo ingresado.

4.5. Metodología y Esquema del ensayo de cuantificación.

Se desarrolló un método (Fig. 12) capaz de cuantificar trazas de metanol y propanol en muestras (post-mortem) de origen forense.

Para la determinación de metanol, se tomaron muestras sanguíneas provenientes de la cavidad craneal de cadáveres, de individuos alcohólicos y no alcohólicos, las cuales se les cuantificó metanol por cromatografía de gases con inyección Headspace, utilizando el método de estándar interno. Se cuantificó a sujetos normales y sobrios, metanol y la presencia de propanol al inicio de la toma de muestra y posteriormente de acuerdo a un calendario de actividades, así mismo se realizó la comparación de la relación metanol-propanol, metanol-etanol. El método utilizado fue validado. Los datos arrojados se analizaron con el programa estadístico StatGraphics plus 5.1.

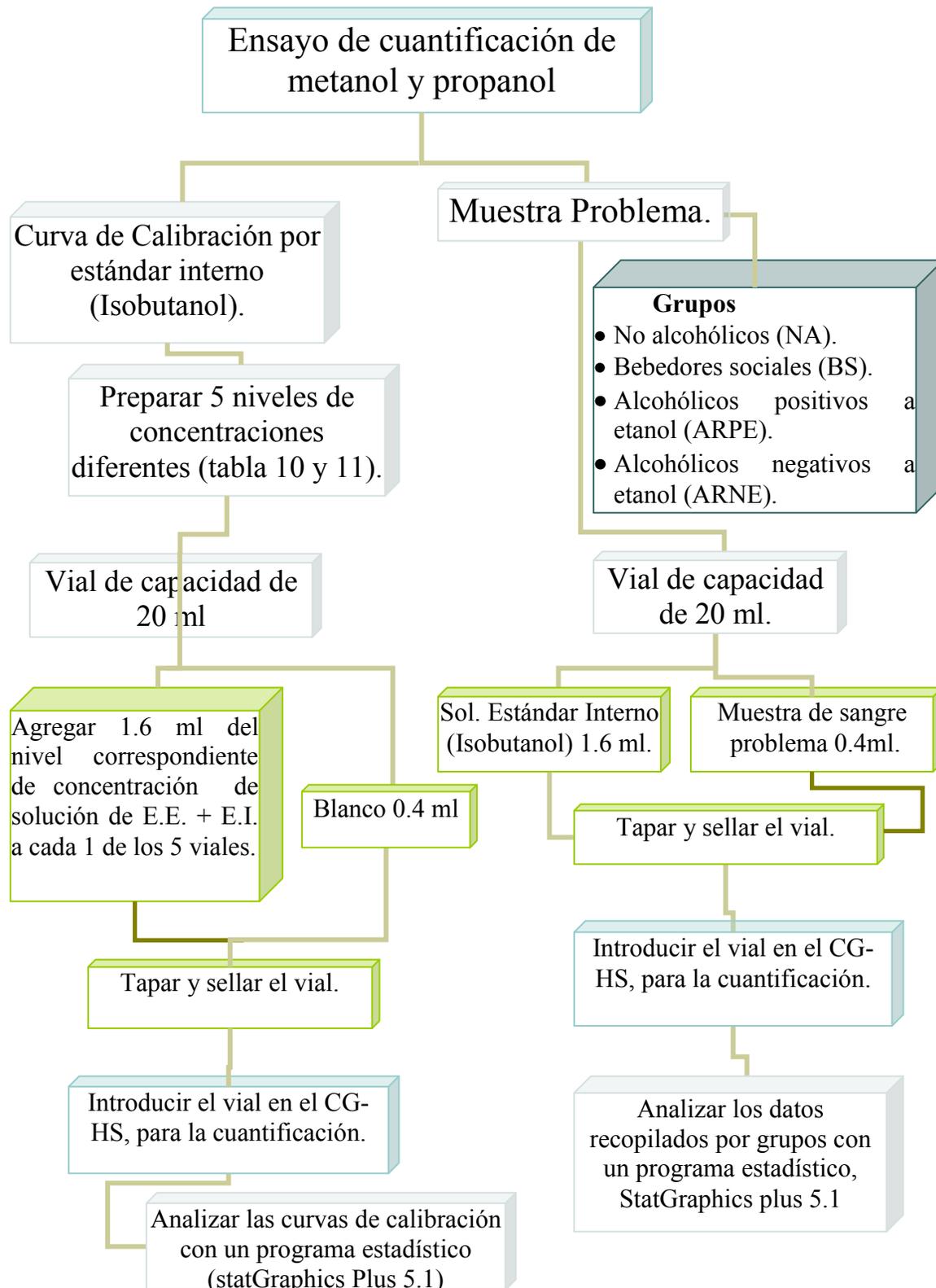


Figura 12. Diagrama del ensayo de cuantificación de metanol y propanol.

5. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.

5.1. Desarrollo del método analítico.

Para desarrollar la técnica se tomo como referencia el método de determinación de etanol y otros solventes volátiles en muestras de origen forense, usado por el departamento de química del SEMEFO del D.F., conforme se realizaba el proyecto se fue modificando de acuerdo a las necesidades para obtener resultados mas viables, se cambió la rampa de calentamiento, se valoraron diferentes tiempos de calentamiento del HS, así como la Presión auxiliar que se inyecta al vial para una mejor extracción (nitrógeno 5.5 psi), también se agregó una sal para favorecer la extracción de compuestos volátiles. De las anteriores modificaciones se obtuvieron los siguientes resultados.

Identificación de isobutanol, metanol y propanol.

Se corrieron estándares de referencia por separado de Isobutanol, Metanol y Propanol, en donde, se determino su tiempo de retención de cada estándar, bajo las siguientes condiciones de instrumentación:

Horno: temperatura inicial 85 °C, tiempo final 2.00 min.

Rampa:

#	Razón	Temp. Final	Tiempo final
1	30.00 °C	120 °C	2.00 min
2	0.00 °C		

Temperatura post.: 50 °C

Tiempo post. : 0.00 min

Tiempo de corrida: 3.17

Equilibrio: 1.00 min

Inyector (Inlets):

Modo: split (dividir); Temperatura inicial: 200 °C; Presión: 14.27 psi;

Proporción split: 1:1; Flujo split: 3.0 ml/min; Flujo total: 8.3 ml/min

Tipo de gas: Nitrógeno.

Columna capilar. Modelo No. J &W 123-1334 260°C Max. DB-624 , 30.0 m X 320 µm X 1.80 µm

Modo: flujo constante; Flujo inicial: 3.0 ml/min; Presión: 14.27 psi; Velocidad promedio: 49 cm/seg.

Detector (FID). Temperatura: 250 °C; Flujo de hidrogeno: 35.0 ml/min; Flujo de aire: 450.0 ml/min; Flujo del makeup: 25.0 ml/min nitrógeno.

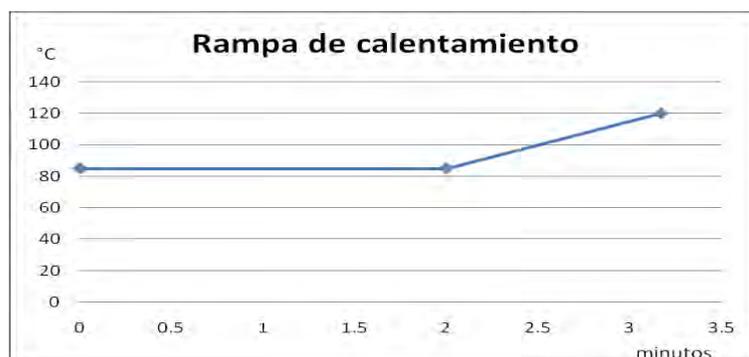


Figura 13. Rampa de calentamiento del horno del CG, donde la temperatura inicial es de 85°C/2', y aumenta 30°C/min. hasta llegar a 120°C.

El efecto del aumento en la temperatura de la columna, es una disminución en el tiempo que eluye la molécula (alcoholes, para el propósito de este proyecto), por lo que, la rampa de calentamiento antes mencionada, disminuye el tiempo de corrida de los 3 analitos a determinar y cuantificar, dando de esta manera una disminución en el tiempo de análisis de muestras problema en los laboratorios forenses.

El primer alcohol que eluye (Fig. 14) es el metanol con un tiempo de retención de 1.38 min., para propanol de 1.99 min. y por ultimo eluye el Isobutanol con un tiempo de retención de 2.49 min. Cuando la corrida cromatográfica lleva 2 minutos, empieza el aumento en la temperatura del horno del CG en 30°C por minuto hasta llegar a 120 °C (Fig. 13), lo cual acorta el tiempo en que eluye el Isobutanol, de lo contrario su tiempo de retención seria mayor a 2.49 minutos, y por lo tanto, aumenta el tiempo de análisis.

Los parámetros cromatográficos (Tabla 12) reflejan una adecuada separación de los componentes a identificar al obtenerse una buena resolución ($R_s > 1.5$ para todos los casos), al trabajar con una columna capilar con una longitud de 30 m y un flujo de 3 ml/min, la eficacia de la columna aumento obteniéndose resultados aceptables con una $N > 30,000.0$ [25].

Tabla 12. Parámetros cromatográficos experimentales de interés del estándar 7 (por cuadruplicado).

COMPONENTE	ANCHO DE PICO (W)	NÚMERO DE PLATOS (N)	RESOLUCIÓN (R_s)	Factor de retención (K')
METANOL	0.0143	52182.5	1.475	0.0035
PROPANOL	0.021325	48655.75	14.2425	0.4500
ISOBUTANOL	0.0261	50627	12.2025	0.8100

Nota: N, su calculo se baso en determinar $W_{1/2}$, la anchura del pico a la mitad de su altura máxima: $N=5.54(t_R/W_{1/2})^2$. [25].

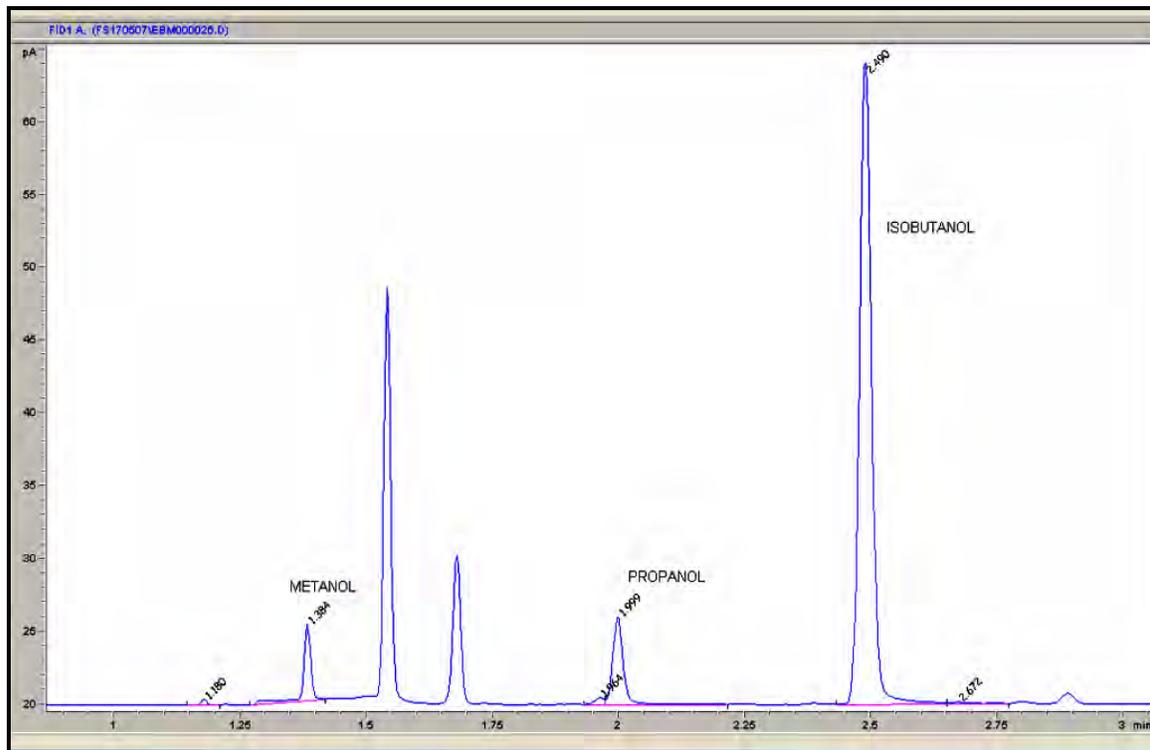


Figura 14. Cromatograma para el análisis cualitativo y cuantitativo de metanol y propanol, donde se observa el tiempo de retención de cada analito de interés.

Técnica del salado (SALTING OUT).

Para poder determinar las trazas de metanol y obtener mejores resultados en la cuantificación y aumentar la sensibilidad, se optó por agregar una sal. Para el propósito de este proyecto se utilizó Nitrito de sodio (NaNO_2), se agregó la sal para favorecer la evaporación y por lo tanto la cuantificación, así como, evitar la oxidación del alcohol a temperaturas por arriba de los 60°C [26,27].

Se realizaron corridas cromatográficas con diferentes concentraciones de nitrito de sodio (50, 100, 150, 200 mM), donde se evaluó la altura y área del pico de isobutanol y metanol (Tabla 13 y 14).

Tabla 13. Búsqueda de la concentración óptima de nitrito de sodio, para aumentar el área del pico de metanol e isobutanol

Concentración [] mM	AREA (counts*s)		
	Metanol	Isobutanol	MeOH/Isob
50	231	88.8	2.60135135
100	238.3	73.2	3.25546448
150	280.6	65.6	4.27743902
200	273.8	63.6	4.30503145

Tabla 14. Búsqueda de la concentración óptima de nitrito de sodio, para aumentar la altura del pico de metanol e isobutanol.

concentración [] mM	ALTURA		
	Metanol	Isobutanol	MeOH/Isob
50	144.6	49.4	2.92712551
100	148.4	36.4	4.07692308
150	157.8	39.3	4.01526718
200	151.3	30.3	4.99339934

Como la oxidación de alcoholes se favorece a temperaturas que exceden 40°C, pero, por otro lado las temperaturas altas incrementan el coeficiente de partición de aire-sangre y, por consiguiente, la sensibilidad [23], por lo que, se agregó nitrito de sodio para impedir la oxidación y así poder aumentar la temperatura a 60°C [26] (el estándar interno corrige las fluctuaciones de la temperatura del horno del Headspace), pero a temperaturas por arriba, los componentes de la muestra empiezan a reaccionar, oxidando los alcoholes presentes en la sangre.

La sensibilidad aumentó, debido al efecto del salting-out, y fue obtenida usando, nitrito de sodio. Sin embargo, las presiones de vapor de componentes volátiles en una temperatura dada, han sido dependientes del contenido de agua de la muestra. Ha sido demostrado que la saturación con soluciones en milimoles (mM) de nitrito de sodio, minimiza los errores del efecto de la matriz (proteínas, lípidos contenido de glóbulos rojos, etc.) al hacer dilución de la muestra (al menos 1: 5) [23,26]. Pero también en la determinación de metanol y propanol se ve favorecida por las ventajas de la técnica del Headspace, donde elimina casi completamente los efectos de la matriz.

Para una mejor visualización de encontrar la concentración de nitrito de sodio, los resultados obtenidos en las tablas 13 y 14, se graficaron (Fig. 15 y 16), observándose una sensibilidad alta a una concentración de nitrito de sodio de 150 mM a 200 mM, lo que nos indica que la concentración óptima esta entre el anterior parámetro, por lo que no hay inconveniente en preparar una solución de nitrito de sodio 188 mM, como lo indican la literatura [27].

En la figura 17 y 18, correspondientes a la relación del estándar externo con el estándar interno, existe una mejor estabilidad cuando se toma en cuenta al área en el rango de concentración 150 -200 mM de nitrito de sodio. Sin embargo, existe una mayor sensibilidad en la relación MeOH/Isob para la altura del pico (Fig. 18), demostrándose que es mejor tomar en cuenta para la cuantificación la altura que el área del pico, pero con el estudio de la variable del tiempo de incubación del vial, se concluye lo contrario.

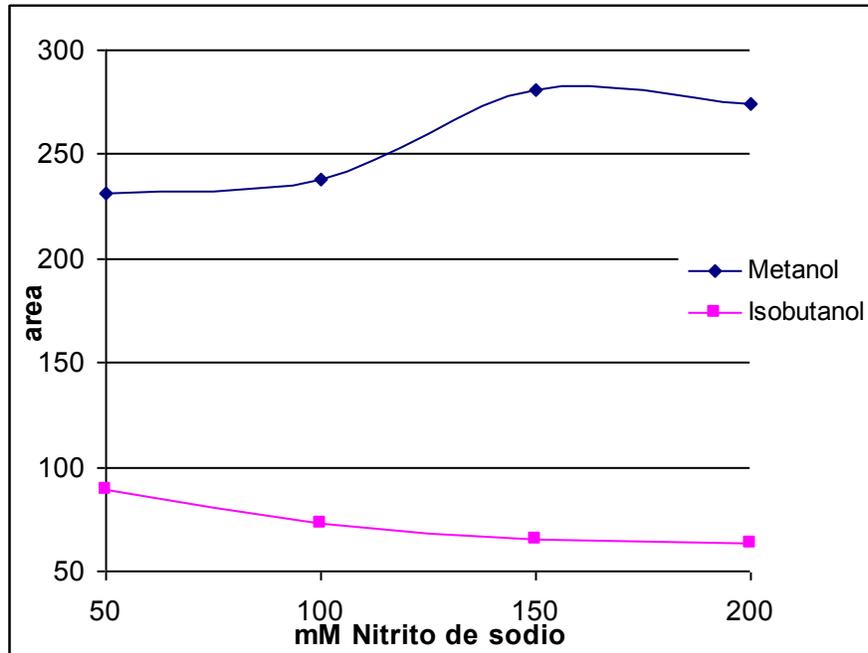


Figura 15. Grafica representativa del cambio en el área del pico de isobutanol y metanol con diferentes concentraciones de nitrito de sodio. Área en counts*s.

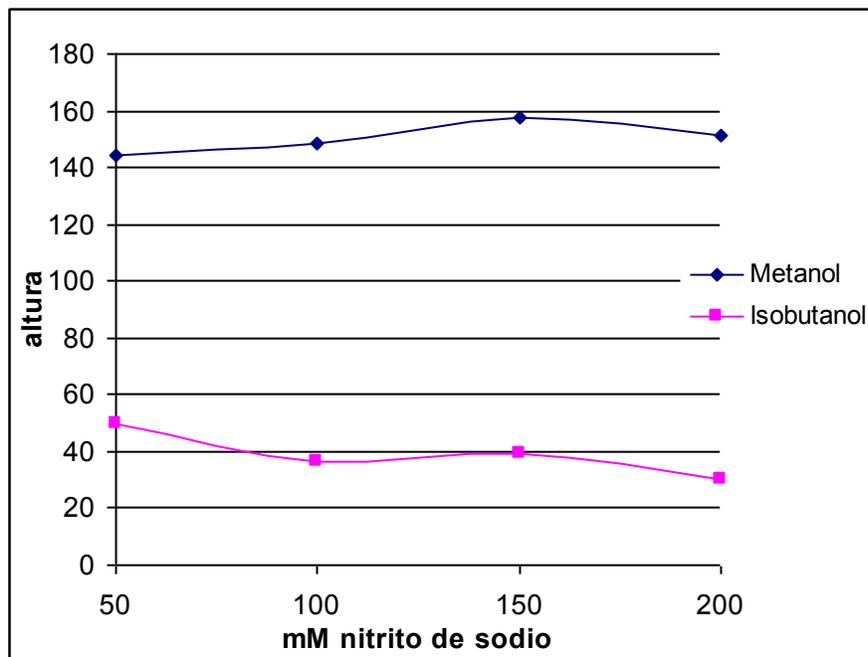


Figura 16. Grafica representativa del cambio en el área del pico de isobutanol y metanol con diferentes concentraciones de nitrito de sodio. Área en counts*s.

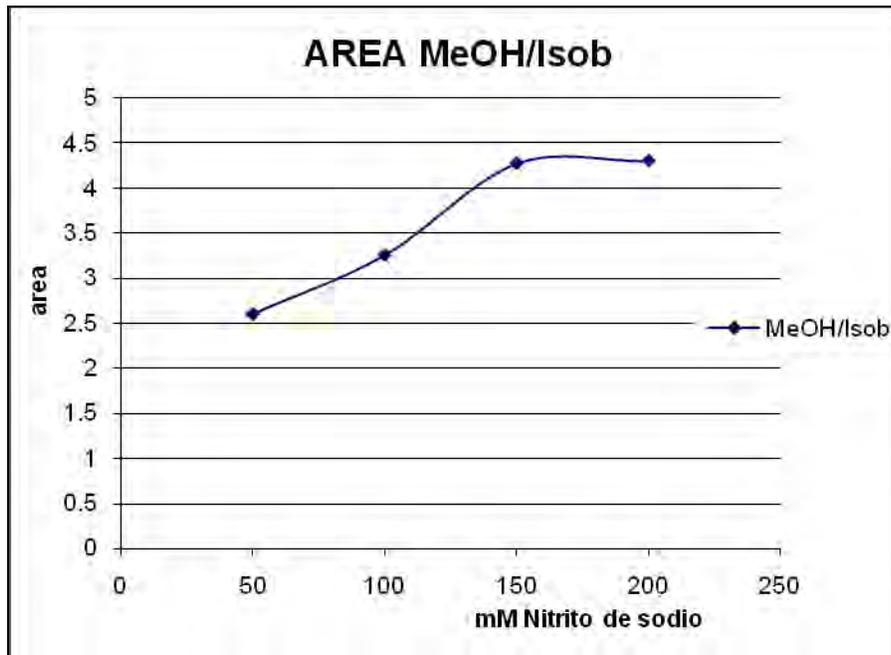


Figura 17. Grafica representativa del cambio en el área del pico de isobutanol y metanol con diferentes concentraciones de nitrito de sodio. Área en counts*s.

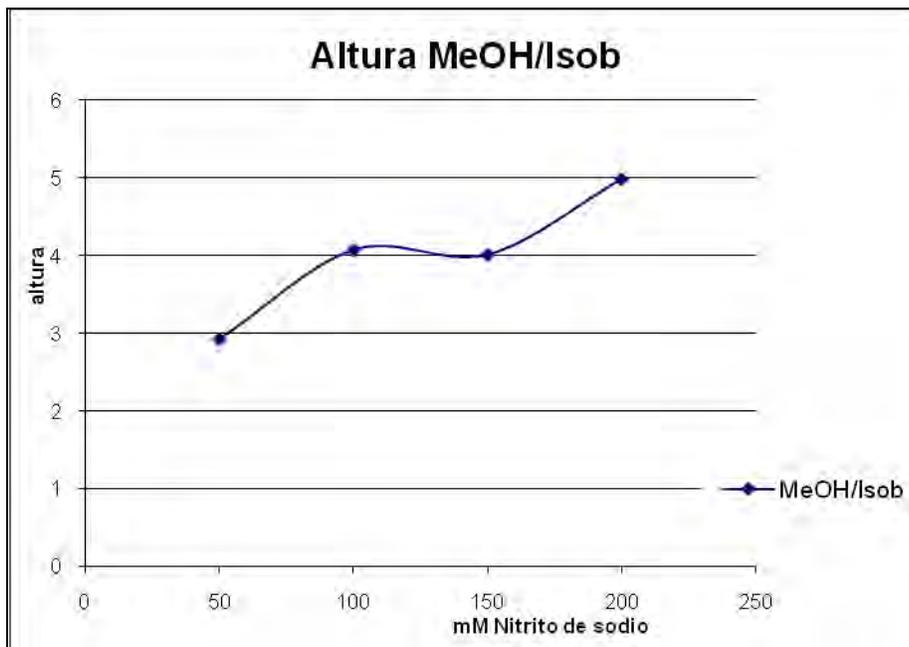


Figura 18. Grafica representativa del cambio en el área del pico de isobutanol y metanol con diferentes concentraciones de nitrito de sodio. Área en counts*s.

Tiempo de incubación de la muestra en el Headspace.

La inyección por Headspace tiene numerosos factores que deben optimizarse para su adecuado funcionamiento, tales como, la temperatura del calentamiento de la muestra en el vial (se incubó a 60°C) [26], donde no se puede aumentar la temperatura, por que, al estar en combinación los alcoholes con la sangre, estos se oxidan [27]), el tiempo de incubación y la presión de un gas inerte que se inyecta al final del calentamiento para facilitar la extracción de los componentes volátiles de la sangre.

El aumentar la temperatura del horno del HS, que es una técnica para aumentar la presión de vapor y aumentar la sensibilidad en la detección de los analitos [23], sin embargo, no es lo adecuado por reacciones químicas que se llevan a cabo en las muestras biológicas, por lo que, para aumentar esta presión de vapor sin aumentar la temperatura, se inyecta nitrógeno (gas inerte) al vial, hasta llegar a una presión de 5.5 psi, dando resultados confiables y que ayuda a poder detectar trazas de metanol en las muestras biológicas, en otras palabras, aumenta la sensibilidad.

Tabla 15. Evaluación del efecto del tiempo de calentamiento sobre el área del pico de cada analito de interés.

Minutos	ÁREA (counts*s)		
	Metanol	Isobutanol	MeOH/Isob
0	0	0	0
5	118	151.4	0.77939234
10	201	169	1.18934911
15	273	174.4	1.56536697
20	191	159.4	1.19824341
25		137	0
30	205.8	194.4	1.05864198

Tabla 16. Evaluación del efecto del tiempo de calentamiento sobre la altura del pico de cada analito de interés.

Minutos	ALTURA		
	Metanol	Isobutanol	MeOH/Isob
0	0	0	0
5	63	43.4	1.4516129
10	92.5	71	1.3028169
15	88.7	69.6	1.27442529
20	80	80.6	0.99255583
25		84.5	0
30	98.6	88	1.12045455

Al observar los resultados obtenidos en la tabla 15, se observa que el área aumenta a su máximo a los 15 min de incubación para metanol pero para isobutanol es a los 30 min y para la altura del pico en la figura 19, da su máximo a los 30 min de incubación para ambos componentes (Tabla 16), pero cuando se graficó la relación MeOH/Isob (Fig. 20), se observa que tiene mejores resultados en la sensibilidad a los 15 minutos de calentamiento del vial. Como la cuantificación se fundamenta en la comparación de la altura o el área de un pico de un analito con los picos o áreas de uno o varios patrones, es importante mencionar que el área de un pico no se modifica con las condiciones que ocasionan el ensanchamiento de los picos, desde este punto de vista, el área de un pico es un parámetro más adecuado que la altura del mismo, por lo tanto, se tomó como consideración el uso del área del pico (aunque, es más difícil medir el área del pico sin la ayuda de un software, en este proyecto se utilizó la Chem Station Revision B.02.01-SR1, para integrar los datos). Se tomaron criterios tales como: determinar el tiempo óptimo de incubación para la sensibilidad, gasto de gases (nitrógeno, hidrógeno y aire) y el tiempo de análisis, en donde, de acuerdo a la gráfica de la figura 20, a los 5 min de calentamiento se da las mejores condiciones tomando en cuenta el área, sin embargo, este tiempo no es el óptimo para la sensibilidad del Isobutanol como estándar interno (Fig. 19), no se toma en consideración una incubación de 15 min, por que, no aumenta tanto la sensibilidad respecto a un calentamiento por 10 min y además su análisis llevaría mas tiempo, por lo tanto, el tiempo óptimo es a los 10 min de incubación, donde se tiene sensibilidad para el estándar externo como para el interno y en la relación MeOH/Isob tiene una buena sensibilidad.

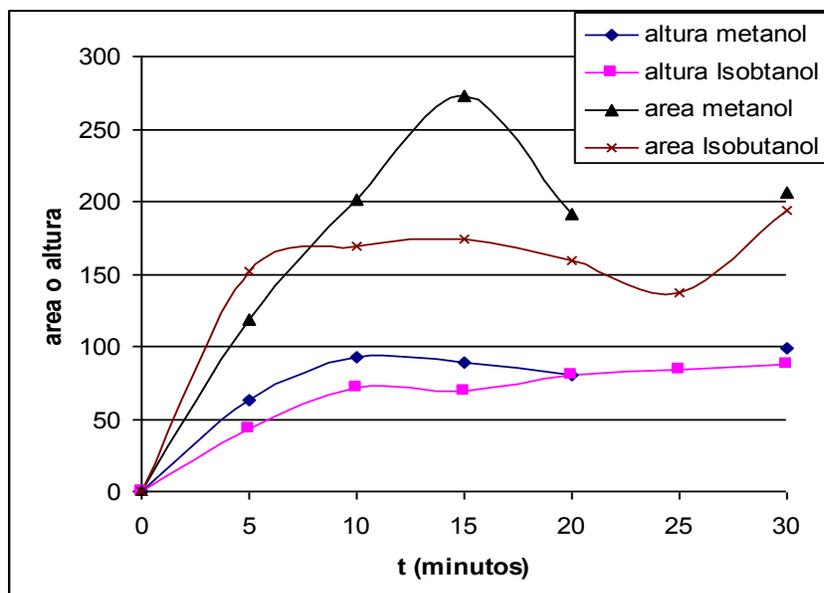


Figura 19. Gráfica del tiempo de incubación de la muestra a 60°C, comparando altura y área del pico, para isobutanol y metanol (Área en counts*s).

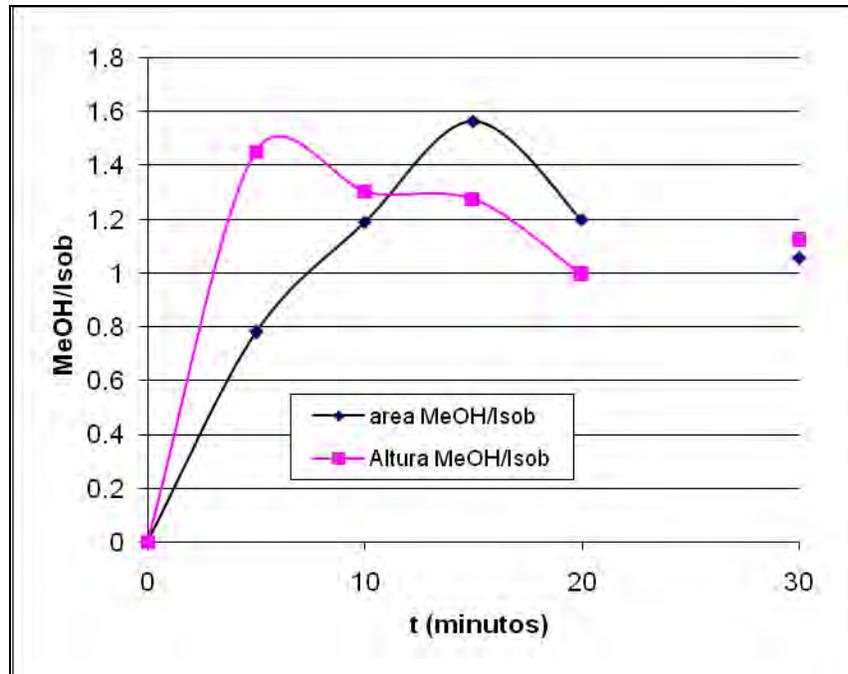


Figura 20. Grafica del tiempo de incubación de la muestra a 60°C, comparando la relación Metanol/Isobutanol de la altura y área del pico (Área en counts*s).

5.2 Validación del método analítico para la cuantificación de metanol y propanol en muestras de cadáveres humanos.

Linealidad del método.

Para la linealidad del método en la tabla 17 se encuentran la relación de áreas (área de Metanol / área de Isobutanol) de los picos de la curva de calibración por estándar interno por triplicado. El modelo lineal que describe la relación entre el área Metanol/Isobutanol y la concentración del metanol (Figura 21) de la tabla 17, es la ecuación de la recta ($Y = b + m \cdot X$), los parámetros de esta ecuación se encuentran en la tabla 19.

Tabla 17: Linealidad del método analítico (metanol).

ANÁLISIS DE DATOS CON EL ESTÁNDAR INTERNO				
	MeOH/Isobutanol		Análisis del poder predictivo	
conc. MeOH	Áreas	áreas/conc	CONC. EST	% DESV
0.08	0.098071462	1.22589328	0.082048331	2.56%
0.08	0.091034308	1.13792885	0.073813951	-7.73%
0.08	0.097217226	1.21521533	0.081048764	1.31%
0.24	0.229890187	0.95787578	0.236293283	-1.54%
0.24	0.225057442	0.93773934	0.230638346	-3.90%
0.24	0.242920749	1.01216979	0.251540724	4.81%
0.4	0.345292384	0.86323096	0.371328773	-7.17%
0.4	0.365443487	0.91360872	0.394908169	-1.27%
0.4	0.400630921	1.0015773	0.436082016	9.02%
0.64	0.549532532	0.85864458	0.610316153	-4.64%
0.64	0.66549113	1.03982989	0.746002706	16.56%
0.64	0.514818395	0.80440374	0.569696125	-10.98%
1.12	1.024107247	0.91438147	1.165629929	4.07%
1.12	0.966984109	0.86337867	1.098788472	-1.89%
1.12	0.961066633	0.85809521	1.09186426	-2.51%
	Promedio	0.97359819		
	Desv Est.	0.13197488		
	C.V.	13.56%		
PENDIENTE	0.854606415		1.0000000	
INTERCEPTO	0.027952432		1.11022E-16	
R ²	0.988574423		0.988574423	

Con respecto a la linealidad de la curva de calibración con estándar interno de propanol (Tabla 18) se realizaron mediciones por triplicado. El modelo que describe la relación entre la variable dependiente (área Propanol/Isobutanol) y la variable independiente (concentración Propanol en mg/dl), es la ecuación de la recta ($Y = b + m \cdot X$), los parámetros de esta ecuación se encuentran en la tabla 19 y se representan en la figura 22.

Tabla 18: Linealidad del método analítico (Propanol).

ANALISIS DE DATOS CON EL ESTÁNDAR INTERNO				
	Prop/Isob		ANALISIS DEL PODER PREDICTIVO	
conc. Prop	Áreas	áreas/conc	CONC. EST	% DESV
0.2	0.550353016	2.75176508	0.248402529	24.20%
0.2	0.468088183	2.34044091	0.21813258	9.07%
0.2	0.453472533	2.26736266	0.212754644	6.38%
0.6	1.327453142	2.2124219	0.534342225	-10.94%
0.6	1.501433593	2.50238932	0.59835961	-0.27%
0.6	1.74495214	2.90825357	0.687964047	14.66%
1	2.261378367	2.26137837	0.877986868	-12.20%
1	2.614636015	2.61463602	1.007970613	0.80%
1	2.679233634	2.67923363	1.031739781	3.17%
1.6	4.068963539	2.54310221	1.543101103	-3.56%
1.6	4.500077465	2.81254842	1.701732637	6.36%
1.6	3.867411233	2.41713202	1.468938452	-8.19%
2.8	7.875925711	2.81283061	2.943900783	5.14%
2.8	7.495907674	2.67710988	2.804070357	0.15%
2.8	7.269070006	2.59609643	2.720603771	-2.84%
	Promedio	2.55978007		
	Desv Est.	0.22133057		
	C.V.	8.65 %		
PENDIENTE	2.71770634		1.0000000	
INTERCP	-0.124732111		2E-16	
R2	0.992866138		0.992866138	

La r^2 indica que el modelo propuesto explica 98.8574 % de la variabilidad en el área MeOH/Isob con respecto a la concentración de metanol. El coeficiente de correlación (r) es igual a 0.994271, demostrando una relación poderosa entre las variables. Para propanol de igual manera se explica con el modelo lineal, al demostrarse que la curva de calibración con estándar interno (Isobutanol), es lineal (Tabla 19).

Tabla 19: Resumen de los parámetros estadísticos de la regresión lineal para metanol.

Parámetro	Valor Metanol	Valor Propanol
Ordenada al origen (b)	0.0279524	-0.124732
Pendiente (m)	0.854606	2.717706
Coefficiente de variación (C.V.%)	13.36%	8.65 %
Coefficiente de correlación (r)	0.994271	0.9964266
Coefficiente de determinación (r^2)	0.988574	0.992866

Tabla 20: Análisis de varianza del sistema, linealidad (metanol).

Fuente	Suma de cuadrados	g.l	Media de cuadrados	F-calculada	P-Valor
Regresión	1.44154	1	1.44154	1124.80	0.0000
Residuos	0.0166608	13	0.0012816		
Total (Corr.)	1.4582	14			

Debido a que el P-valor en la tabla 20 de ANOVA es menor que 0.01, hay una relación estadísticamente importante lineal, entre el área MeOH/Isob y la concentración de metanol en un nivel de confianza del 99 %.

Tabla 21: Análisis de varianza del sistema, linealidad (propanol).

Fuente	Suma de cuadrados	g.l	Media de cuadrados	F-calculada	P-Valor
Regresión	91.1128	1	91.1128	1809.29	0.0000
Residuos	0.654656	13	0.0503582		
Total (Corr.)	91.7675	14			

Dado que el valor de P de la tabla 21 es menor que 0.01, hay una relación estadísticamente importante lineal, entre el área Prop/Isob y la concentración de Propanol en un nivel de confianza del 99 %.

Grafica del regresión lineal

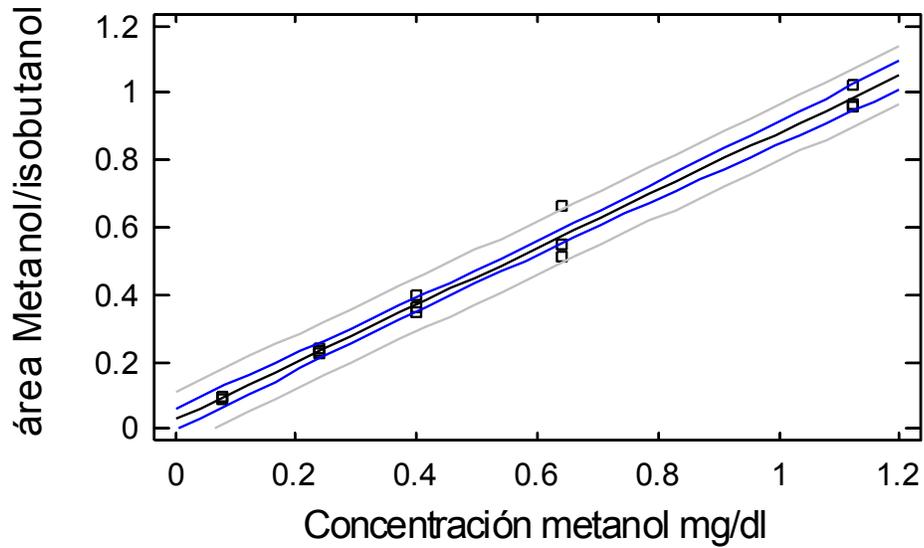


Figura 21: Grafica de regresión lineal para metanol, donde la línea central es la repuesta, seguidas de los intervalos de confianza al 95% y por último los límites de predicción.

GRAFICA DE MODELO LINEAL, PROPANOL

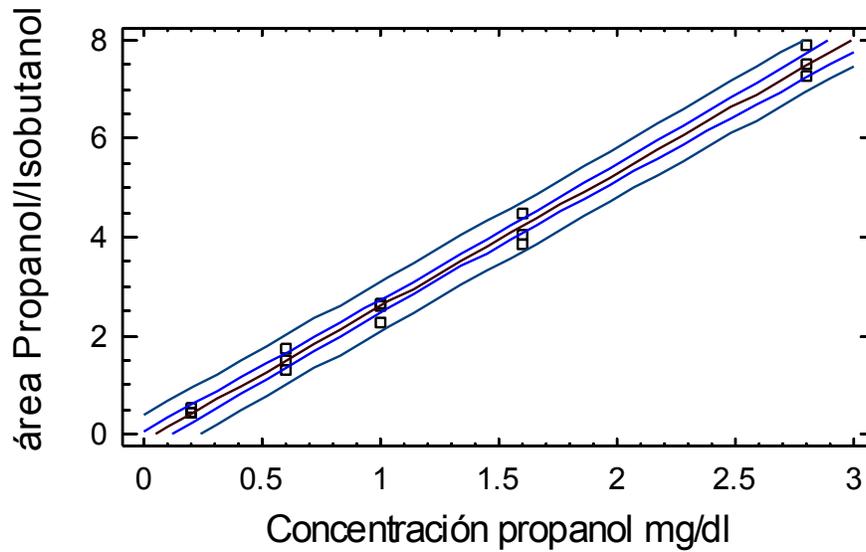


Figura 22: Grafica de regresión lineal para propanol, donde la línea central es la repuesta, seguidas de los intervalos de confianza al 95% y por último los límites de predicción.

PRECISIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO.

Repetibilidad del método analítico.

En la tabla 22 se muestra los resultados obtenidos de la evaluación de la repetibilidad del método analítico al analizar en un mismo día, por sextuplicado, una concentración conocida de metanol y propanol, bajo las mismas condiciones de equipo, laboratorio y analista.

Tabla 22: Repetibilidad del método analítico. Concentración teórica de metanol 0.8mg/dl, propanol 2.00 mg/dl.

Replica	Metanol	Propanol
1	0.76105458	1.92072519
2	0.79919843	2.0332412
3	0.81479275	1.97418044
4	0.83988664	1.98913703
5	0.81732348	2.02644944
6	0.81620207	2.15094002
promedio	0.80807632	2.01577889
Desv Est.	0.02645148	0.07766949
C.V.(%)	3.273%	3.853%
t _{cal}	0.74789271	0.49762421
t _{tab}	2.5706	2.5706

Prueba de hipótesis:

H₀: x = μ El método es exacto.

H_a: x ≠ μ El método no es exacto.

Toma de decisión:

Se acepta H₀ si t_{cal} < t_{tab} al 95% con n-1 grados de libertad.

Formula empleada para calcular la t:

$$t = \frac{X - \mu}{s} \cdot n^{1/2}$$

X= media

μ = media poblacional

s= desviación estándar

n= # de determinaciones

El coeficiente de variación en el nivel de concentración de 0.8mg/dl de metanol, es de 3.273%, donde no rebasa el límite máximo establecido del 15% [29,31], por lo cual, el método analítico para la cuantificación de metanol se considera repetible en el intervalo de concentraciones de 0.08 a 1.12 mg/dl. Para propanol el método es repetible (tabla 22) al obtenerse un coeficiente de variación de 3.853%, sin rebasar el límite establecido del 15% [29,31], por lo tanto, el método analítico es repetible en el intervalo de concentraciones de 0.2 a 2.8 mg/dl.

Reproducibilidad del método para metanol.

Para el análisis estadístico de la reproducibilidad, se realizó un análisis de varianza, considerando un efecto anidado (Tabla 23 y 25). De los resultados se obtuvo que la $F_{cal} < F_{tab}$ (Tabla 24 y 26) en la cuantificación de la muestra real de un alcohólico positivo a etanol (115 mg/dl), por lo tanto podemos concluir que el analista y el día anidado en el analista, no presentan efecto sobre la valoración, dicho en otras palabras el análisis lo puede hacer cualquiera de los analistas en cualquier día, siendo de esta manera un método reproducible para la cuantificación de metanol y propanol.

Tabla 23: Reproducibilidad del método para metanol (muestra real de un alcohólico positivo a etanol 115 mg/dl).

	ANALISTA	
	1	2
DÍA 1	5.34388	6.218
	6.02473	5.77215
	6.00507	6.34795
DÍA 2	5.80918	6.13266
	6.05777	6.00799
	6.05467	5.9317

Tabla 24: Tabla de análisis de varianza (anidado) de la reproducibilidad del método para metanol.

Fuente de variación	Grados de libertad (gl)	Suma de Cuadrados	Promedio de los Cuadrados (CM)	f calculada	f critica ($\alpha=0.05$)
Analista	1	0.10362996	0.10362996	3.353166	18.51
Día	2	0.061810218	0.030905109	0.454445139	4.46
Error	8	0.544049984	0.068006248		
Total	11				

Regla de decisión.

Para la fuente de variación analista.

Si $F_{cal} < F_{tab}$ al 95%, indica que no hay efecto del analista sobre la valoración.

Para la fuente de variación día.

Si $F_{cal} < F_{tab}$ al 95%, indica que no hay efecto del día sobre la valoración.

Tabla 25: Reproducibilidad del método para propanol (muestra real de un alcohólico positivo a etanol 115 mg/dl).

	ANALISTA	
	1	2
DÍA 1	0.601537	1.09851
	0.941663	1.03944
	1.00464	1.19819
DÍA 2	1.07973	1.11131
	1.02984	1.15624
	1.04219	1.08565

Tabla 26: Tabla de análisis de varianza (anidado) de la reproducibilidad del método para propanol.

Fuente de variación	Grados de libertad (gl)	Suma de cuadrados	Promedio de los Cuadrados (CM)	F Calculada	f crítica ($\alpha=0.05$)
Analista	1	0.08163211	0.08163211	2.683718713	18.51
Día	2	0.06083507	0.03041753	2.195672634	4.46
Error	8	0.11082721	0.0138534		
Total	11				

Regla de decisión.

Para la fuente de variación analista.

Si $F_{cal} < F_{tab}$ al 95%, indica que no hay efecto del analista sobre la valoración.

Para la fuente de variación día.

Si $F_{cal} < F_{tab}$ al 95%, indica que no hay efecto del día sobre la valoración.

La precisión del método analítico se obtuvo a partir de los datos de la repetibilidad y la reproducibilidad los cuales demuestran que el método analítico para cuantificar metanol con un coeficiente de variación de 3.273% y para propanol con un coeficiente de variación de 3.853% es preciso, ya que cumple con los criterios establecidos que indican que el coeficiente de variación debe ser menor al 15%. [31].

Exactitud.

La exactitud fue determinada con el % del valor nominal para metanol y propanol (Tabla 27), los cuales no rebasan el límite establecido del $\pm 15\%$ del valor nominal [31]. Este parámetro de validación también fue estudiado por la prueba de t de Student, con esta prueba estadística se determinó que el método es exacto para el nivel de concentración de 0.8 mg/dl y 2.00 mg/dl correspondientes a metanol y propanol, en el que la $t_{cal} = 0.74789271 < t_{tab.} = 2.5706$ para metanol y la $t_{cal} = 0.49762421 < t_{tab.} = 2.5706$ para propanol.

De los datos en la tabla 17, se deduce que el valor máximo encontrado para el C.V. (%) es menor que el 15 %, por lo que, el método analítico es exacto para cuantificar metanol, ya que cumple con la especificación establecida donde las concentraciones experimentales debe de estar dentro del 15% del valor nominal de concentración. Para propanol de igual manera cumple con lo establecido, a excepción de un solo valor que rebasar el 15% del C.V. (Tabla 18).

Tabla 27. Exactitud del método analítico para metanol y propanol.

	METANOL			PROPANOL		
Replica	Concentración Nominal mg/dl	Experimental mg/dl	% DESV	Concentración Nominal mg/dl	Experimental . mg/dl	% DESV
1	0.8	0.76105458	-4.868%	2	1.92072519	-3.964%
2	0.8	0.79919843	-0.100%	2	2.0332412	1.662%
3	0.8	0.81479275	1.849%	2	1.97418044	-1.291%
4	0.8	0.83988664	4.986%	2	1.98913703	-0.543%
5	0.8	0.81732348	2.165%	2	2.02644944	1.322%
6	0.8	0.81620207	2.025%	2	2.15094002	7.547%
	promedio	0.80807632	1.010%		2.01577889	0.789%
	Desv Est.	0.02645148			0.07766949	
	C.V.(%)	3.27%			3.85%	
	tcal	0.74789271			0.49762421	
	ttab	2.5706			2.5706	

Limite de detección y cuantificación.

Debido a que el P-valor en la tabla 29 y la tabla 30 de ANOVA es menor que 0.01, hay una relación estadísticamente importante lineal, entre el área MeOH/Isob y la concentración de metanol en un nivel de confianza del 99 %, de igual manera para propanol, por lo cual, la curva de calibración por estándar Interno (Tabla 28) en el intervalo de concentraciones de 0.008 a 0.24 mg/dl y 0.02 a 0.6 mg/dl es lineal para metanol y propanol respectivamente, y se puede utilizar para revelar el limite de detección y cuantificación de metanol y propanol.

Tabla 28: Curva de calibración para la determinación de límite de detección y cuantificación.

METANOL		PROPANOL	
Concentración Nominal mg/dl	ÁREA	Concentración Nominal mg/dl	ÁREA
conc. MeOH	MeOH/Isob	conc. Prop	Prop/Isob
0.008	0.0395525	0.02	0.07009465
0.016	0.04465147	0.04	0.10229423
0.04	0.07111296	0.1	0.25758248
0.08	0.09538114	0.2	0.48853112
0.24	0.21898573	0.6	1.44167339
B	0.0349261	B	0.0159775
m	0.768368	M	2.3753
R	0.999076	R	0.999945
r ²	0.998154	r ²	0.999889

Tabla 29: Análisis de varianza de la curva para detectar limite de detección y cuantificación (metanol).

Fuente	Suma de cuadrados	g.l	Media de cuadrados	F-calculada	P-Valor
Regresión	0.0215072	1	0.0215072	1621.72	0.0000
Residuos	0.0000397858	3	0.0000132619		
Total (Corr.)	0.0215469	4			

Tabla 30: Análisis de varianza de la curva para detectar limite de detección y cuantificación (Propanol)

Fuente	Suma de cuadrados	g.l	Media de cuadrados	F-calculada	P-Valor
Regresión	1.28458	1	1.28458	27049.82	0.0000
Residuos	0.000142468	3	0.0000474895		
Total (Corr.)	1.28472	4			

El límite de detección y cuantificación se determinó con ayuda de la curva de calibración por estándar interno haciendo uso del límite superior de confianza tomando como punto de partida el intercepto de la misma y extrapolando hasta la línea de tendencia como se observa en la figura 23, y de esta manera se obtuvo el límite de detección (LD) el cual es 0.009 mg/dl para metanol y para propanol es 0.005 mg/dl (figura 24). Para determinar el límite de cuantificación (LC) se toma como punto de partida el intercepto del límite superior de confianza y se extrapola hasta la línea del límite inferior de confianza obteniéndose el LC para metanol de 0.0174 mg/dl y para propanol 0.01095 mg/dl [32].

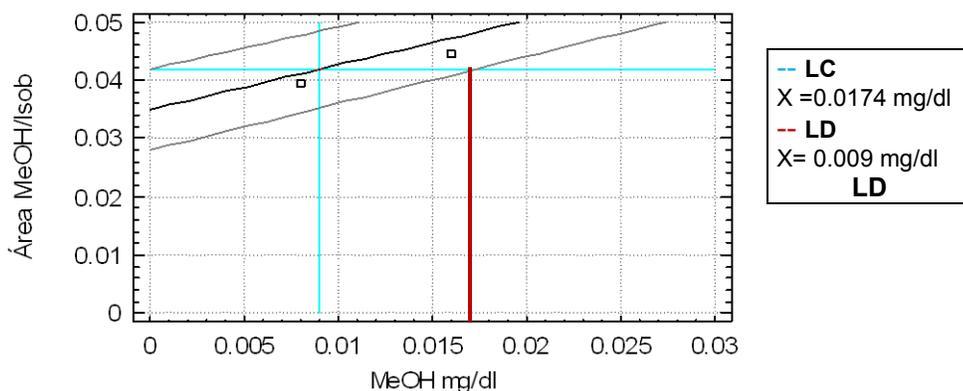


Figura 23: Gráfica de modelo lineal, estimación por extrapolación del valor del Límite de detección y cuantificación de metanol. Donde la línea central es la repuesta, seguidas de los intervalos de confianza al 95%.

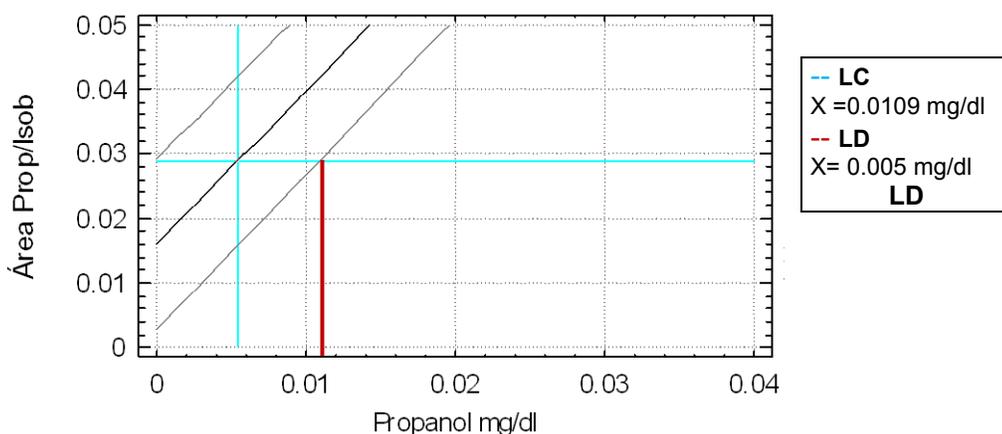


Figura 24: Gráfica de modelo lineal, estimación por extrapolación del valor del Límite de detección y cuantificación de propanol. Donde la línea central es la repuesta, seguidas de los intervalos de confianza al 95%.

Tabla 31: Límite de detección y cuantificación teóricos para metanol y propanol

TEORICO		
	METANOL	PROPANOL
LD mg/dl	0.009	0.005
LC mg/dl	0.0174	0.01095

Tabla 32: Réplicas para determinar límites de detección y cuantificación.

Concentración Nominal	0.02 mg/dl		0.05mg/dl	
	METANOL		PROPANOL	
REPLICAS	Concentración experimental mg/dl	ÁREA MeOH/Isob	Concentración Experimental mg/dl	ÁREA Prop/Isob
1	0.0243865	0.04309964	0.05379464	0.13533473
2	0.01743499	0.0373252	0.05156793	0.12973352
3	0.02187399	0.04101256	0.05119238	0.12878884
4	0.01961483	0.03913593	0.05073995	0.12765075
5	0.02001331	0.03946694	0.04744974	0.11937432
PROMEDIO	0.02066472	0.04000805	0.05094893	0.12817643
Desv. Est.	0.00261112	0.00216899	0.00228191	0.00574009
C.V. (%)	12.64%	5.42%	4.48%	4.48%

Para corroborar el límite de cuantificación se realizaron réplicas de estándares de una concentración de 0.02 mg/dl para metanol y 0.05 mg/dl para propanol. Obteniéndose un coeficiente de variación de 12.64% y 4.48 % para metanol y propanol respectivamente, cumpliendo con lo establecido en la NOM-177-SSA1-1998, donde establece que el límite de cuantificación no debe de rebasar el coeficiente de variación de 15%.

5.3. Aplicación.

Un total de 186 cadáveres humanos fueron investigados (tabla 33), los datos obtenidos de las muestras en los cuatro grupos (ARNE, ARPE, BS, NA), fueron exclusivamente al azar, los puntos del gráfico (Fig. 25) son un conjunto de números aleatorios que no siguen ningún patrón, es decir no siguen un patrón cíclico, elipse, etc., donde no se pudo detectar correlación serial de los residuos (auto correlación).

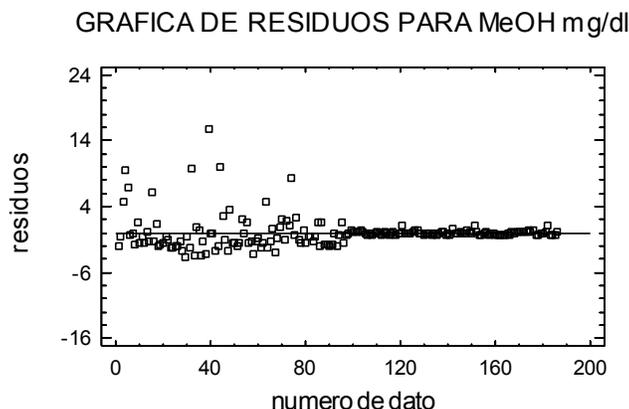


Figura 25: Grafica de residuos del muestreo de los diferentes grupos con respecto a la cuantificación de metanol.

Otro dato importante es que se muestreó de acuerdo a un número serial de expediente donde solo se localizaba el individuo y se clasificaba en el grupo correspondiente (tabla 33), dándole de esta manera un proceso de muestreo totalmente al azar.

Tabla 33: Descripción de datos de no alcohólicos y alcohólicos.

Grupo	No alcohólicos (n=118)		Alcohólicos (n=68)	
	1	2	3	4
	Controles normales (NA)	bebedor ocasional (BS)	Negativos a etanol (ARNE)	Positivos a etanol (ARPE)
	n=90	n=28	n=28	n=40
Consumo de etanol al morir	0 mg/dl	42.0 – 362.0 153.63214	0mg/dl	27.13-368.0 171.526905
Hombres/mujeres	56/34	23/5	26/2	36/4
Rango de edad/media (años)	6-98 / 44.088	23-69 / 29.75	18-68/45.14	16-84 /40.27

Investigaciones recientes han demostrado que el alcoholismo puede ser más fiablemente valorado midiendo niveles en sangre de “supuestos” marcadores bioquímicos del alcoholismo, donde se midieron niveles en plasma de metanol, la suma de acetona y 2 propanol (A +2P), GGT y CDT, se concluyó que están vinculados con el abuso crónico de

alcohol [5,9]. Los anteriores marcadores para el propósito del presente trabajo, no fue posible medirlos todos, sin embargo el metanol si se cuantificó. La GGT no se determinó por no ser un marcador específico y la transferrina deficiente de carbohidrato no se determinó por falta de infraestructura y por la tardanza del análisis.

En la tabla 33 se clasifican los cuatro grupos de interés, dos grupos corresponden a los no alcohólicos y se dividen en controles normales (no alcohólicos = NA) y los bebedores sociales (BS), los dos grupos restantes corresponden a los alcohólicos, donde se dividen en alcohólicos en estado de ebriedad (alcohólicos reacción positiva a etanol = ARPE) y los alcohólicos negativos a etanol (alcohólicos reacción negativa a etanol = ARNE). La tabla 33 también nos aporta la edad promedio en la que oscilan los alcohólicos con respecto a los bebedores sociales, así como la tendencia en el sexo.

En el sexo masculino se tiene mayor tendencia, pudiéndose explicar por la libertad más amplia que tiene el hombre en la sociedad y a los factores ambientales, los cuales se consideran tan determinantes. [15]. La adicción a cualquier droga es una consecuencia de múltiples factores, entre ellos el genético, y no sólo el familiar y el sociocultural, según estudios hechos en países escandinavos y Estados Unidos. Estos estudios no significan que por tener los factores genéticos, las personas estén condenadas a sufrir alcoholismo, ya que con entornos sanos y con información, se puede evitar la adicción [33].

Tabla 34: Media y desviación estándar del marcador metanol, respecto a los 4 grupos.

Grupo	No alcohólicos (n=118)		Alcohólicos (n=68)	
	1	2	3	4
	Controles normales (NA)	Bebedor ocasional (BS)	Negativos a etanol (ARNE)	Positivos a etanol (ARPE)
Promedio mg/dl	0.345556	2.74964	2.03857	4.06325
Rango mg/dl	0 - 1.54416	0.13 - 12.19	0 - 10.46	0.45 - 19.84
Desv. Estándar	0.319266	3.05231	2.16158	3.9796

En la tabla A2 (anexo) y 34 se muestra la estadística univariable para la determinación de metanol en sangre de origen post-mortem por grupos (ARNE, ARPE, BS, NA), analizadas por cromatografía de gases con inyección HeadSpace, en los valores de la media obtenidos para los diferentes grupos, se determinó una mayor cantidad de metanol en las muestras provenientes de alcohólicos bajo la influencia del alcohol etílico, seguido por los bebedores sociales, los alcohólicos negativos a etanol y por ultimo las cantidades encontradas en los no alcohólicos fueron menores, lo cual concuerda a lo esperado.

Sin embargo, los datos de la tabla 34 no indican si existe una diferencia desde un punto de vista estadístico, ¿los datos obtenidos pueden diferenciar a los distintos grupos como, iguales o diferentes?. Para resolver esta incógnita se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de los cuatro grupos muestreados.

5.3.1 Análisis estadístico de la concentración de metanol por grupos (ANOVA).

Para un análisis de datos más adecuado se llevó a cabo un estudio de análisis de varianza para la variable metanol, en los diferentes grupos de estudio, con el fin de discernir la desigualdad de los grupos:

- ❖ Alcohólicos negativos a etanol (ARNE).
- ❖ Alcohólicos positivos a etanol (ARPE).
- ❖ Bebedores sociales (BS).
- ❖ No-alcohólicos (control normal) (NA)

Debido a que se obtuvo un valor de $p=0.000$ de la prueba de F, hay una diferencia estadísticamente importante entre las medias de los distintos grupos (ARNE, ARPE, BS, NA) para el estudio de metanol (Tabla 35).

Tabla 35. Análisis estadístico de la determinación de metanol (mg/dl) en los distintos grupos por CG-HS.

Tabla de ANOVA (nivel de confianza del 95%)					
<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>g.l</i>	<i>Media de cuadrados</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Valor</i>
Entre grupos	421.852	3	140.617	25.48	0.0000
Dentro de los grupos	1004.43	182	5.51883		
Total (Corr.)	1426.28	185			

Para determinar que grupo presenta una media diferente (Fig. 26), se realizó un análisis de intervalos múltiples, para la variante metanol (Tabla 36). Se observa que no existe una diferencia estadística significativa entre el grupo ARNE-BS, sin embargo se debe de tomar en cuenta que en las muestras del grupo BS se identificó alcohol etílico, mientras que el grupo ARNE dio negativo a alcohol etílico, por lo tanto si podemos diferenciarlos de acuerdo al criterio anterior. Para el caso de comparación de los grupos ARNE-ARPE, ARNE-NA,

ARPE-BS y ARPE-NA, resultaron ser estadísticamente diferentes y por lo tanto se distingue con claridad a cada grupo de estudio.

Tabla 36. Método: Diferencia mínima significativa (95%)

Grupo	cuenta	Media	Grupos Homogéneos
NA	90	0.345556	X
ARNE	28	2.03857	X
BS	28	2.74964	X
ARPE	40	4.06325	X

Contraste	Sig.	Diferencia	Limites +/-
ARNE – ARPE	*	-2.02468	1.14213
ARNE – BS		-0.711071	1.23881
ARNE – NA	*	1.69302	1.00302
ARPE – BS	*	1.31361	1.14213
ARPE – NA	*	3.71769	0.880827
BS – NA	*	2.40409	1.00302

* Indica una diferencia estadística significativa.

Medias e Intervalos de DMS al 95 % (METANOL)

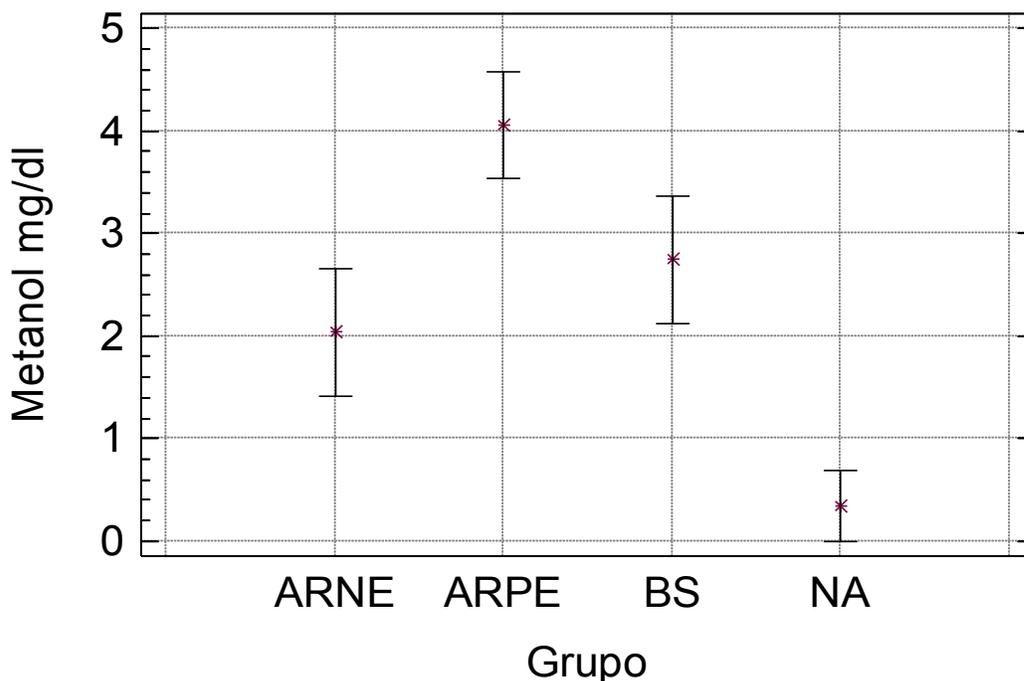


Figura 26. Medias (asterisco) e intervalos al 95% de Diferencia mínima significativa (líneas) para la determinación de metanol en los diferentes grupos de estudio por CG-HS.

5.3.2 Análisis estadístico de la concentración de metanol incluyendo múltiples variables.

En este análisis se resume los resultados de ajustar un modelo estadístico lineal general que relaciona a la variable MeOH [mg/dl] con 9 factores predictivos. Dado que el valor de P en la primer tabla de ANOVA (Tabla 37) para MeOH [mg/dl] es menor que 0.05, hay una relación estadísticamente significativa entre MeOH y las variables (factores) (cualitativas: grupo, sexo, cirrosis, hígado graso, ascitis, pancreatitis, diabetes; variables cuantitativas: EtOH y edad) con un nivel de confianza del 95,0%.

Modelos Lineales Generalizados

Variable dependiente: 1 (metanol en mg/dl)

Factores : 7

- A= Grupo
- B= Sexo
- C= cirrosis
- D= hígado graso
- E= Ascitis (retención de líquidos)
- F= Pancreatitis hemorrágica
- G= diabético

Factores cuantitativos: 2

- H= EtOH mg/dl (etanol en sangre cadáveres)
- I= edad (años)

Tabla 37. Análisis de Varianza para MeOH [mg/dl]. Análisis por regresión múltiple.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Media de cuadrados	F-calc	P-Valor
Modelo	529.0	11	48.0909	9.33	0.0000
Residuo	897.28	174	5.15678		
Total (Corr.)	1426.28	185			

Tabla 37.1. Límites de confianza del 95,0% para los coeficientes estimados (MeOH mg/dl).

Parámetro	Estimado	Error		V.I.F.
		Estándar	Limite Inferior	
CONSTANTE	0.854583	1.18973	-1.49359	3.20276
Grupo	0.199475	0.480163	-0.74822	1.14717
Grupo	1.34551	0.460219	0.437177	2.25384
Grupo	0.0794099	0.454519	-0.817672	0.976492
Sexo	0.461371	0.207152	0.0525158	0.870227
cirrosis	0.0952997	0.423868	-0.741286	0.931886
hígado graso	-1.37481	0.435216	-2.2338	-0.515832
Ascitis	1.25644	0.927215	-0.573595	3.08648
Pancreatitis hemorra	0.873062	0.447878	-0.0109128	1.75704
diabético	0.0674927	0.530024	-0.978614	1.1136
EtOH mg/dl	0.00620487	0.00363709	-0.00097364	0.0133834
Edad (años)	0.00707483	0.00875136	-0.0101977	0.0243474

Cálculos

Modelo de Regresión

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_{p-1} X_{p-1}$$

La tabla 37.1 muestra intervalos de confianza del 95,0% para los coeficientes en el modelo.

La ecuación del modelo ajustado es la siguiente:

Ecuación que explica el modelo.

$$\text{MeOH mg/dl} = 0.854583 + 0.199475 * I1(1) + 1.34551 * I1(2) + 0.0794099 * I1(3) + 0.461371 * I2(1) + 0.0952997 * I3(1) - 1.37481 * I4(1) + 1.25644 * I5(1) + 0.873062 * I6(1) + 0.0674927 * I7(1) + 0.00620487 * \text{EtOH mg/dl} + 0.00707483 * \text{edad años}$$

Donde:

I1(1) = 1 si Grupo=ARNE, -1 si Grupo=NA, 0 de lo contrario

I1(2) = 1 si Grupo=ARPE, -1 si Grupo=NA, 0 de lo contrario

I1(3) = 1 si Grupo=BS, -1 si Grupo=NA, 0 de lo contrario

I2(1) = 1 si Sexo=F, -1 si Sexo=M, 0 de lo contrario

I3(1) = 1 si cirrosis=NO, -1 si cirrosis=SI, 0 de lo contrario

I4(1) = 1 si hígado graso=NO, -1 si hígado graso=SI, 0 de lo contrario

I5(1) = 1 si Ascitis=NO, -1 si Ascitis=SI, 0 de lo contrario

I6(1) = 1 si Pancreatitis hemorr=NO, -1 si Pancreatitis hemorr=SI, 0 de lo contrario

I7(1) = 1 si diabético=NO, -1 si diabético=SI, 0 de lo contrario

En la ecuación anterior se destaca la influencia de cada factor estudiado en la determinación de metanol, se observa que ejerce un influjo mayor el grupo ARPE, seguido de la ascitis, donde resultó ser menor la concentración de metanol por su dilución dado a la retención de líquidos por el individuo.

La segunda tabla ANOVA para MeOH (Tabla 38) prueba la significancia estadística de cada factor conforme fue introducido al modelo. Obsérvese que el valor-P más alto es 0.8988, que corresponde a sujetos con diabetes (G) y por lo tanto, como el valor-P es mayor que 0,05, ese término no es estadísticamente significativo con un nivel de confianza del 95,0%. Consecuentemente, debería considerarse eliminar el factor diabetes (G) del modelo. El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo, así ajustado, explica 37.089% de la variabilidad en la variable dependiente MeOH.

Para un estudio mas profundo se realizó un análisis de regresión múltiple, tomando en cuenta los grupos estudiados, los factores que caracterizan a un alcohólico, así como otras factores, los cuales demostraron una influencia determinante en la cuantificación de metanol (Figura 27) en especial los grupos (p=0.000), el hígado graso (p=0.015) y la pancreatitis hemorrágica (p=0.036), los factores cuantitativos etanol (mg/dl) y edad (años) no demostraron influencia al obtenerse una p=0.841 y p=0.784 respectivamente.

Tabla 38. Suma de Cuadrados Tipo III, donde se observa la probabilidad de influencia de los 9 factores estudiados.

Fuente	Suma de cuadrados	g.l.	Media de cuadrados	$F_{calculada}$	P-valor
Grupo	110.428	3	36.8095	7.14	0.0002
Sexo	25.58	1	25.58	4.96	0.0272
cirrosis	0.260676	1	0.260676	0.05	0.8224
hígado graso	51.4586	1	51.4586	9.98	0.0019
Ascitis	9.46901	1	9.46901	1.84	0.1772
Pancreatitis hemorrágica	19.5952	1	19.5952	3.80	0.0529
diabético	0.0836181	1	0.0836181	0.02	0.8988
EtOH (mg/dl)	15.0084	1	15.0084	2.91	0.0898
Edad (años)	3.37023	1	3.37023	0.65	0.4199
Residual	897.28	174	5.15678		
Total (corregido)	1426.28	185			

En el figura 27, se observa y se reitera que no es determinante del alcoholismo la cirrosis hepática, pues esta patología puede ser ocasionada por infecciones virales (virus de la hepatitis). Y por el contrario el hígado graso muestra una influencia en el aumento en los niveles de metanol. Para la pancreatitis y ascitis influyeron, pues ambas patologías tienen que ver con el alcoholismo.

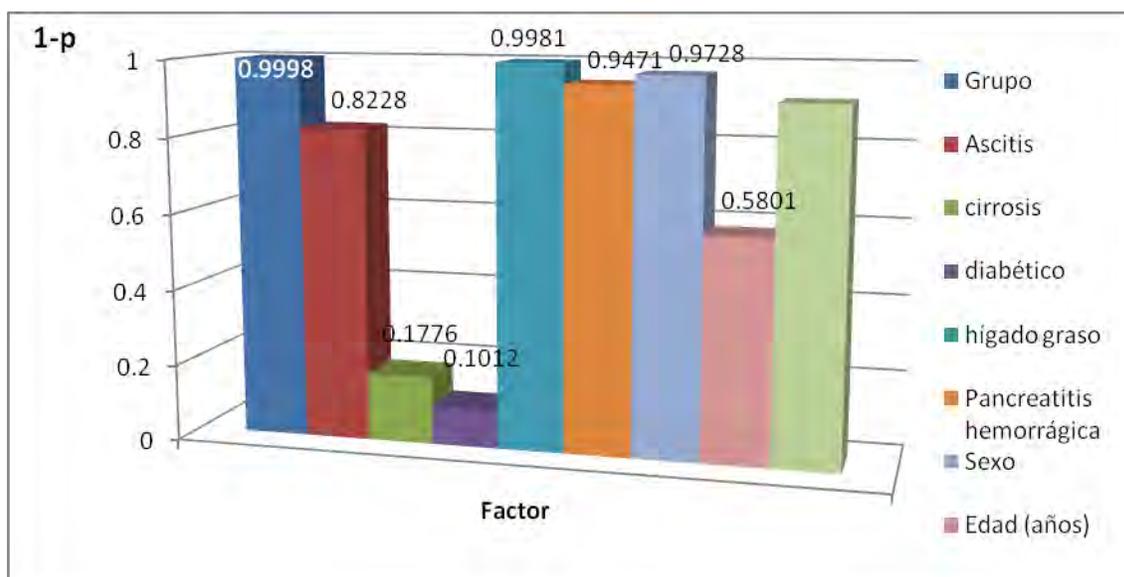


Figura 27. Grafica de barras referente a la probabilidad de influencia (%) de los diferentes factores evaluados sobre la cuantificación de metanol en muestras post-mortem.

Tabla 39. Prueba de múltiples rangos, para metanol (incluyendo múltiples variables).

<i>Grupo</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Media LS</i>	<i>LS Sigma</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
NA	90	-0.104313	1.21666	X
BS	28	1.59949	1.20349	X
ARNE	28	1.71956	1.13411	XX
ARPE	40	2.86559	1.17722	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>Limites +/-</i>
ARNE - ARPE		-1.14603	1.67083
ARNE - BS		0.120065	1.67783
ARNE - NA	*	1.82387	1.0848
ARPE - BS	*	1.2661	1.14627
ARPE - NA	*	2.9699	1.54458
BS - NA	*	1.7038	1.51032

* Indica una diferencia estadística significativa.

Al principio de la tabla 39, se han identificado 3 grupos homogéneos, usando columnas de X's. Dentro de cada columna, los niveles conteniendo X's forman un grupo de medias entre las cuales no hay diferencias estadísticamente significativas. El método actualmente usado para discriminar entre las medias es el procedimiento de la diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un 5,0% de riesgo de decir que cada par de medias es estadísticamente diferente cuando la diferencia real es igual a 0.

Con la prueba de múltiples rangos (o comparaciones múltiples) se demostró que no existe una diferencia al realizar la comparación de medias entre el grupo ARNE-ARPE y ARNE-BS, por el contrario al comparar los grupos: ARNE-NA, ARPE-BS, ARPE-NA y BS-NA, demostraron ser estadísticamente diferentes, por lo que podemos diferenciar a los alcohólicos, abstemios y bebedores sociales (Tabla 39).

Es importante recalcar que los únicos orígenes posibles para el metanol endógeno, es a través de la formación por bacterias intestinales o los procesos metabólicos que involucran la acción de la enzima methanol-forming sobre la S-adenosylmethionine en la glándula pituitaria ó la reducción del formaldehído a metanol (que es derivado de la desmetilación de la aminopirina y otros [40]).

Para poder establecer con claridad si el metanol puede ser utilizado como marcador de alcoholismo es necesario tener en cuenta factores que no son controlables, tales como, el tiempo que deja de tomar bebidas embriagantes el sujeto alcohólico y la calidad de las bebidas alcohólicas. Es importante recordar que el metanol deja de ser metabolizado cuando la enzima alcohol deshidrogenasa debido a que es más afin al etanol, en consecuencia el metanol empieza a acumularse [5,17] en los alcohólicos, comparado con los bebedores sociales, pero cuando el etanol a caído a concentraciones por debajo de 10 mg/dl se reanuda el metabolismo del metanol, por lo tanto el metanol vuelve a niveles basales menores a 0.1mg/dl [40]. Otro dato importante es que en concentraciones de etanol en la sangre de 150-450 mg/dl, los niveles de metanol en la sangre y orina incrementan progresivamente de 2.0 a 4.0 mg/dl, tal como ocurrió en el grupo ARPE.

Con lo expuesto, anteriormente podemos establecer con claridad, que el metanol puede ser utilizado como marcador de alcoholismo crónico, pero cuando los sujetos no tienen alcohol etílico (< 20mg/dl) en el organismo no puede ser establecido con claridad que el sujeto sea alcohólico, por que se ignora el tiempo en que sea eliminado el etanol del cuerpo. El metanol si puede ser utilizado como marcador de abuso de alcohol etílico en todos los grupos de estudio, por que si existe una acumulación que estadísticamente visible de entre el grupo de los abstemios.

5.3.3 Análisis de la relación metanol-etanol por grupos.

Se realizó el análisis por regresión lineal, en el grupo de alcohólicos que dieron positivos a etanol (ARPE) y en los sujetos bebedores sociales (BS), con el fin de establecer la correlación que exista entre ambas determinaciones etanol y metanol en muestras de origen forense pos-mortem (se analizó y cuantificó a etanol y metanol en sangre por CG-HS bajo las mismas condiciones instrumentales y misma muestra, pero con curvas por estándar interno diferentes, por cuestiones del rango de concentración, el rango de cuantificación de etanol es de 50mg/dl a 300mg/dl y para metanol es el rango propuesto, ver validación), por lo tanto, se despejó la incógnita siguiente, “si el aumento en los niveles de metanol en sujetos bajo la influencia del alcohol etílico, es debida a el aumento en los niveles de etanol al ingerir bebidas alcohólicas, y si existe algún patrón de correlación”.

En el grupo de ARPE y BS, se tomó como variable dependiente al metanol y como variable independiente al etanol, obteniéndose los siguientes resultados:

En el caso propio de el grupo ARPE, se obtuvo un coeficiente de determinación (Tabla 40) revelando que el modelo propuesto explica el 0.225% de la variabilidad en la concentración de metanol con respecto a la concentración de etanol en sangre y un coeficiente de correlación de -0.04, aclarando que no existe una relación entre las variables (Fig. 28). Se realizó el mismo estudio estadístico para el grupo de bebedores sociales, obteniéndose un coeficiente de determinación (Tabla 40) que indica, que el modelo propuesto explica el 17.4674 % de la variación de la concentración de metanol en función de la concentración de etanol. El coeficiente de correlación es igual a +0.417941, demostrando una relación relativamente débil entre las variables (Fig. 29), sugiriendo que por lo menos en parte los niveles de metanol significativamente incrementaron pudiendo estar explicado por concentraciones de etanol mas altos en los bebedores sociales, el resultado del coeficiente de correlación es parecido a estudios realizados por Roine Risto y colaboradores, donde se obtuvo una $r = +0.45$ ($p < 0.001$) [40].

Ya que se obtuvo una $p = 0.7709$ en la tabla 41, no hay una relación lineal estadísticamente entre la concentración de metanol y etanol en el grupo ARPE, correspondiente a los alcohólicos bajo la influencia de alcohol etílico en el nivel de confianza del 95.0 % o superior.

Tabla 40: Resumen de los parámetros estadísticos de la regresión lineal para la relación etanol-metanol, para el grupo ARPE y BS.

Parámetro	Valor ARPE	Valor BS
Ordenada al origen (b)	4.4652	0.159877
Pendiente (m)	-0.00234	0.01686
Coefficiente de correlación (r)	-0.0475	0.4179
Coefficiente de determinación (r ²)	0.2259 (%)	17.4674 (%)
Durbin-Watson statistic	2.32838 (P=0.8588)	1.2545 (P=0.0192)

Tabla 41: Análisis de varianza, para la relación etanol-metanol en el grupo ARPE.

Fuente	Suma de cuadrados	g.l.	Media de cuadrados	F _{calculada}	P-valor
Regresión	1.39522	1	1.39522	0.09	0.7709
Residuos	616.197	38	16.2157		
Total (Corr.)	617.592	39			

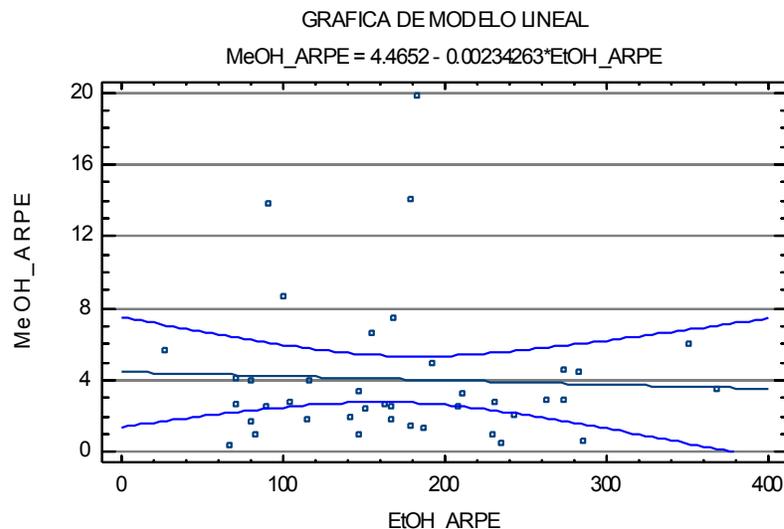


Figura 28. Grafica de regresión lineal para etanol-metanol de las muestras de sujetos alcohólicos bajo la influencia del alcohol etílico. La línea de tendencia es la central, seguidas de los intervalos de confianza al 95%.

Tabla 42. Análisis de varianza, para la relación etanol-metanol en el grupo BS.

Fuente	Suma de cuadrados	g.l.	Media de cuadrados	F _{calculada}	P-valor
Regresión	43.9032	1	43.9032	5.50	0.0269
Residuos	207.44	26	7.97846		
Total (Corr.)	251.343	27			

Para el caso del grupo de bebedores sociales, debido a que el valor de $p=0.0269$ en la tabla de ANOVA es menos que 0.05, hay una relación estadísticamente importante entre la cuantificación de metanol y etanol en las muestras de sangre de los sujetos del grupo BS en el nivel de confianza 95.0 % (tabla 42).

Para ambos grupos de estudio (ARPE y BS), es importante mencionar que no existe una razón tan determinante para precisar que existe una relación entre el aumento de la concentración de metanol con respecto al consumo de bebidas alcohólicas, ya que existen una serie de factores tan determinantes que afectan directamente la concentración de metanol en sangre, una de ellas es el tipo de bebidas alcohólicas que se ingiere antes, pues existen reportes que mencionan que algunas bebidas embriagantes (ejemplo, cerveza, brandy, whisky, vodka, vino, etc.) tienen trazas de metanol dentro de su composición [14], así como la calidad de las bebidas consumidas.

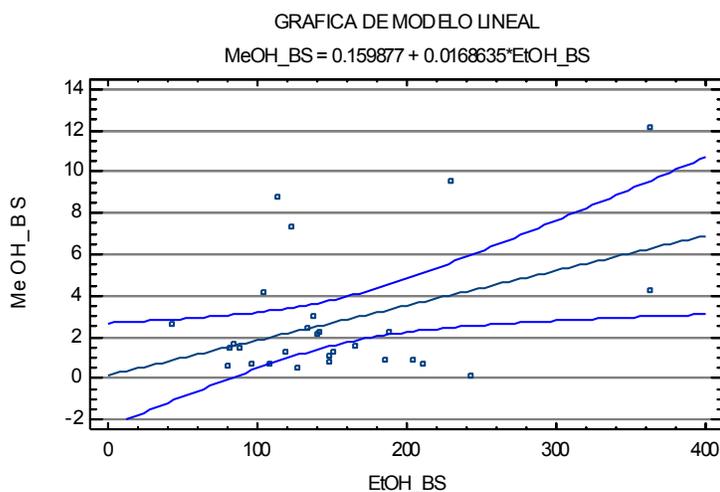


Figura 29. Grafica de regresión lineal para etanol-metanol de las muestras de bebedores sociales bajo la influencia del alcohol etílico. La línea de tendencia es la central, seguidas de los intervalos de confianza al 95%.

5.3.4 Producción de metanol y propanol en muestras sanguíneas, como consecuencia de la putrefacción.

Los efectos de la putrefacción en la determinación de metanol y propanol fueron estudiados almacenando muestras de sangre de cadáveres humanos, negativos a alcohol etílico y sin antecedentes de alcoholismo. Se cuantificó la cantidad de metanol y propanol al obtenerse la muestra sanguínea (se etiquetó como 1^{er} corrida), posterior a la cuantificación se almacenaron 26 muestras en refrigeración y 32 muestras a temperatura ambiente. De acuerdo a un calendario de actividades se cuantificó la misma muestra por segunda vez (2^{da} corrida) y última vez a un tiempo determinado, se observó (en general) la tendencia del aumento en la cuantificación de metanol y propanol, producto de los efectos de la putrefacción.

Independientemente del origen de metanol y propanol (producción endógena, el consumo ante-mortem o la producción post-mortem), los aspectos cuantitativos en muestras almacenadas o en cadáveres en descomposición, juegan un papel importante que no se tiene que dejar de estudiar, para la viabilidad de la cuantificación es importante la determinación de metanol, para saber con que velocidad aumenta la cantidad del analito en cuestión producto de la putrefacción en días diferentes y en condiciones de almacenaje diferentes, resultado de la producción mediada por fermentación microbiana de alcohol y su redistribución siguiente. Investigaciones recientes apuntan a la identificación post-mortem de microorganismos productores de alcoholes, en donde, comúnmente se encuentran *Candida albicans*, *Proteus vulgaris*, y *Escherichia coli* [35,38]. Incluyendo *Klebsiella*, *Yersinia*, *Samonella*, *Proteus*, y *Escherichia*. Muchas de estas variedades son productoras de etanol ya establecidas.

Los resultados actuales coinciden con el comentario hecho por Cory [36] de que los aumentos más grandes en niveles de etanol fueron relacionados no con la contaminación de levadura, sino también con bacterias.

Ya que no encontramos en la literatura antecedentes de una investigación similar. Nuestro objetivo fue estudiar la producción post-mortem de metanol y propanol en un grupo de muestras obtenidas durante la necropsia, en los cuales se comprobó previamente la concentración de ambos analitos pero no la cantidad de flora bacteriana.

Es posible que bacterias específicas que se encuentran en el lumen intestinal, actúen sobre los hidratos de carbono provenientes de la dieta, pero también es posible la contaminación bacteriana al momento de la toma de muestra y que actúen sobre los carbohidratos presentes en la sangre produciendo metanol, propanol, etanol e incluso metabolicen el mismo alcohol, en específico al etanol y produciendo así, acetaldehído [37].

En los distintos días y tipo de almacenaje (Refrigeración 4°C y Tem. Ambiente) para metanol y propanol, podemos suponer que en los primeros 7 días el aumento de metanol y propanol dan su máximo al observar las gráficas (Fig. 30, 31, 32 y 33), pudiéndose explicar de que si la producción es por microorganismos, estos utilizan a los carbohidratos presentes en la sangre como fuente de energía y de fermentación por lo que al acabarse este sustrato (carbohidratos) la producción de los alcoholes se limita.

Las muestras guardadas en refrigeración (Fig. 30) presentaron cambios en la concentración de metanol en 21/26 muestras con incremento en la cuantificación con respecto a la 1^{er} corrida, sin rebasar los 2.0 mg/dl, el 4/26 muestras en la 2^{da} corrida hubo un decremento en la cuantificación con respecto a la 1^{er} corrida y el 2/26 no presentaron cambios en ambas corridas. Para propanol (Fig. 32) los primeros 7 días de almacenamiento en refrigeración, el aumento no rebasó el 1.0 mg/dl de propanol al igual que las muestras almacenadas hasta 84 días. Lo cual puede explicarse que en los primeros 7 días se acaba el sustrato para la producción de propanol. En la figura P3 también se observa que no hay propanol en 19/26 muestras recolectadas.

El monitoreo de la producción de los alcoholes de interés (metanol y propanol) de las muestras almacenadas a temperatura ambiente, la producción fue mas rápida que con respecto a las muestras almacenadas en refrigeración, pudiéndose observar para metanol (Fig. 31) un incremento en la concentración en el 28/32 de las muestras, con mas de 3.0 mg/dl en 1/3 de las muestras almacenadas entre el 2^{do} y 7^{mo} día. Solo el 3/32 de las muestras decrecieron en la concentración de metanol en el 3^{er} día y 6^{to} día. Para propanol (Fig. 33), 27/32 muestras en la primera corrida no presentaron propanol, solo 7/32 muestras almacenadas a temperatura ambiente no presentaron cambios, se mantuvieron en 0.0 mg/dl, lo cual confirma que el propanol es un alcohol que no se encuentra en torrente sanguíneo, 25/32 tuvieron producción de propanol desde el primer día de almacenamiento, solo 10/32 muestras tuvieron un rango de concentración entre 1.0 a 3.5 mg/dl y aumentando marcadamente a partir del cuarto día.

La interpretación de estos resultados es compleja ya que las bacterias no sólo han demostrado la capacidad de producir alcoholes [39], entre ellos el etanol, sino que, además pueden metabolizar vía oxidación [37] este producto y dar paso a compuestos tóxicos (acetaldehído), de esta manera se explica el decremento en la concentración en la segunda corrida para algunas muestras, con respecto a la primer corrida.

No todas las muestras almacenadas presentaron producción endógena de metanol y propanol, los niveles sanguíneos mostraron diferencias importantes. Esta observación puede estar relacionada de acuerdo a la literatura con el tipo de flora bacteriana presente [38], la concentración de bacterias, la presencia de levaduras y posiblemente tal como lo

demuestran nuestros resultados, con el tipo de almacenamiento (refrigeración y a temperatura ambiente).

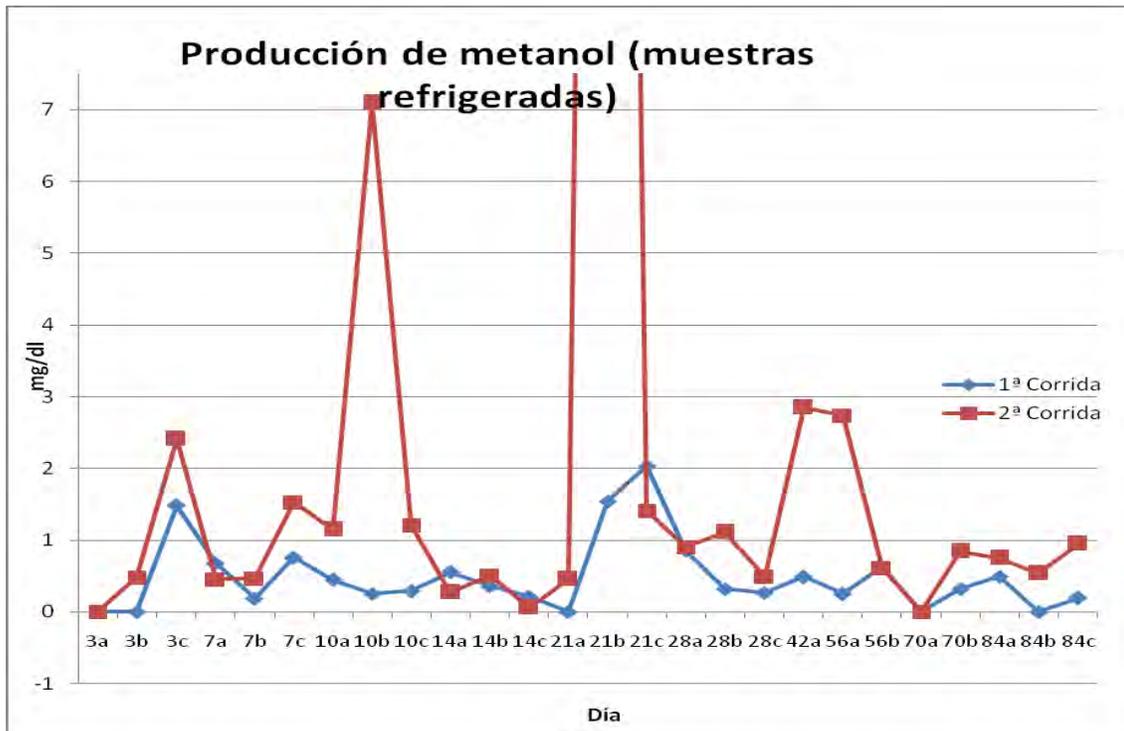


Figura 30. Grafica de producción de metanol al transcurrir diferentes días de almacenamiento en refrigeración, los rombos representan la 1^{er} corrida (día cero) de la muestra de un sujeto y los cuadrados indican la 2^{da} corrida del mismo sujeto pero en el día correspondiente, 3, 7, 10 14, etc. (valor 2^{da} corrida, 21b =40.7 mg/dl)

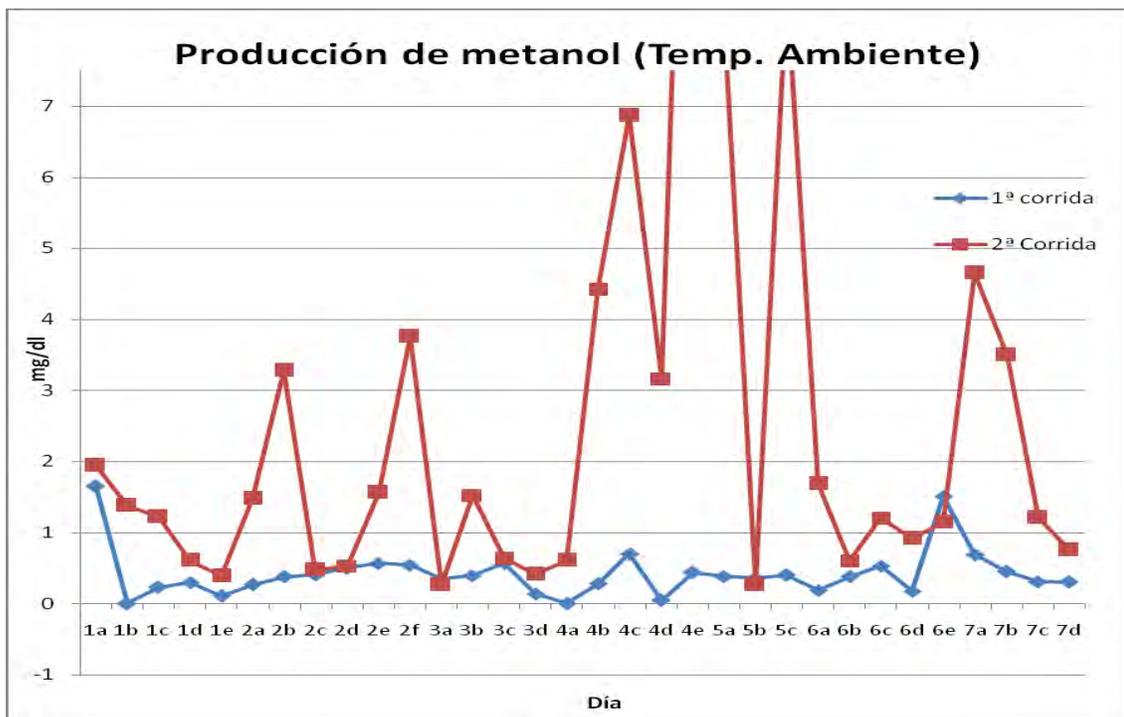


Figura 31. Grafica de producción de metanol al transcurrir diferentes días de almacenamiento a temperatura ambiente, los rombos representan la 1^{er} corrida (día cero) de la muestra de un sujeto y los cuadrados indican la 2^{da} corrida del mismo sujeto pero en el día correspondiente 1,2,3,4, etc. (valor 2^{da} corrida, 4e=16 y 5c=8.6 mg/dl)

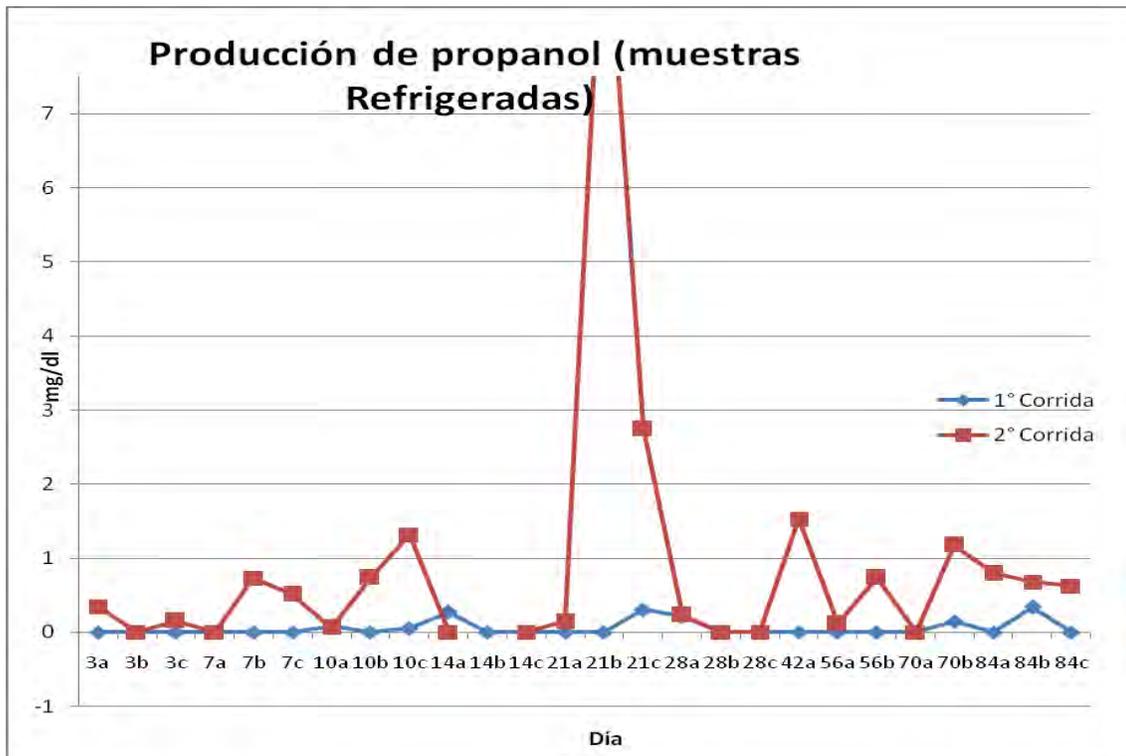


Figura 32. Grafica de producción de propanol al transcurrir diferentes días al almacenarse en refrigeración, los rombos representan la 1^{er} corrida (día cero) de la muestra de un sujeto y los cuadrados indican la 2^{da} corrida del mismo sujeto pero en el día correspondiente, 3, 7, 10, 14, etc. (valor 2^{da} corrida, 21b=10.26 mg/dl)

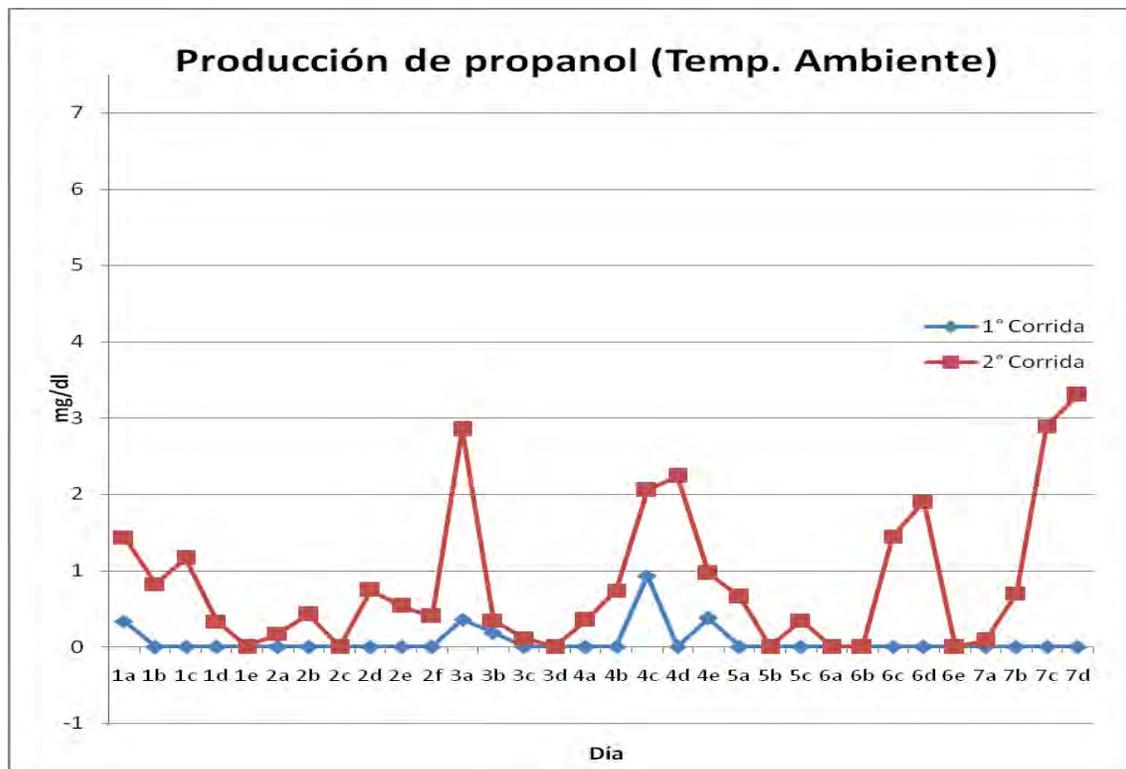


Figura 33. Grafica de producción de propanol al transcurrir diferentes días al almacenarse a temperatura ambiente, los rombos representan la 1^{er} corrida (día cero) de la muestra de un sujeto y los cuadrados indican la 2^{da} corrida del mismo sujeto pero en el día correspondiente, 1, 2, 3, 4, etc.

Los anteriores resultados nos permiten establecer la viabilidad de tomar en cuenta una muestra problema, donde:

- Las muestra problema que se colectan durante la necropsia y puestos en los tubos de ensaye, tienen que ser analizadas el mismo día.
- Si el análisis es posterior, tiene que ser antes de 2 días y las muestras tienen que ser almacenamiento en refrigeración, de lo contrario, los resultados no serán precisos, ya que hay producción marcada a partir del 3^{er} día.
- Los cuerpos de sujetos en estado de putrefacción, no son aptos para el análisis de metanol como marcador de alcoholismo. Ya que se observó un aumento en la muestra al trascurrir un día a temperatura ambiente y teniendo en cuenta que el tubo estaba cerrado.
- Para el caso propio de cadáveres en putrefacción es importante mencionar que el estado de descomposición va a depender de las condiciones (por ejemplo. Humedad, temperatura, lugares cerrados o abiertos, etc.) donde se encuentre, de tal manera que el cuerpo puede estar expuesto a una mayor carga de microorganismos productores de alcoholes, y por lo tanto, los niveles de alcoholes se incrementarán rápidamente. Por el contrario las muestras que se trabajaron estaban cerradas y la única contaminación por microorganismos que se pudo dar, era al momento de la toma de muestra, pero tampoco se controló la carga de microorganismos.

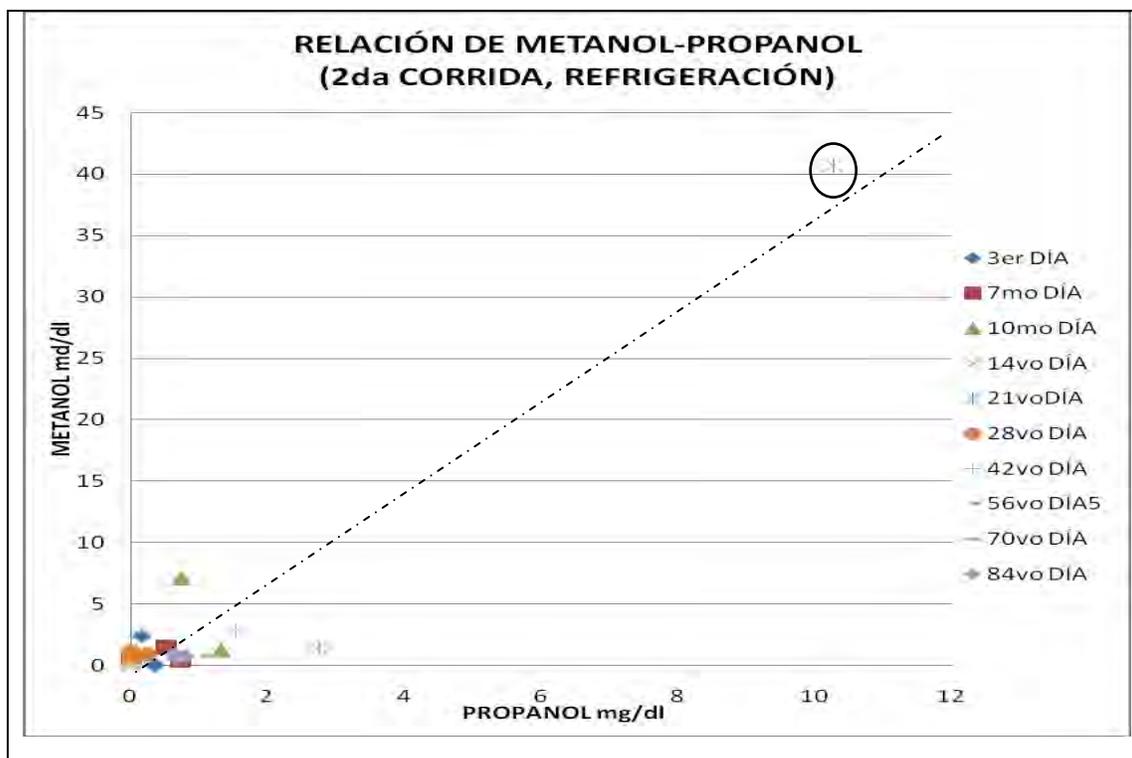


Figura 34. Grafica de la relación metanol-propanol, de muestras almacenadas en refrigeración, tras en monitoreo en diferentes días en una segunda cuantificación (2^{da} corrida), de acuerdo al día correspondiente. La línea de tendencia se enmarca con un punteado.

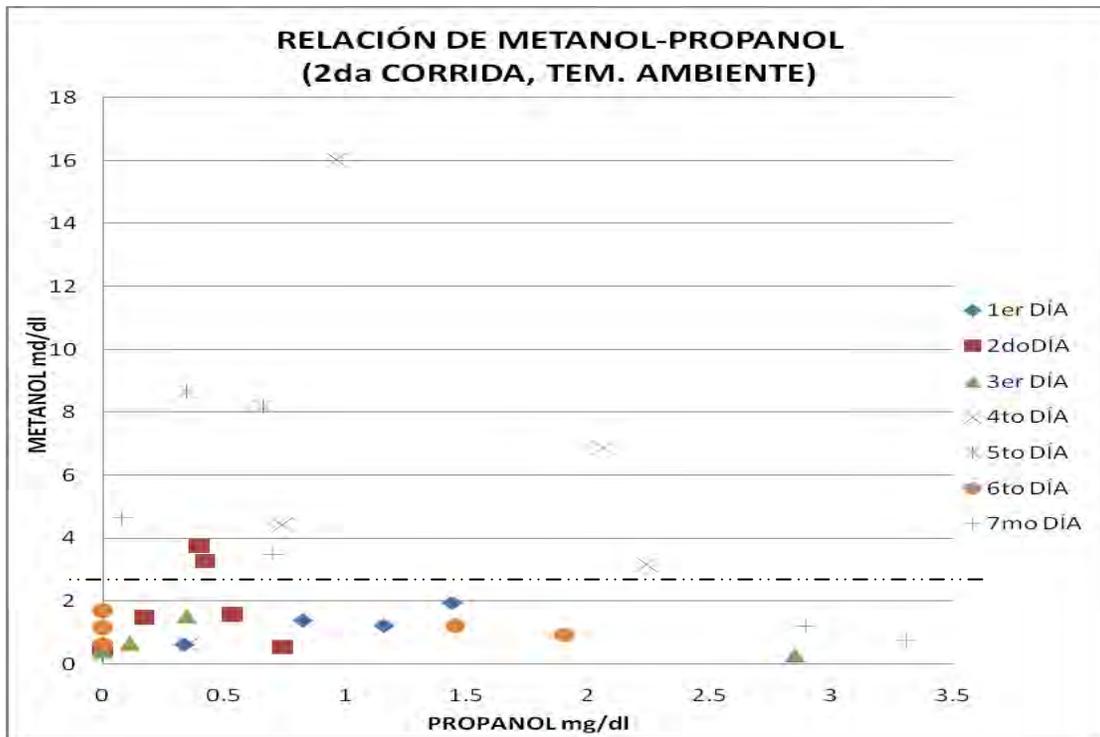


Figura 35 P6. Grafica de la relación metanol-propanol, de muestras almacenadas a temperatura ambiente, atrás en monitoreo en diferentes días en una segunda cuantificación (2^{da} corrida), de acuerdo al día correspondiente. La línea de tendencia se enmarca con un punteado.

Tabla 43: Análisis de varianza (95% de confianza), para la segunda corrida (metanol-propanol) en muestras refrigeradas

Fuente	Suma de cuadrados	g.l.	Media de cuadrados	F-calculada	P-Valor
Regresión	1388.43	1	1388.43	198.65	0.0000
Residuos	160.754	23	6.98932		
Total (Corr.)	1549.18	24			

Debido a que el P - valor en tabla 43 de ANOVA es menor que 0.05, hay una relación estadísticamente importante entre 2^{da} corrida de metanol y 2^{da} corrida de propanol en un nivel de confianza del 95.0 %. Aun que se obtiene una $r = 0.946$ demostrando una relación relativamente poderosa entre las variables, no quiere decir que existe una auto-correlación (Fig.34). Sin embargo, si no se toma en cuenta el punto de la figura 34 que está encerrado en un círculo negro el valor de la correlación sería $r < 3.0$, por lo que, no existen elementos suficientes para establecer una autocorrelación metanol-propanol al almacenar muestras en refrigeración, o sea, no aumentan en una proporción igual. Lo anterior puede reafirmarse al evaluar muestras almacenadas a temperatura ambiente Al observar el valor de $p=0.923$ en la tabla 44, nos indica que no existe autocorrelación, confirmándolo al obtener una $r = 0.017$ (Fig. 35).

Por lo tanto, el propanol no puede ser utilizado para corregir los aumentos en las cantidades de metanol como producto de la putrefacción, por diferentes factores no controlados (carga de m.o, cantidad de carbohidratos, ambiente, etc.) , pero si puede ser utilizado como indicador de que la muestra está en un estado de putrefacción al detectarse en la muestra problema.

Tabla 44: Análisis de varianza (95% de confianza), para la segunda corrida (metanol-propanol) en muestras guardadas a temperatura ambiente.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>g.l.</i>	<i>Medía de cuadrados</i>	<i>F-calculada</i>	<i>P-Valor</i>
Regresión	0.106098	1	0.106098	0.01	0.9238
Residuos	342.244	30	11.4081		
Total (Corr.)	342.351	31			

6. CONCLUSIONES

- Se puede utilizar al metanol para identificar sujetos alcohólicos, a partir de la obtención de muestras post-mortem de sangre de cadáveres humanos, con fines de carácter legal.
- Se determinó la concentración normal en cadáveres humanos con un tiempo de muerte menor a 24 horas, y dependiendo de la concentración se clasificará al sujeto como abstemio, bebedor social o alcohólico.
- El metanol puede ser utilizado también como marcador de abuso de alcohol.

Desarrollo del método analítico.

- Se desarrolló un método por cromatografía de gases con inyección Headspace, capaz de cuantificar trazas de metanol y propanol en muestras post-mortem.
- Se validó el método lográndose resultados aceptables y se logró la adecuada separación de los analitos: metanol y propanol de las muestras forenses, obteniéndose, así, una buena resolución y sensibilidad.

Análisis de la relación metanol-etanol por grupos.

- Las muestras de origen post-mortem de sujetos alcohólicos bajo un estado etílico, no hay relación en el incremento de los niveles de metanol con respecto al aumento en el consumo de bebidas embriagantes; es decir el metanol proviene de su acumulación por la ingesta excesiva de etanol, pero el aumento de metanol como congénere de bebidas embriagantes no tiene una correlación.
- Las muestras de origen post-mortem de sujetos en estado de ebriedad, pero que no tienen antecedentes de alcoholismo, presentaron en solo el 17.5% de los casos una correlación, parte del metanol encontrado proviene de las bebidas embriagantes consumidas y no de la acumulación por el consumo excesivo de etanol.
- No podemos establecer una correlación en el incremento de los niveles de metanol, tomando en cuenta solo a la concentración de etanol en sangre, ya que es muy determinante el tipo y la calidad de las bebidas embriagantes que consumen los sujetos de estudio. Y por lo tanto no podemos establecer con precisión y distinguir a un alcohólico positivo a etanol de un bebedor social.

Conclusión (continuación).

Producción de metanol y propanol en muestras sanguíneas, como consecuencia de la putrefacción.

- Se confirma que el propanol no se encuentra en torrente sanguíneo, en condiciones normales.
- Podemos utilizar al propanol para confirmar producción de alcohol, producto de la putrefacción pero sin establecer una correlación y por ende no se debe de utilizar para corregir cantidades de metanol producto de microorganismos.
- En cadáveres humanos se espera una mayor producción de alcoholes diversos por las condiciones que presenta en comparación con muestras almacenadas y tapadas.

Anexo 1

Manual de Diagnóstico y Estadístico de los trastornos Mentales (DSM-IV, APA, 1995)

4. Trastornos relacionados con sustancias

Trastornos por consumo de sustancias

F1x.2x Criterios para Dependencia de sustancias

Un patrón desadaptativo de consumo de la sustancia que conlleva un deterioro o malestar clínicamente significativos, expresado por tres (o más) de los ítems siguientes en algún momento de un período continuado de 12 meses:

1. Tolerancia, definida por cualquiera de los siguientes ítems:

- (a) una necesidad de cantidades marcadamente crecientes de la sustancia para conseguir la intoxicación o el efecto deseado
- (b) el efecto de las mismas cantidades de sustancia disminuye claramente con su consumo continuado

2. Abstinencia, definida por cualquiera de los siguientes ítems:

- (a) el síndrome de abstinencia característico para la sustancia (v. Criterios A y B de los criterios diagnósticos para la abstinencia de sustancias específicas).
- (b) se toma la misma sustancia (o una muy parecida) para aliviar o evitar los síntomas de abstinencia

3. La sustancia es tomada con frecuencia en cantidades mayores o durante un período más largo de lo que inicialmente se pretendía

4. Existe un deseo persistente o esfuerzos infructuosos de controlar o interrumpir el consumo de la sustancia

5. Se emplea mucho tiempo en actividades relacionadas con la obtención de la sustancia (p. ej., visitar a varios médicos o desplazarse largas distancias), en el consumo de la sustancia (p. ej., fumar un pitillo tras otro) o en la recuperación de los efectos de la sustancia

6. Reducción de importantes actividades sociales, laborales o recreativas debido al consumo de la sustancia

7. Se continúa tomando la sustancia a pesar de tener conciencia de problemas psicológicos o físicos recidivantes o persistentes, que parecen causados o exacerbados por el consumo de la sustancia (p. ej., consumo de la cocaína a pesar de saber que provoca depresión, o continuada ingesta de alcohol a pesar de que empeora una úlcera)

Especificar si:

Con dependencia fisiológica: signos de tolerancia o abstinencia (p. ej., si se cumplen cualquiera de los puntos 1 o 2)

Sin dependencia fisiológica: no hay signos de tolerancia o abstinencia (p. ej., si no se cumplen los puntos 1 y 2)

F1x.1 Criterios para Abuso de sustancias.

A. Un patrón desadaptativo de consumo de sustancias que conlleva un deterioro o malestar clínicamente significativos, expresado por uno (o más) de los ítems siguientes durante un período de 12 meses:

1. Consumo recurrente de sustancias, que da lugar al incumplimiento de obligaciones en el trabajo, la escuela o en casa (p. ej., ausencias repetidas o rendimiento pobre relacionados con el consumo de sustancias; ausencias, suspensiones o expulsiones de la escuela relacionadas con la sustancia; descuido de los niños o de las obligaciones de la casa).

2. Consumo recurrente de la sustancia en situaciones en las que hacerlo es físicamente peligroso (p. ej., conducir un automóvil o accionar una máquina bajo los efectos de la sustancia).

Anexo 1 (continuación)

3. Problemas legales repetidos relacionados con la sustancia (p. ej., arrestos por comportamiento escandaloso debido a la sustancia).

4. Consumo continuado de la sustancia, a pesar de tener problemas sociales continuos o recurrentes o problemas interpersonales causados o exacerbados por los efectos de la sustancia (p. ej., discusiones con la esposa acerca de las consecuencias de la intoxicación, o violencia física).

B. Los síntomas no han cumplido nunca los criterios para la dependencia de sustancias de esta clase de sustancia.

Codificación del tipo de sustancia en el tercer dígito.

F10.00 Criterios para el diagnóstico de Intoxicación por alcohol (303.00).

A. El rendimiento en las actividades cotidianas que requieren coordinación motora es sustancialmente inferior al esperado dada la edad cronológica del sujeto y su coeficiente de inteligencia. Puede manifestarse por retrasos significativos en la adquisición de los hitos motores (p. ej., caminar, gatear, sentarse), caérsele los objetos de la mano, "torpeza", mal rendimiento en deportes o caligrafía deficiente.

B. El trastorno del Criterio A interfiere significativamente el rendimiento académico o las actividades de la vida cotidiana.

C. El trastorno no se debe a una enfermedad médica (p. ej., parálisis cerebral, hemiplejía o distrofia muscular) y no cumple los criterios de trastorno generalizado del desarrollo.

D. Si hay retraso mental, las deficiencias motoras exceden de las asociadas habitualmente a él.

Nota de codificación. Si hay una enfermedad médica (p. ej., neurológica) o un déficit sensorial, se codificará en el Eje III.

F10.3 Criterios para el diagnóstico de Abstinencia de alcohol (291.8).

A. Interrupción (o disminución) del consumo de alcohol después de su consumo prolongado y en grandes cantidades.

B. Dos o más de los siguientes síntomas desarrollados horas o días después de cumplirse el Criterio A:

1. hiperactividad autonómica (p. ej., sudoración o más de 100 pulsaciones)
2. temblor distal de las manos
3. insomnio
4. náuseas o vómitos
5. alucinaciones visuales, táctiles o auditivas transitorias, o ilusiones
6. agitación psicomotora
7. ansiedad
8. crisis comiciales de gran mal (crisis epilépticas)

C. Los síntomas del Criterio B provocan un malestar clínicamente significativo o un deterioro de la actividad social laboral, o de otras áreas importantes de la actividad del sujeto.

D. Los síntomas no se deben a enfermedad médica ni se explican mejor por la presencia de otro trastorno mental.

Especificar si:

Con alteraciones perceptivas

<http://personal.telefonica.terra.es/web/psico/dsmiv/dsmiv4.html#f1x.2x>

American Psychiatry Association (1994). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, DSM-IV*. New York: APA.

Anexo 2.

4.2. Preparación de soluciones y muestras (cálculos).

Metanol (estándar interno)

Solución A

Preparar una solución de concentración 1000 mg/100 ml, para ello agregar 0.318 ml de R.A. metanol y aforar a 25 ml.

Solución B

Preparar una solución de concentración 10 mg/100 ml. De la sol A tomar 1 ml y aforar a 100 ml.

Cálculos.

Metanol

Preparar 25ml de una solución de 1000 mg/100 ml. (sol. A)

$$25\text{ml} \times \frac{1000\text{mg}}{100\text{ml}} \times \frac{1\text{g}}{1000\text{mg}} \times \frac{100\text{g}}{99.9\text{g}} \times \frac{1\text{ml}}{0.7866\text{g}} = 0.3181416\text{ ml de R.A. MeOH}$$

Preparar una solución de Sol de 10 mg/100 ml. (sol. B)

$$V_1 C_1 = V_2 C_2 \dots\dots\dots\text{ec. 1}$$

$$V_1 = 100\text{ ml}$$

$$C_1 = 10\text{ mg}/100\text{ ml}$$

$$V_2 = ?$$

$$C_2 = 1000\text{ mg}/\text{dl}$$

Despejar V_2 de ec. 1

$$V_2 = \frac{V_1 C_1}{C_2}$$

$$V_2 = \frac{(100\text{ ml})(10\text{ mg}/100\text{ml})}{1000\text{ mg}/100\text{ ml}} = 1.0\text{ ml}$$

Anexo 2 (continuación).
Propanol (estándar externo).

Solución A1

Preparar una solución de concentración 1000 mg/100 ml, para ello agregar 0.312 ml de R.A. propanol y aforar a 25 ml.

Solución B1

Preparar una solución de concentración 25 mg/100 ml. De la sol A1 tomar 2.5 ml y aforar a 100 ml.

Cálculos.

Propanol

Preparar 25 ml de una solución de 1000mg/100ml. (sol. A1)

$$25\text{ml} \times \frac{1000 \text{ mg}}{100 \text{ ml}} \times \frac{1 \text{ g}}{1000\text{mg}} \times \frac{100 \text{ g}}{99.9 \text{ g}} \times \frac{1 \text{ ml}}{0.8016 \text{ g}} = 0.312188\text{ml de R.A. MeOH}$$

Preparar una solución de Sol de 25 mg/100 ml. (sol. B1)

$$V_1 C_1 = V_2 C_2 \dots\dots\dots\text{ec. 1}$$

$$V_1 = 100 \text{ ml}$$

$$C_1 = 25 \text{ mg/100 ml}$$

$$V_2 = ?$$

$$C_2 = 1000 \text{ mg/dl}$$

Despejar V_2 de ec. 1

$$V_2 = \frac{V_1 C_1}{C_2}$$

$$V_2 = \frac{(100 \text{ ml})(25 \text{ mg/100 ml})}{1000 \text{ mg/100 ml}} = 2.5 \text{ ml}$$

Anexo 2 (continuación).

Isobutanol (Estándar Interno)

Solución A2

Preparar una solución de concentración 1000 mg/100 ml, para ello agregar 0.322 ml de R.A. Isobutanol y aforar a 25 ml.

Solución B2

Preparar una solución de concentración 25 mg/100 ml. De la sol A2 tomar 2.5 ml y aforar a 100 ml.

Cálculos.

Isobutanol (E.I.)

Preparar 25ml de una solución de 1000mg/100ml. (sol. A2)

$$25\text{ml} \times \frac{1000\text{ mg}}{100\text{ ml}} \times \frac{1\text{ g}}{1000\text{ mg}} \times \frac{100\text{ g}}{99.2\text{ g}} \times \frac{1\text{ ml}}{0.78086\text{ g}} = 0.3227417\text{ ml de R.A. MeOH}$$

Preparar una solución de 25 mg/100ml. (sol. B2)

$$V_1 C_1 = V_2 C_2 \dots\dots\dots\text{ec. 1}$$

$$V_1 = 100\text{ ml}$$

$$C_1 = 25\text{ mg}/100\text{ ml}$$

$$V_2 = ?$$

$$C_2 = 1000\text{ mg}/100\text{ ml}$$

Despejar V_2 de ec. 1

$$V_2 = \frac{V_1 C_1}{C_2}$$

$$V_2 = \frac{(100\text{ ml})(25\text{ mg}/100\text{ ml})}{1000\text{ mg}/100\text{ ml}} = 2.5\text{ ml}$$

Nitrito de sodio.

Preparación de una solución de nitrito de sodio (NaNO_2) 188 mM. Esta sal se colocara a los estándares finales, que se aforan a 50 ml.

Datos del NaNO_2

$$\text{PM}_{\text{NaNO}_2} = 68.99\text{ g/mol}$$

$$\text{Pureza} = 98.60\%$$

$$50\text{ ml } 188\text{ mM} \times \frac{188\text{ mmol}}{1000\text{ ml}} \times \frac{1.00\text{ mol}}{1000\text{ mmol}} \times \frac{68.99\text{ g}}{1\text{ mol}} \times \frac{100\text{ g}}{98.6\text{ g}} = 0.6577\text{ gramos de R.A.}$$

Anexo 3

Análisis de metanol en los cuatro grupos.

Esta prueba no paramétrica se realizó para comparar los resultados del análisis de varianza. Donde teóricamente tiene que arrojar resultados similares.

Estadística no-paramétrica.
Prueba de Kruskal-Wallis. (También la de Wilcoxon signed-rank test).

Tabla A1: Prueba de Kruskal-Wallis para MeOH mg/dl en los 4 grupos.

Grupo	Tamaño de muestra	Orden media
ARNE	28	112.214
ARPE	40	147.537
BS	28	127.875
NA	90	52.9667

Test estadístico = 106.247 P-Valor = 0.0

La prueba de Kruskal - Wallis (Tabla A1) pone a prueba la hipótesis nula de que las medianas de MeOH mg/dl dentro de cada uno de los 4 niveles de Grupo son igual. Debido a que el P-valor es menor que 0.05 ($P < 0.05$), hay una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas en el nivel de confianza 95.0 %. Para determinar qué medianas son significativamente diferente de qué otros, visualiza en grafico de cajas y bigotes.

Estas dos pruebas non-paramétricas permiten obviar (prevenir) los problemas relacionados con las igual-varianzas, las suposiciones de normalidad. Para determinar la calidad de los datos, el coeficiente de variación (CV) fue calculado para las mediciones de metanol en los cuatro grupos. El análisis de regresión múltiple fue empleado para valorar la influencia de la concentración de alcohol etílico, la edad, el sexo y enfermedades relacionadas con el alcoholismo en los cuatro grupos. Todo análisis estadístico fue llevado a cabo usando el programa StatGraphics plus versión 5.1.

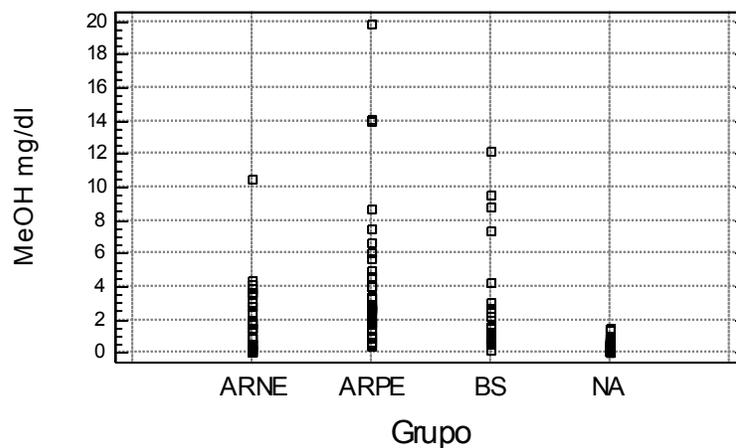
ANEXO 4

Tabla A2: Resumen estadístico para la concentración de metanol (mg/dl).

Grupo	# datos	Promedia	Mediana	Varianza	Desv. Estándar
ARNE	28	2.03857	1.505	4.67247	2.16159
ARPE	40	4.06325	2.845	15.8372	3.9796
BS	28	2.74964	1.52	9.31659	3.05231
NA	90	0.345556	0.3	0.101931	0.319266
Total	186	1.76183	0.65	7.70962	2.77662

Grupo	Mínimo	Máximo	Rango	C. variación
ARNE	0.0	10.46	10.46	106.035%
ARPE	0.45	19.84	19.39	97.9413%
BS	0.13	12.19	12.0	111.007%
NA	0.0	1.54	1.54	92.392%
Total	0.0	19.84	19.84	157.599%

GRAFICA DE DISPERSIÓN PARAL CADA NIVEL



- 1 Goodman Gilman A. Hardman, G. _Las bases farmacológicas de la terapéutica, 9ª ed, editorial McGraw-Hill Interamericana, México. 1996, vol. I. pag. 411-417, 600,601.
- 2 Delgado Bueno S. (1998) El drogodependiente ante los tribunales de justicia. Ed. COLEX pag. 30, 47, 56.
- 3 Garriltt J. (2003) Medical-Legal Aspectos of Alcohol. 4^{ta} ed. Editorial Lawyers & Judges Publishing Company. Inc. Tucson, Az. pag. 67, 51 y 117.
- 4 Memories. FBI Laboratory Symposium on Forensic Toxicology, August 28-29, 2004, Washington, DC. Jones A.W. Ethanol and other volatiles. FBI U.S. Department Justice. Washington 2004. pag. 143-152.
- 5 Brinkman B., Köhler H., Banaschak S., Berg A., Eikermann B., West A., Heinecke A., (2000) ROC analysis of alcoholism markers – 100% specificity. Int J Legal Med. 113: 293-299.
- 6 Drummer O. & Morris O. (2001) The forensic pharmacology of drugs of abuse. Ed. Arnold, London. pag. 286, 287.
- 7 Karch Steben.(1998) Drug abuse, Handbook. Ed CRP Press. Boca Raton. Pág. 368,369.
- 8 Musshoff F., Daldrup Th. (1998). Determination of biological markers for alcohol abuse (review). Journal of Chromatography B. 713: 245-264.
- 9 Bandrés F., Gómez-Gallego F. (2005) Avances en Ciencias de la Salud y de la Vida: Avances en Biomedicina y Biopatología. Ed. Universidad Europea de Madrid, Facultad de ciencias de la salud. Madrid, España. Pág. 261-280.
- 10 Ferguson R, Goldber D. (1997) Genetic markers of alcohol abuse. Clinica Chimica Acta. 257:199-250.
- 11 Musshoft F. (2002) Chromatography methods for the determination of markers of chronic and acute alcohol consumption. Journal of chromatography B. 781: 457-480
- 12 Yegles M., Labarthe A., Auwärter V. (2004) Comparison of ethyl glucuronide and fatty acid ethyl ester concentrations in hair of alcoholics, social drinkers and teetotallers. Forensic Science International. 145 167-173.
- 13 Varga A., Hansson P., Johnson G., Alling C. (2000) Normalization rate and cellular localization of phosphatidylethanol in whole blood from chronic alcoholics. Clinica Chimica Acta. 299: 141-150.
- 14 Saferstein R. 2004. Criminalistics, An introduction to Forensic Science. Eighth edition. PERSON Prentice Hall. pag. 265, 278, 279.

- 15 Schwan R, Albuissou E, Malet L, Loiseaux m, reynaud M, Schellwnberg F, BrousseG, Llorca P. (2004) The use of biological laboratory markers in the diagnosis of alcohol minuse: an evidence – based approach. Drug and Alcohol Dependence. 74: 272 – 279.
- 16 Jurado C., T. Soriano. Diagnosis of chronic alcohol consumption Hair analysis for ethyl-glucuronide. Forensic Science international. 145 (2004) 161-166.
- 17 Haffner H. Th., Banger M., Graw M., Besserer K., Brrink T. (1997) The kinetics of methanol elimination in alcoholics and the influence of ethanol. Forensic Sci. International. 89 129-136.
- 18 Emrich J., Sprung R., Sammler J., Remberg G. (1997) Identification of fatty acid methyl esters (FAMES) in posrmortem tissue. A new marker of alcohol abuse? Forensic Science International. 85 41-49.
- 19 Romero García A., Cromatografía, Curso de métodos. Instituto de Biotecnología, UNAM. Semestre 2/2002. México.
- 20 Agilent Technologies, Conceptos Básicos de GC Agilent Restricted México, Mayo 18, 2006, Pag. 1-69.
- 21 Musshoff F. (2002). Chromatographic methods for the determination of markers of chronic and acute alcohol consumption (review). Journal of Chromatography B. 781: 457-480.
- 22 Agilent Technologies. Manual del CG modelo 6890N.
- 23 Seto Yasuo (1994). Determination of volatile substances in biological samples by headspace gas chromatography. Journal of Chromatography A. 674: 25-62.
- 24 Kolb B. (1999) Headspace sampling with capillary columns. Journal of Chromatography A. 842: 163-205.
- 25 Skoog A.D. 2001. Principios de Análisis Instrumental. Quinta edición. Mac Graw-Hill. España. pag. 16, 19, 730-754, 760-777.
- 26 Tabliaro F., Lubli G. (1992). Chromatographic methods for blood alcohol determination. Journal of Chromatography, 580: 161-190.
- 27 Wilkinson K., Wagner John G. and Sedman Allen J. (1975) Sensitive Head-Space Gas Chromatographic Method for the Determination Of Ethanol Utilizing Capillary Blood Samples. Analytical Chemistry, Vol. 47, No. 9: 1506-1510.
- 28 Paquete estadístico StatGraphics Plus 5.1.
- 29 Guidance for industry. Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Veterinary Medicine (CVM) May 2001 BP.
- 30 Pérez C. (1998) Métodos Estadísticos con STATGRAPHICS para Windows, Técnicas Básicas” RA-MA, España.

- 31 NORMA Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas.
- 32 Barrera Galicia M. (2004) “Aplicación de método de calibración multivariante en la cuantificación simultánea, por espectrofotometría U.V., de Acetaminofen (APAP) y Naproxeno (NAP) Presentes en un medio de disolución”, Tesis, Químico Farmacéutico Biólogo, FES-Cuautitlán, UNAM. pag. 83-122, 131, 132
- 33 Nurnberger J. El cromosoma uno podría albergar los genes del alcoholismo, Instituto de Investigaciones Psiquiátricas de la Universidad de Indiana. American Journal of Psychiatry, mayo 2001.
- 34 Serrano Gallego R. 2003. Introducción al análisis de datos experimentales: Tratamiento de datos en bioensayos. Ed. Publicacions de Universitat Jaume I. España, pag. 43-45.
- 35 Vu, N.T., Chaturvedi, A.K., Canfield, D.V., Soper, J.W.1, Kupfer, D.M., and Roe, B.A.. DNA-Based Detection of Ethanol-Producing Microorganisms in Postmortem Blood and Tissues by Polymerase Chain Reaction. May 2000
This document is available to the public through the National Technical Information Service, Springfield, Virginia 22161.
- 36 Cory J.E.L. (1978) Possible sources of ethanol ante- and post- mortem: Its relationship to the biochemistry and microbiology of decomposition – a review, J. Appl. Bacteriol. 44:1-56.
- 37 MADRID S, A., HURTADO H, C., GATICA I, S. *et al.* (2002) Producción endógena de alcohol en pacientes con cirrosis hepática, alteración motora y sobrecrecimiento bacteriano. *Rev. méd. Chile*, vol.130, no.12, p.1329-1334. ISSN 0034-9887.
- 38 Clark, M. A. and Jones, J. W. (1982), Studies on Putrefactive Ethanol Production. I: Lack of Spontaneous Ethanol Production in Intact Human Bodies, *Journal of Forensic Sciences*, JFSCA, Vol. 27, No. 2, pp. 366-371.
- 39 Zumwalt, R. E., Bost, R. O., and Sunshine (1982), Evaluation of Ethanol Concentrations in Decomposed Bodies, *Journal of Forensic Sciences*, JFSCA, Vol. 27, No. 3, pp. 549-554.
- 40 Roine Risto P, C. J. Peter Eriksson, Reino Ylikahri, Antti Penttilä, and Mikko Salaspuro (1989). Methanol as a Marker of Alcohol Abuse. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. Vol. 13, No. 2: 172-175.

Referencias electrónicas.

- 1E www.quiminet.com.mx , fuente QuimiNet, 2006-11-08 [consultada 08 de noviembre de 2006]
- 2E <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>

