



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA



ESTUDIO DE LA REACCIÓN CON DICROMATO DE POTASIO PARA LA
CUANTIFICACIÓN DE ETANOL EN SANGRE

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

ANA LAURA AGUILAR SANTIAGO

ASESORES

Q.F.B. MIGUEL ANTONIO PÉREZ VELÁZQUEZ

M. EN C. VALENTÍN ISLAS PÉREZ

CIUDAD DE MÉXICO

SEPTIEMBRE 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Tabla de contenido

Introducción	2
Capítulo 1 Consumo de Etanol	
Antecedentes Históricos	5
Obtención de Etanol	6
Fermentación Alcohólica	6
Destilación	6
Bebidas Alcohólicas	7
Contenido o Grado Alcohólico	7
Cálculo del Grado de Alcoholemia	8
Marco Jurídico	11
Ley General de Salud	11
Reglamento de Tránsito Metropolitano	11
Capítulo 2 Toxicología	
Toxicología forense	12
Toxicología del Alcohol	14
Capítulo 3 Propiedades del Etanol	
Físicas y Químicas	17
Farmacológicas	19
Farmacocinética	19
Farmacodinamia	21
Capítulo 4 Recolección, embalaje y almacenamiento de muestras	
Toma de Muestra	23
Muestras procedentes de Personas Vivas	23
Muestras procedentes de Autopsia	24
Muestras procedentes de Exhumación	25
Embalaje	25
Envasado y Conservación de Muestras	25
Descomposición Química y Biológica	26

Capítulo 5 Técnicas para la determinación de alcohol

Presuntivas ó químicas	28
Confirmativas o Instrumentales	29
Prueba del alcoholímetro	29
Cromatografía de Gases	30
Cuantificación Enzimática	31

Capítulo 6 Reacción de Etanol con Dicromato de Potasio

Balanceo de la Ecuación	33
Factores que Afectan a la Reacción	34
Cambios a Causa de la Putrefacción	34
Fuentes generadoras del grupo OH	36
Degradantes del grupo OH	37
Variaciones Post Mortem del Alcohol	37

Capítulo 7 Espectrofotometría UV-Visible

Espectrofotómetro Ultravioleta-Visible	39
Componentes del espectrofotómetro	40
Espectrofotómetro de doble y un solo haz	41
Espectro Ultravioleta-Visible	41
Ley de Beer-Lambert	42
Limitaciones de la Ley de Beer	43

Planteamiento del problema	44
-----------------------------------	----

Objetivos	45
------------------	----

Hipótesis	46
------------------	----

Metodología	47
--------------------	----

Resultados	51
-------------------	----

Análisis y Discusión de Resultados	81
---	----

Conclusiones	84
---------------------	----

Referencias Bibliográficas	85
-----------------------------------	----

Introducción

El etanol es una sustancia que se consume desde los albores de la civilización y también es una de las sustancias causante de accidentes de tránsito; de delitos como el homicidio o violaciones. Se ha estudiado más que otras drogas; se sabe que órganos afecta, como estimula para posteriormente deprimir el sistema nervioso central, cómo entra y sale de los tejidos y el más importante; como se relaciona cada órgano con la cantidad de alcohol consumido momentos antes y después del fallecimiento de una persona.

Uno de los principales cuestionamientos por parte de los diversos órganos procuradores de justicia (jueces, magistrados, ministerios públicos) es conocer la cantidad de etanol presente en el cuerpo de una persona que ya es catalogada por cuestiones jurídicas como occiso.

Motivo de estos cuestionamientos, surge la necesidad de contar con técnicas analíticas que sean confiables, precisas, exactas, reproducibles y repetibles. También es cierto que se tiene que contar con técnicas analíticas instrumentales que proporcionen un mayor grado de exactitud, basado en técnicas que de igual forma sean reproducibles, en ocasiones por cuestiones logísticas se tiene que recurrir a técnicas analíticas básicas cuando se carece de técnicas instrumentales como HPLC, cromatografía de gases; sin embargo no significa que al emplear éstas técnicas se carezca de lineamientos metodológicos y estadísticos.

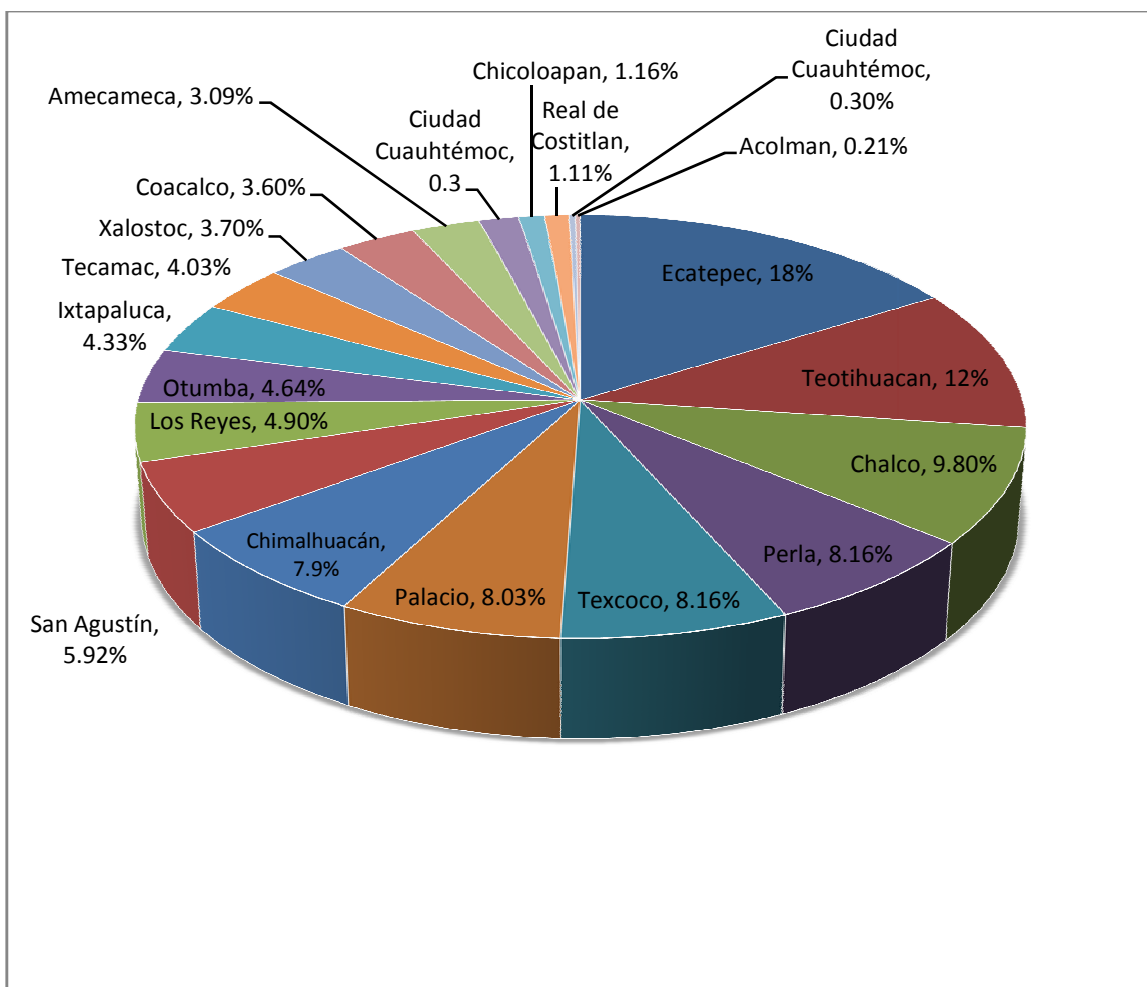
Existen diversos procedimientos para conocer la cantidad de etanol ingerido por una persona en donde se considera la dosis consumida, el tipo de bebida y el género; estos factores en su conjunto pueden determinar el grado de alcoholemia de la persona, sin embargo seguirá siendo un valor carente de exactitud y precisión. Para obtener el valor exacto y preciso de la concentración de etanol consumido se utilizan métodos analíticos cuantitativos; como la cromatografía de gases acoplada a espectrómetro de masas, cromatografía líquida de alta eficacia ó métodos enzimáticos.

Tal es el caso de la cantidad de análisis solicitados en el área de química forense, en el laboratorio con ubicación en la Subprocuraduría de Ecatepec, en donde se realiza de forma rutinaria la prueba para determinar la cantidad de etanol en sangre.

El laboratorio de química forense con sede en Texcoco atiende los llamados de los siguientes municipios: Nezahualcoyotl La Perla, Nezahualcoyotl Palacio, Chimalhuacán, Los Reyes, Ixtapaluca, Campestre Guadalupeana, Chicoloapan, Real de Costitlan, Amecameca, Chalco, San Agustín, Ecatepec, Tecamac, Otumba, Coacalco, Ciudad Cuauhtémoc, Xalostoc, Teotihuacan, Texcoco y Acolman; en donde se obtuvo registro que en el periodo comprendido del 01 de Enero de 2008 al 31 de Diciembre de 2008, se solicitaron 4,169 pruebas de las cuales 2,329 fueron para requerir la determinación de alcohol en sangre (alcoholemia), como se expresa gráficamente en la Tabla I.1 y Gráfico I.1.

Tabla I.1 Número de alcoholemias solicitadas por cada municipio y su porcentaje en el año 2008.¹

Número y porcentaje de alcoholemias recibidas en 2008					
Municipio	Cantidad	Porcentaje	Municipio	Cantidad	Porcentaje
Ecatepec	419	18	Ixtapaluca	94	4.33
Teotihuacan	228	12	Tecamac	86	4.03
Chalco	190	9.80	Xalostoc	84	3.70
Perla	190	8.16	Coacalco	72	3.60
Texcoco	187	8.16	Amecameca	42	3.09
Palacio	183	8.03	Campestre Guadalupana	28	1.80
Chimalhuacán	138	7.90	Chicoloapan	27	1.16
San Agustín	114	5.92	Real de Costitlan	26	1.11
Los Reyes	108	4.90	Ciudad Cuauhtémoc	7	0.30
Otumba	101	4.64	Acolman	5	0.21
Total de pruebas solicitadas = 4,169			Total de alcoholemias = 2,329		

Grafico I.1 Solicitudes de alcoholemia por municipio expresadas en porcentaje. ¹

Consumo de Etanol

Antecedentes Históricos

El alcohol representó un gran descubrimiento para la química. Entre las bebidas preparadas por el hombre en el curso de los siglos, el vino ha sido siempre la más importante y la que ha desempeñado más destacado papel.

En China se bebía vino 2000 años a.C. Entre los griegos y romanos se le veneraba en la persona de los dioses Dionisio y Baco, a los que se dedicaban altares y templos.²

La biblia menciona el vino más de 200 veces, queriendo transmitir el símbolo de Noé, como su creador y el hecho de ser elegido por Jesucristo como parte importante del ritual fundamental del culto cristiano, esto refleja la gran importancia que para los judíos de esa época tuvo el vino.

Los griegos fueron los innovadores en la conservación del vino, al que añadían brea, resina y especias para prolongar el tiempo de conservación. El vino de resina todavía es popular en Grecia. En la invasión de las Galias, los romanos descubren que los celtas utilizaban barriles de madera para conservar la cerveza, los cuales resultaron más seguros y capaces para transportar vino, que las ánforas de la época.

En la época del descubrimiento de América, Hernán Cortés ordena a cada español plantar 10 cepas de *vitis vinífera* por cada indio que tuviera en su dominio; dando así lugar a un nuevo viñedo.

Un hito en la historia del vino, se produce en el siglo XVII, cuando el monje Dom Perignon de la abadía Hautvilles de Champagne, descubre casualmente un vino con espuma, que posteriormente conseguiría tanta fama con el nombre de Champagne.

Con Pasteur puede decirse que nació la Enología moderna, la combinación de la Biología y la Química, aplicadas al estudio del vino. El vino no se hace en laboratorios, sin embargo se estudia y analiza en ellos; se investigan las medidas necesarias para conservar la calidad.³

Obtención de Etanol

Fermentación Alcohólica

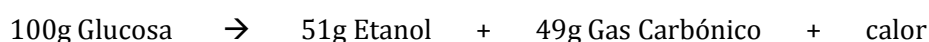
La fermentación es un proceso de transformación química de las sustancias orgánicas, llevado a cabo por enzimas producidas por microorganismos; generalmente va acompañado de desprendimiento de gases y un efecto calorífico.

Las enzimas o fermentos segregados por los microorganismos son catalizadores de naturaleza proteica que actúan de manera independiente de los microorganismos que los generan.

Los microorganismos útiles para la fermentación son: levaduras, es un hongo microscópico unicelular que se produce por gemación; bacterias, son organismos unicelulares de entre 1 y 3µm, por su forma se dividen en bacilos, cocos y espirilos; hongos, son plantas que carecen de clorofila, se reproducen por esporas y los hay de tamaño microscópico a regular como las setas.

La fermentación alcohólica es una de las etapas principales que transforman el mosto o zumo azucarado, en un líquido con un determinado contenido de alcohol etílico. Dura aproximadamente una semana, a una temperatura de 20°C y se traduce por una disminución en la densidad del mosto.⁴

Gracias a las levaduras presentes en el mosto, los azúcares son transformados en gas carbónico. La siguiente ecuación está dada por Gay-Lussac.



Esta ecuación indica que 100g de azúcar producen alrededor de 50g de alcohol y 50g de gas carbónico. Desde Pasteur se dice que esta ecuación es imprecisa ya que se forman otros numerosos compuestos como ácidos, ésteres y alcoholes distintos. La actividad enzimática corresponde a transferencias de energía; en el caso de la fermentación alcohólica existe desprendimiento de calor.⁵

Destilación

El líquido alcohólico obtenido por fermentación es una mezcla de alcohol y agua que, en el caso del vino, tiene además colorantes, aldehídos, cetonas; así que debe destilarse para separar el alcohol del agua y demás impurezas. Generalmente, la primera destilación tiene por

objeto formar lo que se llama *flemas*, es el alcohol de 60-75% que se obtiene como destilado. Estas son destiladas de nuevo; para obtenerse el alcohol ordinario, de 95-96% de riqueza en etanol.

No se puede concentrar más por destilación, ya que el etanol forma una mezcla azeotrópica con el agua. Para obtener el alcohol anhidro se usan deshidratantes como el óxido de calcio, glicerina anhidra, acetato de sodio anhidro.⁴

Bebidas Alcohólicas

Contenido o grado alcohólico

El etanol o alcohol etílico es el componente fundamental de las bebidas alcohólicas, a la vez que es utilizado ampliamente como disolvente, a veces desnaturalizado, y antiséptico.

La graduación alcohólica de las bebidas suele expresarse en mililitros del alcohol por 100 mililitros de líquido (% v/v) o en grados centesimales (° %); por ejemplo: un litro de vino al 10% o de 10° contiene 10 mL de etanol. En la tabla 1.1 se muestran las bebidas más comunes y su graduación.⁶

Tabla 1.1 Graduación de las bebidas alcohólicas más frecuentes y, su cantidad en gramos, equivalente a un volumen dado.⁶

Tipo de bebida alcohólica	Contenido en %	Volumen consumido mL	Cantidad de alcohol en gramos (g)
Vino Blanco	11 - 13.5	270	23.7 - 29.1
Vino Rosado	11.5 - 12	270	24.8 - 25.9
Vino Tinto	11 - 16	270	23.7 - 34.5
Oporto, Jerez	15 - 16	110	13.2 - 14.1
Ron	40 - 54	70	22.4 - 30.2
Ginebra	40 - 51	70	22.4 - 28.5
Vodka	50	70	28
Whisky	40 - 43	100	32 - 34.4
Coñac	34 - 40	60	16.3 - 19.2
Cavas	11.8	120	11.3
Cerveza	5 - 7.4	300	12 - 17.7
Cointreau	40	60	19.2
Ricard	45	60	21.6

Cálculo del Grado de Alcoholemia

El valor del cálculo de alcohol en sangre (alcoholemia) indica la concentración de éste que circula a través de la sangre después de ser ingerido. Esta concentración depende de la dosis de alcohol consumido, su absorción (esta varía en función de diversos factores, como el que se beba en ayunas o después de haber consumido alimentos); el tiempo desde que se ha consumido ya que la alcoholemia aumentará mientras se vaya absorbiendo el alcohol ingerido, e irá disminuyendo al metabolizarse el alcohol en el hígado, y por último el contenido de agua del organismo que varía principalmente en función del peso corporal y el sexo.

Una vez ingerida la bebida alcohólica, el alcohol es absorbido rápidamente en el aparato digestivo, si en éste hay alimento, la absorción será más lenta, una vez absorbido se distribuirá regularmente en la totalidad del agua corporal, la cuál será equivalente al 60% del peso del individuo.

Se puede obtener la relación de la distribución del alcohol tomando en cuenta el volumen del agua corporal (60% de la masa corporal) mediante la siguiente fórmula.

Volumen de distribución = Gramos de alcohol ingerido / Litros de agua

Para mayor explicación se puede tener a una persona que pesa 80 Kg y ésta bebe 400 mL de vino el cual tiene una concentración de alcohol del 12%. Posteriormente se calculan los gramos de alcohol puro que contienen los 400 mL de vino y se hace de la siguiente forma:

$(400 \text{ mL}) (0.12\%) (0.8 \text{ g/mL densidad del alcohol}) = 38.4 \text{ g de alcohol puro en } 400 \text{ mL de vino}$

Una vez obtenido este valor, será sustituido en la siguiente fórmula:

Volumen de distribución = $38.4 \text{ g de alcohol} / 48 \text{ L de agua} = 0.8 \text{ g/L}$

Existen varias fórmulas con las que se puede determinar el grado de alcoholemia en una persona, la cual dependerá del volumen de alcohol ingerido; así como también se ha mencionado influye si es hombre o mujer, como se hace referencia en la fórmula de Widmark.

$$\text{Gramos de alcohol puro ingerido} = \frac{\text{Graduación (\%)} \times \text{Cantidad ingerida mL} \times 0.80 \text{ g/mL}}{100}$$

En donde la graduación (%) es el valor marcado en la etiqueta del producto, la cantidad ingerida es estimada de acuerdo a los vasos ingeridos y se expresa en mL; el 0.80 g/mL es la densidad del etanol.

Posteriormente se hace el cálculo para obtener el grado de alcohol en sangre, utilizando el valor obtenido de alcohol puro, con la ecuación anterior.

$$\text{Alcoholemia en Hombres} = \frac{\text{Gramos de alcohol puro ingerido}}{\text{Peso de la persona en g} \times 0.7 \text{ g/L}}$$

$$\text{Alcoholemia en Mujeres} = \frac{\text{Gramos de alcohol puro ingerido}}{\text{Peso de la persona en g} \times 0.6 \text{ g/L}}$$

Existe otro concepto que influye en el empleo de la fórmula de Widmark, el cuál es el de unidad de bebida estándar.

Unidad de bebida Estándar. Como es bien sabido existe una gran variedad de bebidas alcohólicas y estas se pueden ingerir o preparar de diferentes formas: vinos, cervezas, cocteles, etc.; para poder simplificar la estimación de la cantidad de alcohol consumida se creó este término que tiene una equivalencia a 10 g de alcohol.

Si a un vaso de vino (100 mL) al 12° se le desea conocer la cantidad de alcohol, éste se conocería como una unidad de bebida estándar y estaría dada por la siguiente fórmula.

$$\text{Unidad de Bebida Estándar} = \frac{100 \text{ mL} \times 12 \times 0.8 \text{ g/mL}}{100}$$

Como resultado de esta operación se obtienen 9.6 g de alcohol absoluto, lo cual es equivalente a la cantidad contenida en una botella de cerveza de 250 mL con 5° de alcohol.

$$\text{Unidad de Bebida Estándar} = \frac{250 \text{ mL} \times 5 \times 0.8 \text{ g/mL}}{100}$$

Y como resultado de esta operación se obtienen 10 g de alcohol absoluto, por consiguiente en promedio una unidad de bebida estándar (1 U.B.E.) es de 10 gramos.

1 U.B.E. = 10 gramos de alcohol = una copa de vino tinto, una botella de cerveza o un coctel

2 U.B.E. = 20 gramos de alcohol = una copa de coñac, licor, whisky, 500 mL de cerveza

 Tipo de Bebidas Alcohólicas

Tabla 1.2 Se presentan las principales bebidas alcohólicas y su equivalencia en Unidades de Bebida Estándar.⁷

Tipo de Bebida	Volumen	Nº de Unidades de Bebida (U.B.)	Gramos de Alcohol Puro
Vino	1 vaso (100 mL)	1	10
	1 Litro	10	100
Cerveza	1 caña (200 mL)	1	10
	1 Litro	15	50
Copas de bebidas Destiladas	1 copa (50 mL)	2	20
	1 combinado (50 mL)	2	20
	1 Litro	40	400
Jerez, cava, vermut	1 copa (50 mL)	1	10
	1 Vermut (100 mL)	2	15
	1 Litro	20	200

Existe también una forma condensada de la fórmula del químico sueco Erik M. P. Widmark para la determinación de la concentración de alcohol en sangre.⁷

$$c = \frac{A}{m \cdot r}$$

Donde:

- **C** es la concentración de alcohol en la sangre
- **A** es la cantidad de alcohol ingerido en gramos
- **r** es el factor de distribución del individuo: 0.70 en hombres y 0.60 en mujeres
Hombres: 0.68 - 0.70 g/L
Mujeres / jóvenes: 0.55 - 0.60
- **m** es la masa de la persona dada en gramos

Marco Jurídico

Ley General de Salud

Son disposiciones de la ley general de salud, que la aplicación de ésta, sea en toda la república y sus disposiciones son de orden público e interés social. Y tiene por consiguiente, las siguientes finalidades:

El bienestar físico y mental del hombre para contribuir al ejercicio pleno de sus capacidades, la prolongación y el mejoramiento de la calidad de vida, la protección y el acrecentamiento de los valores que coadyuven a la creación, conservación y disfrute de condiciones de salud.

La secretaría de salud, realiza actividades con el fin de dar a conocer los efectos de la publicidad en la incidencia de alcoholismo y en los problemas relacionados con el consumo de bebidas alcohólicas, hábitos de consumo de alcohol en los diferentes grupos de la población, y efectos del abuso de bebidas alcohólicas en los ámbitos, familiar social, deportivo, laboral y educativo.

Artículo 217. Para los efectos de esta ley, se considera bebidas alcohólicas aquellas que contengan alcohol etílico en una proporción de entre 2% y 55% en volumen. Cualquiera otra que contenga una proporción mayor no podrá comercializarse como bebida.

Artículo 218. Toda bebida alcohólica, deberá ostentar en los envases, la leyenda: “El abuso en el consumo de este producto es nocivo para la salud”, escrito con letra fácilmente legible, en colores contrastantes y sin que se invoque ó se haga referencia a alguna disposición legal.

La Secretaría de Salud, publicará en el Diario Oficial de la Federación el acuerdo mediante el cual podrán establecerse otras leyendas precautorias, así como las disposiciones para su aplicación y utilización.

Artículo 220. En ningún caso y de ninguna forma se podrán expender o suministrar bebidas alcohólicas a menores de edad.⁸

Reglamento de Tránsito Metropolitano

Capítulo VI de la conducción de vehículos bajo los efectos del alcohol y narcóticos

Artículo 31. Ninguna persona puede conducir vehículos por la vía pública, si tiene una cantidad de alcohol en la sangre superior a 0.8 gramos por litro o de alcohol en aire expirado superior a 0.4 miligramos por litro o bajo el influjo de narcóticos.

Los operadores de vehículos destinados al servicio de transporte de pasajeros, de transporte de carga o de transporte de sustancias tóxicas o peligrosas, no deben presentar ninguna cantidad de alcohol en la sangre o en aire expirado, o síntomas simples de aliento alcohólico o de estar bajo los efectos de narcóticos.⁹

Toxicología

La toxicología es la rama de las ciencias médicas que estudia los tóxicos o venenos y sus efectos en el organismo; del griego *toxicon*, venenoso; *logos*, estudio ó tratado.

Tóxico es toda sustancia que al estar en contacto con el organismo por cualquier vía, y mediante mecanismos químicos o fisicoquímicos, produce alteraciones orgánicas o funcionales incompatibles con la salud o la vida. En general todo fármaco es potencialmente tóxico, por un mecanismo de sobredosis. De aquí que el término *tóxico* tenga una connotación más amplia, mientras que el de *veneno* se restringe a sustancias que en cualquier dosis, siempre causan alteración en la salud. Sin embargo, en la práctica se emplean como sinónimos.¹⁰

La toxicología es el conjunto de procedimientos analíticos cuyo fin es aislar, identificar y determinar cualitativa o cuantitativamente sustancias tóxicas, psicotrópicas y estupefacientes, así como metabolitos de las mismas, tanto en muestras biológicas, de cadáveres o personas vivas; como en muestras no biológicas ya sean de naturaleza orgánica o inorgánica, que comprenden polvos, sólidos y líquidos; con la ingestión, administración, transporte o posesión de dichas sustancias, esto con el fin de permitir al agente del ministerio público y al Juez conocer el tipo de sustancia para auxiliarle a tipificar una conducta supuestamente considerada como delictiva.

Toxicología forense

En el momento en que el uso incontrolado de las drogas se ha convertido en un gran problema mundial afectando a todos los sectores de la sociedad; el rol de los toxicólogos ha asumido nueva y mayor importancia. Los toxicólogos son los responsables de determinar e identificar la presencia de drogas y venenos en fluidos corporales, tejidos y órganos.

La toxicología en el área forense utiliza métodos y técnicas analíticas para el estudio del indicio o evidencia, para poder establecer y conocer la naturaleza de la misma y así poder determinar con precisión el toxico que se busca.

De acuerdo a la naturaleza, procedencia y recolección de los indicios o evidencias, es comprensible que las muestras susceptibles de ser analizadas sean de diversas características en cuanto a su origen y composición. Tales pueden ser muestras biológicas como: sangre, orina, saliva, líquido cefalorraquídeo; Tejidos; uñas, pelo, piel; vísceras; hígado, cerebro, riñones, pulmones, vómito, lavados o contenido gástrico; o en su caso líquidos de distinta naturaleza; jarabes, ampollitas, mezclas pseudomedicinales, leche, té, café, agua, bebidas

alcohólicas, refrescos, disolventes y reactivos químicos de uso doméstico o industrial; polvos, cápsulas, tabletas, comprimidos, pastillas, grageas, alimentos, vegetales.¹¹

A continuación se definen algunos conceptos:

Fármaco: Sustancia natural o sintética que tenga alguna actividad farmacológica y que se identifique por sus propiedades físicas, químicas o acciones biológicas, que no se presenten en forma farmacéutica y que reúna condiciones para ser empleada como medicamento o ingrediente de un medicamento.

Medicamento: Toda sustancia o mezcla de sustancias de origen natural o sintético que tenga efecto terapéutico, preventivo o rehabilitatorio, que se presente en forma farmacéutica y se identifique como tal por su actividad farmacológica, características físicas, químicas y biológicas.¹²

Sustancia psicoactiva, psicotrópica o droga: Sustancia que altera algunas funciones mentales y a veces físicas, que al ser consumida reiteradamente tiene la posibilidad de dar origen a una adicción. Estos productos incluyen las sustancias, estupefacientes y psicotrópicos clasificados en la Ley General de Salud, aquellos de uso médico, los de uso industrial, los derivados de elementos de origen natural, los de diseño, así como el tabaco y las bebidas alcohólicas.¹³

Tóxico: Es todo aquel elemento o compuesto químico capaz de producir lesiones en el organismo humano e incluso provocar la muerte.¹⁴

De acuerdo con lo anterior, el concepto de droga o tóxico toma diferentes connotaciones en los siguientes casos:

- Cuando los hechos investigados se relacionan con principios activos de medicamentos que produjeron la muerte o lesiones, accidentales o no. En esta situación, es aplicable el concepto de *toxicidad* como la capacidad de toda sustancia de producir daño. De acuerdo con esta concepción, toda droga, fármaco o medicamento se puede considerar como un tóxico en potencia, ya que dependiendo de la dosis o su tiempo de exposición puede ser capaz de producir una reacción adversa o indeseable.
- En la ingestión o absorción accidental o intencional de sustancias de uso doméstico (productos de limpieza, cosméticos, insecticidas). En estos casos se habla exclusivamente de sustancias tóxicas.
- Cuando una persona se halla en posesión de medicamentos cuyo principio activo está sancionado por la Ley General de Salud como psicotrópico o estupefaciente. Para efectos legales es importante que la cantidad y uso de los mismos haya sido demostrada químicamente para ser considerado como droga o tóxico.

Toxicología del Etanol

Destino del Etanol en el cuerpo humano

El tema del análisis de alcohol inmediatamente conduce al objetivo primario de la toxicología forense: La detección y aislamiento de fármacos en el cuerpo para determinar su influencia en el comportamiento humano. En el caso de alcohol, el problema es más complicado por consideraciones prácticas. El papel predominante del automóvil en la sociedad ha desencadenado la imposición de leyes destinadas a proteger al público de los conductores ebrios. En la práctica, esto ha significado que toxicólogos han tenido que idear procedimientos rápidos y específicos para medir el grado de intoxicación alcohólica. Los métodos utilizados deben ser adecuadamente diseñados para aplicar la prueba a cientos de miles de automovilistas cada año, sin causar daño físico o alguna molestia injustificada, mientras al mismo tiempo ofrecer un diagnóstico fiable que pueda ser apoyado y defendido en el marco del sistema jurídico.

El alcohol etílico, es un líquido incoloro normalmente diluido con agua y consumido como una bebida. Lógicamente, la medida de la intoxicación está en función de la cantidad de alcohol que una persona ha consumido. Desafortunadamente la mayoría de arrestos se hacen después de los hechos, cuando tal información no está disponible para las autoridades judiciales; incluso si estos datos pueden ser recogidos, numerosos factores relacionados, tales como el peso corporal y la tasa de absorción alcohólica en el cuerpo, son tan extremadamente variables que sería imposible determinar patrones estándares con rendimiento fiable para los niveles de intoxicación por alcohol.

Como cualquier otro depresivo, el alcohol tiene sus principales efectos sobre el sistema nervioso central, especialmente el cerebro. El alcance de la depresión es proporcional a la concentración de alcohol en las células nerviosas. Las funciones de los nervios más sensibles a la acción de alcohol se encuentran en las superficies de la corteza cerebral. Más tarde, como el sujeto absorbe el alcohol en mayor medida, las funciones de la parte central y posterior del cerebro se ven afectadas. Las funciones nerviosas que son más resistentes, y que son las últimas, son las que se centran en la médula del cerebro, que regula las funciones vitales tales como la respiración y la actividad cardíaca.

Teóricamente, si uno quiere una verdadera determinación de la cantidad de alcohol, que altera las funciones corporales normales de un individuo, sería mejor remover una porción de tejido cerebral y realizar un análisis directo sobre él para el contenido de alcohol. Esto no puede hacerse en sujetos vivos. En consecuencia, toxicólogos han concentrado sus esfuerzos en la sangre, ya que la sangre es el medio de transporte para el alcohol que circula por todo el cuerpo, llevándolo a todos los tejidos, incluyendo el cerebro. Afortunadamente, la evidencia experimental apoya este enfoque y muestra que la concentración de alcohol en la sangre es directamente proporcional a la concentración de alcohol en el cerebro. Desde el punto de vista

médico legal, los niveles de alcoholemia se establecen de acuerdo a la relación de ingesta de alcohol y su efecto en el cuerpo.

El alcohol se manifiesta en la sangre minutos después de haber sido consumido y aumenta la concentración lentamente mientras se absorbe desde el estómago e intestino delgado en el torrente sanguíneo. Cuando todo el alcohol ha sido absorbido, un nivel máximo de alcohol se alcanza en la sangre e inicia la post-absorción. A continuación, la concentración de alcohol disminuye lentamente hasta un nivel cero.

Muchos factores determinan la velocidad a la que el alcohol es absorbido en el torrente sanguíneo. Estos incluyen el tiempo total necesario para consumir la bebida, el contenido de alcohol de la bebida, la cantidad consumida; la cantidad y tipo de alimentos que están presentes en el estómago en el momento de beber. Con tantas variables, es difícil predecir cuánto tiempo requiere el proceso de absorción. Por ejemplo, la cerveza se absorbe más lentamente que su concentración equivalente de alcohol en agua. Esto es aparentemente debido a los carbohidratos presentes en la cerveza. También, el alcohol consumido con el estómago vacío se absorbe más rápido que una cantidad equivalente de alcohol cuando no hay alimentos en el estómago. Entre más largo es el tiempo total requerido para completar la absorción, menor será el pico de concentración de alcohol en la sangre. En función de una combinación de factores, la máxima concentración de alcohol en sangre llega hasta dos o tres horas después del momento de consumo. Bajo condiciones normales en un bebedor social, toma de 30 a 90 minutos desde el momento del último trago hasta que el proceso de absorción es terminado.

Durante la fase de absorción, el alcohol se incorpora lentamente al torrente sanguíneo y es transportado a todas las partes del cuerpo. Cuando el periodo de absorción se ha completado, el alcohol se distribuye de manera uniforme en cerca de dos tercios del volumen del cuerpo humano. La grasa, los huesos y el cabello son bajos en contenido de agua, por lo tanto, contienen poco alcohol, mientras que la concentración de éste en el resto del cuerpo es bastante uniforme.¹⁰ Aunque se ha demostrado que la concentración de Etil Glucurónido en el cabello es un marcador específico y sensible en la determinación de un historial de alcoholismo crónico.¹⁴ Si la sangre no está disponible, como puede ser el caso en algunas situaciones post mortem, el médico siempre tiene la opción de seleccionar un órgano rico en agua o fluidos, como el cerebro, líquido cefalorraquídeo o humor vítreo, para determinar el contenido de alcohol del organismo en un grado razonable de precisión.

Ya que el alcohol se distribuye por el torrente sanguíneo, el cuerpo procede a comenzar la eliminación de su presencia. La eliminación se realiza a través de dos mecanismos: oxidación y excreción. Casi todo el alcohol (95 a 98%) se consume eventualmente se oxida a dióxido de carbono y agua. La oxidación tiene lugar casi exclusivamente en el hígado. Aquí, en la presencia de la enzima alcohol deshidrogenasa, el alcohol se transforma en acetaldehído y luego al ácido Acético. El ácido Acético posteriormente se oxida en prácticamente todas las partes del cuerpo a dióxido de carbono y agua.

Los residuos de alcohol son excretados sin cambios en el aliento, orina y respiración. Más importante, una amplia evidencia experimental ha comprobado que la cantidad de alcohol en el aliento exhalado es directamente proporcional a la concentración de alcohol en la sangre. Esta observación ha tenido gran impacto en la tecnología y procedimientos usados para pruebas de alcoholemia. El desarrollo de instrumentos para medir el contenido de alcohol en la respiración de forma fiable ha hecho posible la verificación de millones de personas de forma rápida, segura y conveniente.

El destino del alcohol en el cuerpo, es relativamente simple, es decir, la absorción en el torrente sanguíneo, la distribución por toda el agua del cuerpo y por último, la eliminación por oxidación y la excreción. La eliminación de alcohol varía entre individuos; 0,015% p/v por hora parece ser el valor promedio una vez que el proceso de absorción es completado. Sin embargo, hay que destacar que esta cifra es un promedio que puede variar en hasta un 30% entre individuos.¹¹

Propiedades del Etanol

Propiedades Físicas y Químicas

- Sinónimos: Etanol, alcohol, alcohol etílico, metil carbinol, hidrato de etilo, alcohol de grano, alcohol absoluto, alcohol anhidro.
- Contenido: Contiene no menos de 92,5 por ciento y no más del 93,8 por ciento (m/m), que corresponden a no menos del 94,4 por ciento y no más del 96 por ciento (v/v) a 15,56°C.
- Clasificación Química: Alcohol.
- Fórmula Molecular: C_2H_6O
- Estructura Química: CH_3-CH_2-OH
- Composición: C: 52.24 %; H: 13.13 % y O: 34.73 %.
- Descripción: Líquido incoloro, claro, volátil. Aún a bajas temperaturas se volatiliza rápidamente. Es inflamable e higroscópico.
- Peso Molecular: 46.07 g/mol.
- Solubilidad: Miscible en agua, éter y cloroformo.¹⁶
- Punto de Ebullición: 78.4°C
- Punto de Congelación: -114.3°C
- Densidad: 0.789 g/mL
- Temperatura de ignición: 363°C
- Temperatura de auto ignición: 793°C.
- Densidad de vapor: 1.59 g /mL
- Presión de vapor: 59 mm de Hg a 20°C.
- Índice de refracción (a 20°C): 1.361

- Conductividad térmica (W/m K): 0.17 (a 20°C).
- Propiedades Químicas: Reacciona violentamente con una gran variedad de reactivos como: difluoruro de disulfurilo, nitrato de plata, pentafluoruro de bromo, perclorato de potasio, perclorato de nitrosilo, cloruro de cromilo, percloruro de clorilo, perclorato de uranilo, trióxido de cromo, nitrato de fluor, difluoruro de dióxígeno, hexafluoruro de uranio, heptafluoruro de yodo, tetraclorosilano, ácido permangánico, ácido nítrico, peróxido de hidrógeno, ácido peroxodisulfúrico, dióxido de potasio, peróxido de sodio, permanganato de potasio, óxido de rutenio (VIII), platino, potasio, t-butóxido de potasio, óxido de plata y sodio. En general, es incompatible con ácidos, cloruros de ácido y metales alcalinos.
- Usos: el etanol es usado en la fabricación de medicamentos, plásticos, lacas, plastificantes y cosméticos; también se utiliza en mezclas anticongelantes, como combustible, antiséptico en cirugía, como materia prima en síntesis y en la preservación de especímenes fisiológicos y patológicos. Productos comerciales que contienen alcohol incluyen; bebidas, disolventes para perfumes, colonias; líquidos medicinales, enjuagues bucales. El etanol se utiliza industrialmente para la obtención de acetaldehído, vinagre, butadieno, cloruro de etilo y nitrocelulosa, entre otros. El llamado alcohol desnaturalizado consiste en etanol al que se le agregan sustancias como metanol, isopropanol o, incluso, piridinas y benceno. Estos compuestos desnaturalizantes son altamente tóxicos por lo que, este tipo de etanol, no debe de ingerirse.
- Obtención: el etanol es un líquido incoloro, volátil, con un olor característico y sabor picante. Sus vapores son más pesados que el aire. Se obtiene, principalmente, al tratar etileno con ácido sulfúrico concentrado y posterior hidrólisis. Algunas alternativas de síntesis son: hidratación directa de etileno en presencia de ácido fosfórico a temperaturas y presiones altas y por el método Fischer-Tropsch, el cual consiste en la hidrogenación catalítica de monóxido de carbono, también a temperaturas y presiones altas. De manera natural, se obtiene a través de fermentación, por medio de levaduras a partir de frutas, caña de azúcar, maíz, cebada, sorgo, papas y arroz entre otros, generando las variadas bebidas alcohólicas que existen en el mundo. Después de la fermentación puede llevarse a cabo una destilación para obtener un producto con una mayor cantidad de alcohol.¹⁷

Propiedades Farmacológicas

Farmacocinética

- Absorción

La mayoría de las intoxicaciones por el alcohol se producen por vía digestiva. El alcohol se absorbe en un 20-30% en el estómago y el resto, en el intestino delgado; en el duodeno principalmente. Todo el alcohol que se ingiere es absorbido; no encontrándose nada del mismo en las heces.

Cuando el estómago está vacío, la absorción es mayor; al aumentar la superficie de mucosa gástrica disponible; la presencia de alimentos en el estómago, en especial de proteínas retrasa la absorción.

El grado alcohólico y, por tanto, la concentración de alcohol favorecen la absorción: las bebidas fuertemente alcohólicas se absorben con mayor rapidez que las débiles; esto se modifica cuando las bebidas muy alcohólicas producen un espasmo del píloro y retrasan la evacuación gástrica. La máxima velocidad de difusión se alcanza con bebidas que tienen alrededor del 20 % de alcohol.

También influye el grosor de la membrana: la velocidad es inversamente proporcional al grosor de la membrana. Así, una gastritis hipertrófica (pliegues gástricos gigantes) retrasa la absorción, mientras que una atrofia de la mucosa la facilitará.

Finalmente, influye también el modo de ingerir la bebida. La misma cantidad de alcohol ingerida en una sola vez producirá una alcoholemia mayor que si se ingiere en varias veces separadas entre sí.

El etanol se introduce fácilmente por vía pulmonar y atraviesa la membrana alveolo-capilar por difusión. También teóricamente el alcohol entra por la vía cutánea.¹⁸

- Distribución y Metabolismo

Después de su absorción, el etanol se distribuye con uniformidad por todos los tejidos y líquidos del cuerpo. La placenta es permeable al etanol; por lo tanto el alcohol logra acceso libre a la circulación fetal.

Se oxida por completo una porción de 90 a 98% del etanol que entra en el cuerpo. El metabolismo del etanol difiere de la mayoría 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 en la sangre. La cantidad de etanol que se oxida por unidad de tiempo es más o menos proporcional al peso corporal y probablemente al peso del hígado. En el adulto, la tasa promedio a la que se metaboliza el etanol es de 129 mg/Kg por hora, o cerca de 30 mL en tres horas. La oxidación del etanol se produce ante todo en el hígado, iniciada sobre todo por la deshidrogenasa del etanol, que es una enzima que contiene zinc y que recurre al nicotinamida adenina dinucleótido (NAD) como aceptor de hidrógeno. El producto, acetaldehído, se convierte en acetyl-CoA, que a continuación se oxida por medio del ciclo del ácido cítrico o se emplea en las diversas regiones anabólicas que participan en la síntesis de colesterol, ácidos grasos y otros constituyentes tisulares.

El etanol se metaboliza hasta acetaldehído por acción de las oxidasas de función mixta que se encuentran en el retículo endoplásmico liso del hígado. El grado en que este sistema metaboliza al etanol en el ser humano es tal vez muy pequeño, pero su contribución se incrementa conforme lo hace la concentración de etanol, sobre todo en sujetos que consumen alcohol con regularidad.¹⁹

Alcohólicos a menudo mueren en casa, con cero o baja la tasa de alcoholemia, y nada más notable en la autopsia que un hígado graso. El aumento de la evidencia sugiere que esas muertes podrían ser causadas por una pronunciada cetoacidosis.²⁰

En condiciones normales, cerca de 2% del etanol ingerido escapa a la oxidación. En circunstancias especiales, y cuando se ha consumido una gran dosis, este valor puede llegar a 10%. Aunque se pueden identificar cantidades pequeñas de etanol en las diversas secreciones, la mayor parte del etanol que escapa a la oxidación se excreta por riñones y pulmones. En el peor de los casos, la concentración en la orina es ligeramente mayor que en la sangre, y la concentración en el aire alveolar es sólo 0.05% de la encontrada en esta última.¹⁹

- Excreción

El 95 % del alcohol se metaboliza por oxidación y un 5 % se elimina sin modificar por los distintos órganos y aparatos.¹⁸ La velocidad de eliminación en las mujeres es más rápida que en los hombres; las diferencias de género en la farmacocinética del etanol, en parte, se explican por los niveles altos de progesterona.²¹

Eliminación urinaria

El alcohol difunde a través del glomérulo y no sufre proceso de reabsorción tubular. La concentración de alcohol en la orina dependerá de la alcoholemia, pero ésta cambia continuamente y la de la orina no lo hace; la correlación alcoholemia/alcoholuria no es de 1, sino inferior.¹⁸

Las enfermedades renales demoran la excreción de metabolitos como el Etil Glucurónido; la eliminación no se difiere en pacientes sanos y bebedores crónicos de alcohol.²²

Eliminación pulmonar

Esta vía de excreción, posible gracias a la volatilidad del alcohol, sigue un proceso inverso al de la absorción. Como mecanismo de eliminación tiene escaso interés, pues sólo un 2-3 % del alcohol ingerido se elimina por esta vía. Pero desde el punto de vista analítico y judicial es de gran importancia, pues los métodos de análisis incruentos se basan en este principio: *determinación del alcohol presente en el aire espirado*. Se ha calculado que el alcohol presente en 2000 mL de aire espirado equivale al que hay en 1 mL de sangre arterial.

Eliminación por la saliva

El alcohol se elimina por la saliva, aunque la cantidad excretada por esta vía es ínfima; dado el volumen de secreción salival, tiene el mismo interés analítico que la orina. La concentración en saliva es ligeramente superior a la de la sangre.

Eliminación por la leche

El alcohol se elimina asimismo por esta secreción, lo que debe ser tenido en cuenta por las madres lactantes.¹⁸

Farmacodinamia

A menudo las bebidas alcohólicas se les considera como estimulantes, pero el etanol es un depresor del Sistema Nervioso Central. Aunque pruebas sugieren que las concentraciones bajas de etanol pueden incrementar la función de sinapsis neurales excitadoras, la estimulación aparente es resultado, de depresión de los mecanismos inhibidores de control en el cerebro. Los primeros procesos mentales que se afectan son los que dependen de la capacitación y experiencia previa, ya que se debilitan; a continuación, se pierde la memoria, concentración e intuición. Sobreviene exceso de confianza, la personalidad se vuelve efusiva, vivaz y se hacen evidentes cambios incontrolados del estado de ánimo. Estos cambios psicológicos concurren con trastornos sensoriales y motores. Cuando la intoxicación es más grave, sobreviene un trastorno general de la función nerviosa; generando por último un estado de anestesia general. Sin embargo, hay poco margen entre la dosis anestésica quirúrgica completa y aquella a la cual se pone en peligro la respiración.¹⁹

Tabla 3.1 Síntomas característicos de comportamiento en función de la concentración de alcohol en el organismo.⁷

Efectos Farmacológicos del Etanol	
10-50mg/dL	No hay influencia aparente, conducta casi normal por observación ordinaria. Pruebas especiales revelan pequeños trastornos sub-clínicos.
50-100mg/dL	Euforia, menos inhibiciones y más aparente confianza en sí mismo. Sociabilidad, desarrollo de conversación, aumento de las confianzas, disminución de atención, control y respuesta a los estímulos. Inestabilidad emocional. Las reacciones se retardan en el 35% de la gente.
100-200mg/dL	Mucha gente sufre grandes cambios: mala memoria y comprensión, confusiones, incapacidad de juicios críticos y de manejar automóviles. Equivale en promedio a beber 170mL-207mL de Whisky ó 6-7 botellas de cerveza.
200-250mg/dL	Mala respuesta motora, dificultad en percibir color, forma, movimiento y dimensiones, desorientación, confusión: pérdida de inhibiciones, peleas sentimentales, irrazonables, vértigo, temor, cólera, pesadumbre, descuido en la seguridad personal, paso tambaleante, habla balbuciente.
250-300mg/dL	Intoxicación aguda, embriaguez, diplopía (ver los objetos dobles), leguaje cortado, el comportamiento perturba la tranquilidad y la seguridad pública.
300-400mg/dL	Apatía, inercia general, insensibilidad, temblores, cese de movimientos automáticos, sudoración, dilatación de capilares superficiales, incapacidad de ponerse en pie o caminar, vómito, incontinencia de orinar y heces, somnolencia, comienzo de parálisis, empeora el estado consciente, estupor, coma.
400-500mg/dL	Arreflexia o hiporreflexia, hipotermia, inconsciencia, coma en la mayoría de los casos, disnea, colapso circulatorio, shock, posible muerte por parálisis respiratoria.
500mg/dL	Límite letal.

Recolección, Embalaje y Almacenamiento de Muestras

El éxito de un análisis de sustancias tóxicas está ligado a la calidad, cantidad, embalaje y medidas de conservación de las distintas muestras que se remitan.

Los objetivos principales del análisis químico de fluidos biológicos son:

1. Determinar la presencia de sustancias tóxicas en las muestras biológicas.
2. Identificar el tipo de tóxico y la concentración que está presente en el fluido biológico.
3. Darle una respuesta clara y precisa a los órganos procuradores de justicia, referente a la sustancia encontrada.

Se remitirán en cantidad suficiente los fluidos biológicos para poder llevar a cabo los análisis pertinentes y poder conservar, si así se requiere una muestra en retención para posteriores comprobaciones.

Toma de Muestra

Muestras procedentes de personas vivas

Es recomendable lo siguiente para su conservación:

Para Sangre total sin coagular

- Anticoagulante. Dos gotas de heparina o de solución al 10 % de fluoruro sódico o EDTA por cada 5 mL de sangre.
- Se requiere como mínimo 20 mL para el análisis toxicológico y la posterior confirmación y cuantificación del tóxico.

Para orina

- No debe añadirse ningún conservador o en todo caso, azida sódica al 1 % p/v y conservar en refrigeración.
- Se requiere un mínimo de 50 mL para el análisis general de tóxicos y posibles determinaciones especiales. En general no se requiere orina de 24 hrs. Las muestras se verterán en recipientes de tamaño adecuado, perfectamente limpios, secos, cerrados herméticamente y plenamente identificados.

Se debe tomar en cuenta que la toma de sangre por punción, es una medida que tendría que usarse como un último recurso para dicha determinación.

Las medidas de seguridad así como los procesos para la toma de muestras biológicas, se tendrán que realizar apegados al ámbito de derecho, evitando a toda costa trasgredir los derechos de la persona a la que se le realizará dicho estudio.

Muestras procedentes de autopsia

En los casos en que se desconoce total o parcialmente la naturaleza u origen de la sustancia tóxica a analizar, se pueden analizar las siguientes muestras biológicas:

- Contenido gástrico, vómito, los lavados gástricos ó alimentos.
- Por lo menos aproximadamente 50 mL de sangre.
- Orina toda la que sea posible extraer.¹⁸

Debido a la falta de disponibilidad de muestras de sangre para análisis toxicológicos o incluso muestras contaminadas, se ha estudiado la posibilidad de encontrar otros sitios de muestreo, tales como el humor vítreo para el análisis de etanol. El humor vítreo es considerado como una alternativa a la muestra de orina y sangre, para la determinación de la concentración de etanol en un cadáver.²³

Muestras procedentes de exhumación

En caso de que la inhumación haya sido reciente y las vísceras aún se encuentren reconocibles se toman muestras como en el caso de muestras procedentes de autopsia.

Si ha transcurrido un tiempo prolongado desde la muerte e inhumación, el proceso de descomposición cadavérica será muy avanzado; en tal caso se recogen en frascos separados los restos aún visibles de las distintas vísceras.

Aun cuando haya tenido lugar la esqueletización del cadáver, la investigación de los venenos minerales puede dar resultados positivos; a este fin se recogerán para el análisis el cráneo, cinco o seis vértebras, una tibia, un fémur y un hueso ilíaco.

Es también aconsejable remitir muestras de los revestimientos del ataúd; la tierra que cubre y rodea el cadáver y ataúd (100 g de la tierra de encima y 100 g de la de abajo), a fin de descartar posibles resultados falsos negativos o falsos positivos por pérdida del tóxico o contaminación de las vísceras.

Embalaje

Envasado y conservación de muestras

Todas las muestras deben ser embaladas en recipientes de ser posible usados una sola vez, para evitar la contaminación; de no ser así, deben estar perfectamente limpios y secos.

Las muestras líquidas como: sangre, orina deben recogerse en tubos o envases de vidrio o plástico, de tamaño adecuado, perfectamente limpios, secos y cerrados herméticamente.

Para emplear frascos ya utilizados anteriormente, deben lavarse de manera exhaustiva

Todos los recipientes deberán ser remitidos dentro de un contenedor impermeable, cerrado herméticamente, sin que se ejerza presión entre ó sobre ellos.

Debe evitarse el uso de tapones de goma o material similar, ya que pueden absorber algunas sustancias o contaminar las muestras.

Las muestras sólidas: hígado, riñón; se colocan en envases de plástico provistos de boca ancha. El tamaño del recipiente debe estar en proporción con el de la muestra con el objetivo de que el recipiente quede lleno. Esto tiene la doble finalidad de evitar la pérdida de componentes volátiles y reducir al mínimo la oxidación de los tóxicos por el oxígeno atmosférico. Las tapaderas deben cerrar siempre herméticamente y los recipientes, ir correctamente etiquetados. En la etiqueta debe indicarse en forma visible si existe alguna

circunstancia especial que haya que tenerse en cuenta para la manipulación de las muestras, como alguna enfermedad; hepatitis A, B, SIDA, tuberculosis.

Las muestras destinadas al análisis toxicológico no deben contener conservadores que interfieran en el análisis posterior. Los conservadores ideales son la azida sódica al 0,1 % p/v o el fluoruro sódico al 1 % p/v; si se requiere un anticoagulante, el más recomendable es el oxalato potásico al 0,5 % p/v. No se utilizará ninguno de ellos cuando se sospeche de una intoxicación por oxalato, fluoruro o azida.¹⁸ Con la adición de Fluoruro de Sodio al 1% no se encuentra aumento significativo en muestras de sangre y tejido; aun conservando las muestras a 4°C y 25°C.²⁴

Descomposición química y biológica

El tóxico presente en una muestra biológica puede descomponerse durante el almacenamiento, por lo que ya no será detectado en el análisis. Este hecho es importante cuando no se conoce la identidad o no se sabe si realmente existe algún tóxico en la muestra. Son muchos los tóxicos que pueden descomponerse durante el almacenamiento de las muestras de sangre o hígado a 4°C. Entre ellos se pueden citar a las benzodiazepinas; clonazepam, nitrazepam, triazolam; cocaína, isoniacida, lisergida, metadona, metilfenidato, morfina, paracetamol, procaína.

- Luz

Algunas sustancias tóxicas como los alcaloides del cornezuelo del centeno y las fenotiazinas son fotosensibles.

Aunque muestras sólidas como hígado u opacas en el caso de la sangre suelen estar protegidas, también debe evitarse su contacto con la luz. Para las muestras de orina y las soluciones acuosas de tóxicos fotosensibles se recomienda cubrir con papel de aluminio los envases e incluso los recipientes utilizados durante el análisis.

- Oxidación

Para aquellos compuestos fácilmente oxidables como las catecolaminas, ó tiobarbitúricos, los envases deben estar llenos y perfectamente cerrados para excluir el oxígeno atmosférico. Se pueden adicionar antioxidantes como ácido ascórbico o metabisulfito sódico al 1 % p/v para eliminar el oxígeno de la solución, pero estos agentes pueden reducir los metabolitos oxidados de algunos tóxicos presentes en la orina transformándolos de nuevo en sus productos originales como las fenotiazinas, antidepresivos tricíclicos y algunos antihistamínicos. Los compuestos fenólicos como el paracetamol ó la morfina se oxidan fácilmente a 4 °C y aquellos que contienen azufre son también oxidados *in vitro* en medio alcalino. Así, el tiopental puede convertirse en pentobarbital durante la reextracción de un disolvente orgánico en una solución acuosa básica y, además, oxidarse rápidamente a temperatura ambiente, tanto en soluciones acuosas como en orgánicas.

Un factor importante en los procesos oxidativos es la presencia de iones metálicos que actúan como catalizadores. El efecto de los iones puede disminuirse adicionando una proteína, como la seroalbúmina bovina. Por esto, algunos compuestos lábiles son más estables en plasma que en soluciones acuosas.

- Hidrólisis

Muchos tóxicos son ésteres como los anestésicos locales, diacetilmorfina o heroína que son fácilmente hidrolizados durante el almacenamiento a temperatura ambiente e incluso a bajas temperaturas por las esterasas presentes en la sangre y tejidos. De la misma manera, el pH alcalino durante la extracción puede promover la hidrólisis de algunos compuestos. La actividad de las esterasas se puede contrarrestar con la adición de fluoruro sódico al 1 % p/v. La hidrólisis de los ésteres puede también reducirse llevando el pH de la muestra por debajo de 4.

Un ejemplo muy característico en cuanto a la descomposición por hidrólisis es la cocaína. En sangre o plasma la cocaína es hidrolizada rápidamente a benzoilecgonina por la colinesterasa. Una muestra de sangre que contenga 1 mg/L de cocaína pierde el 100 % de dicho compuesto en 21 días, si no se añade un conservador. Una pérdida semejante se ha observado en tejidos *post mortem*. La extracción de cocaína de una solución alcalina con pH > 8 tiene las mismas consecuencias.

- Temperatura

Las bajas temperaturas favorecen la conservación de las muestras para el análisis toxicológico. En términos generales se recomienda almacenar las muestras a 4°C, siempre que vayan a ser analizadas en pocos días. Si van a almacenarse por más tiempo, deben congelarse a -20°C, teniendo la precaución de descongelarlas una sola vez antes de ser analizadas.

Durante la congelación y descongelación puede producirse la reducción de ciertos metabolitos como los sulfóxidos, N-óxidos formados durante el metabolismo de las fenotiacinas, con lo que habrá diferencias importantes entre la concentración inicial del tóxico y la hallada en el análisis efectuado tras congelar y descongelar. Si las muestras se guardaran durante mucho tiempo, es recomendable la liofilización, sobre todo en el caso de muestras que vayan a ser usadas como patrones.¹⁸

Es importante tomar en cuenta todas las características de embalaje, ya que las muestras enviadas al Laboratorio de Química Forense se utilizan para la determinación de alcohol y también la de metabolitos de drogas de abuso.

Técnicas para la determinación de alcohol

Técnicas Presuntivas ó químicas

Las pruebas presuntivas son las que por medio de reacciones principalmente coloridas ó de precipitación indican la presencia de una sustancia ó compuesto; estas pruebas son de carácter cualitativo ya que sólo se encargan de demostrar alguna propiedad como grupo funcional o reactividad de la sustancia a identificar.

Una prueba presuntiva para la identificación de alcohol etílico es:

- Mezclar cinco gotas de la muestra en un pequeño vaso con 1 mL de solución acuosa de permanganato de potasio (1 en 100) y cinco gotas de solución de ácido sulfúrico 2 N, tapar el vaso inmediatamente con un papel filtro humedecido con una solución de nitroferrocianuro de sodio-piperazinada; la cual se prepara con 100 mg de nitroferrocianuro de sodio y 250 mg de piperazina en 5 mL de agua. Se produce un intenso color azul sobre el papel filtro, el color empieza a desaparecer después de algunos minutos.

Otra prueba presuntiva para la identificación de alcohol etílico es:

- A 5 mL de una solución 1 en 10 de la muestra, agregar 1 mL de solución de hidróxido de sodio 1 N, agitar y adicionar lentamente (en aproximadamente 3 min) 2 mL de solución de yodo 0,1 N. Se desarrollará un olor a yodoformo y se forma un precipitado amarillo después de 30 min.¹²

Técnicas Confirmativas o Instrumentales

Las técnicas confirmativas tienen como finalidad proporcionar un dato claro y cuantificable de la sustancia a analizar; ya que estas se encargan de identificar directamente al elemento ó compuesto y no sólo se ocupan de algún grupo funcional o las propiedades reactivas.

Son de carácter cuantitativo como las técnicas analíticas instrumentales: cromatografía de líquidos de alta resolución HPLC, la cromatografía de gases, espectrofotometría Ultravioleta-visible ó Espectrometría Infrarrojo; en casos especialmente complejos se puede recurrir a la espectrofotometría de masas.

Prueba del alcoholímetro

Desde un punto de vista práctico, la idea de sacar sangre de una vena para examinar a los sospechosos de estar bajo la influencia del alcohol simplemente no provee un método conveniente para monitorear conductores alcohólicos, en virtud de que este es un método invasivo. Se puede transportar a un sospechoso a un lugar donde personal médico calificado pueda realizar exámenes empleando pruebas de aliento; ya que estas tienen un propósito útil y se obtienen resultados rápidos y precisos.¹¹ Es posible determinar la tasa de eliminación por hora, de la concentración de alcohol; ya que el tiempo que transcurre entre los hechos y la medición de alcohol, muestra una variación de la concentración en los valores obtenidos con el alcoholímetro.²⁵

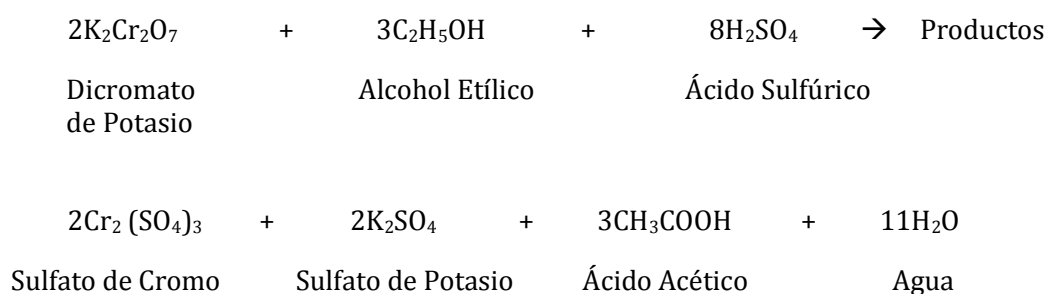
El alcoholímetro es un dispositivo para recolectar y medir el contenido de alcohol en el aliento alveolar. Básicamente, existen diferentes tipos de alcoholímetro uno de ellos es un espectrofotómetro que ha sido diseñado especialmente para medir la absorción de la luz que pasa a través de una solución de dicromato de potasio a una longitud de onda.

Se le pide al sujeto que sopla por la boquilla que lleva un cilindro de metal. Como el individuo está soplando, la presión del aire exhalado levanta el émbolo a una altura que expone dos agujeros de ventilación en la parte superior de un cilindro calentado. Cuando el último aliento ha sido expirado, el pistón baja a una posición predeterminada, cubriendo los agujeros de ventilación y captura de la última porción de aire alveolar en el cilindro. La cantidad de aliento colectado de esta manera es 52.5 mL, o 1/40 de 2,100 mL. Se sabe que la cantidad de alcohol contenido en 2,100 mL de aliento alveolar es aproximada a la que hay en 1 mL de sangre. Por lo tanto, el alcoholímetro está diseñado para medir la concentración de alcohol presente en 1/40 mL de sangre.

Cuando se presiona la posición analizar, el émbolo baja, causando que la muestra de aire quede atrapada en un compartimento de vidrio que contiene dicromato de potasio al 0.025%

y nitrato de plata al 0.025 en ácido sulfúrico y agua. Cualquier alcohol presente en el aliento inmediatamente es disuelto en la solución de dicromato y es oxidado hasta ácido acético. En el proceso de oxidación, el dicromato de potasio también reacciona. Esta reacción es medida por el alcoholímetro y relacionada con la cantidad de alcohol que pasó al compartimento de vidrio.

Esta ecuación representa la reacción química que se lleva a cabo en el compartimento de vidrio.



Siempre hay una relación fija entre el número de moléculas de dicromato de potasio que reaccionan con el alcohol. Por lo tanto, mediante la determinación de la cantidad de dicromato de potasio consumido, se tiene determina la cantidad de alcohol presente. El nitrato de plata presente sólo sirve como catalizador acelerando la reacción sin sufrir cambios.

De acuerdo a la ley de Beer, la cantidad de luz absorbida por el dicromato de potasio es directamente proporcional a la concentración de alcohol. El alcoholímetro determina indirectamente la cantidad de alcohol consumido por la medición de la absorción de luz por el dicromato de potasio antes y después de su reacción con el alcohol.

Cromatografía de Gases

La cromatografía de gases es una técnica que está aceptada y recomendada para la determinación y cuantificación de alcohol en sangre. Cuando las condiciones de cromatografía de gases se utilizan adecuadamente, el alcohol puede ser separado de otros compuestos volátiles presentes en la sangre. Por la comparación del área de picos de alcohol con unos obtenidos con estándares conocidos de alcohol en sangre, el investigador puede calcular los niveles de alcohol con un alto grado de precisión.

Cuantificación Enzimática

Otro de los procedimientos desarrollados para el análisis de alcohol implica la oxidación del alcohol en acetaldehído. Esta reacción es llevada a cabo en presencia de la enzima alcohol deshidrogenasa y una coenzima nicotinamida adenina dinucleotido (NAD). Como en el proceso de oxidación, la NAD es convertida en otra especie química, NADH. La medida de esta conversión se obtiene espectrofotométricamente y es relacionada con la concentración de alcohol.¹¹

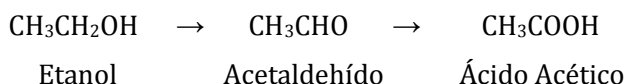
Reacción de Etanol con Dicromato de Potasio

Para saber si una reacción redox ocurre, es necesario sumar los potenciales de las semirreacciones que constituyen el proceso global, y si $E^\circ > 0$, entonces la reacción es posible.²⁶

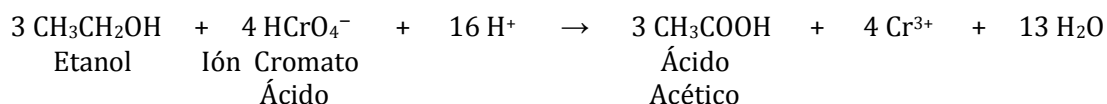
CH_3COOH	$\text{CH}_3\text{CH=O}$	Cr^{6+}	→ E°
-0.12	0.19	1.33	
$\text{CH}_3\text{CH=O}$	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$	Cr^{3+}	

$$E^\circ = 1.33 + 0.19 - 0.12$$

$$E^\circ = 1.4$$



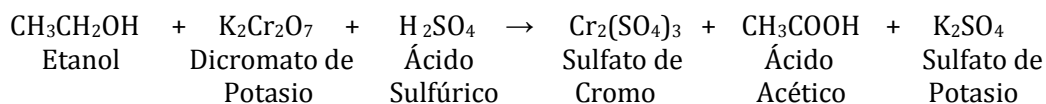
La reacción se lleva a cabo en dos etapas; primero el etanol se oxida a acetaldehído, para posteriormente oxidarse hasta ácido acético.



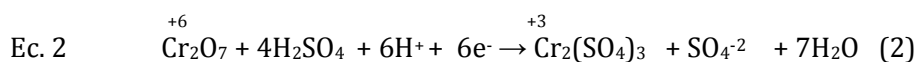
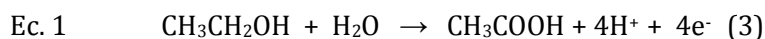
El ion HCrO_4^- cromato ácido está en equilibrio en medio ácido con el ion dicromato $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ según la siguiente reacción:



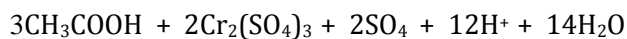
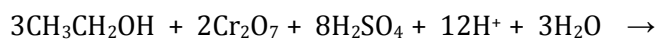
En ésta reacción el equilibrio químico se alcanza muy rápidamente; por lo tanto es indistinto emplear cromato ácido o dicromato como reactivo, ya que en este último caso el cromato ácido necesario para oxidar el etanol se obtendrá de inmediato a partir de la hidrólisis del dicromato. La concentración de cromato es en todo momento igual a la concentración del dicromato.²⁶

Balaneo de la Reacción

Se divide en semirreacciones y se balancea cada una sumando protones y H₂O para obtener la misma cantidad de H⁺ y O.



Se multiplican por 3 y por 2 para tener el mismo número de electrones en ambas ecuaciones.



Se restan los protones H⁺ y H₂O.



Se escribe K⁺ y así se obtiene la ecuación molecular balanceada.



Factores que Afectan a la Reacción

En algunos casos se desconoce con certeza el dato exacto de la hora de la muerte, lo cual trae cierto tipo de consecuencias, desde el momento en que se suscita el fallecimiento hasta el momento de realizar la necropsia de ley, existen variantes, que como analistas no se pueden controlar y por consiguiente, se pueden expresar como falsos positivos o falsos negativos. Los cambios *post mortem* que afectan la concentración de los tóxicos son de naturaleza física, química y bioquímica; están representados en el cadáver por los fenómenos de putrefacción, metabolismo *post mortem* y re-distribución *post mortem*, cuyo efecto será:

- Degradación del tóxico.
- Producción *in situ* del tóxico.
- Producción de sustancias que pueden confundirse con algunos tóxicos y/o interferir en el análisis.
- Modificación del equilibrio entre la sangre y los tejidos.

Cambios a Causa de la Putrefacción

La putrefacción es el resultado de la actividad bacteriana en el cadáver. Las bacterias proceden principalmente del propio cuerpo e invaden el organismo desde el intestino vía ganglios linfáticos y vasos sanguíneos; se trata de la flora bacteriana normalmente existente en el intestino, además de otros organismos procedentes del medio externo.

El proceso de putrefacción es una degradación anaerobia que incluye hidrólisis de carbohidratos, proteínas y grasas. También se originan muchos compuestos orgánicos sencillos incluyendo ácidos grasos y alcoholes. A medida que avanza la descomposición se facilita el acceso del oxígeno haciendo que ciertos microorganismos aerobios intervengan e incluso desplacen a los anaerobios.

Sin embargo, los microorganismos que existen en vida no aumentan en las primeras 48 horas posteriores a la muerte. Las razones para esta conservación en un primer período serían dos: control del desarrollo de los microorganismos por las defensas naturales del organismo que permanecen activas un cierto tiempo tras la muerte y el efecto de las bajas temperaturas que retrasa el desarrollo de los microorganismos. Son muchos los microorganismos que pueden participar en la putrefacción, destacando los siguientes: *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus mesentericus* y *Micrococcus albus*, considerándose que el más importante de todos ellos es *Clostridium perfringens*; la cuál es una bacteria anaerobia Gram positiva formadora de esporas, se encuentra en el intestino humano, en el agua, aire y es la causante de la gangrena gaseosa.

El proceso de putrefacción tiene varias consecuencias importantes desde el punto de vista de la interpretación de resultados toxicológicos.

1. Generación de sustancias volátiles
2. Generación de bases
3. Deshidratación.
4. Degradación de tóxicos.

1. Generación de sustancias volátiles. La putrefacción tiene como consecuencia la producción de sustancias volátiles siendo las más frecuentes: etanol, acetaldehído, acetona, l-propanol y l-butanol. Otros compuestos volátiles menos comunes son: 2-propanol, 2-butanol e isobutanol. Puesto que la producción de sustancias volátiles es un proceso anaeróbico, es presumible que los tejidos más profundos tengan mayor capacidad para dicho proceso.

Los microorganismos procedentes del intestino o del medio externo se dispersan por todo el organismo siendo responsables de la producción de etanol y muchos otros compuestos volátiles por fermentación.

El principal problema es establecer si la cantidad de alcohol presente en una muestra putrefacta se debe a la ingestión o a la producción *post mortem*, especialmente cuando se trata de cifras no muy elevadas. También puede haber problemas en los resultados analíticos si se utilizan técnicas poco específicas para la determinación de alcohol en dichas muestras como los métodos químicos.

2. Generación de bases. Además de los productos volátiles, en el curso de la putrefacción se genera una considerable cantidad de productos básicos que presentan propiedades químicas similares a las de algunos tóxicos y que pueden falsear los resultados analíticos, interfiriendo en la separación e identificación de aquéllos. Un ejemplo es la 3-fenetilamina, compuesto de gran parecido con las anfetaminas con las que puede confundirse fácilmente en el análisis por cromatografía en capa fina.

3. Deshidratación. Este fenómeno que acompaña al proceso de descomposición del cadáver es importante en la interpretación de resultados. Cuando ha ocurrido dicho proceso, la concentración aparente del tóxico puede ser 2 o 3 veces mayor que la concentración real existente en el momento de la muerte, debido a la pérdida de peso que acompaña al fenómeno de deshidratación y manera en que normalmente se expresan los resultados analíticos.

4. Degradación de tóxicos. Si durante el proceso de putrefacción hay un desarrollo extraordinario de la flora microbiana normalmente presente en el intestino, aquellos tóxicos susceptibles de sufrir en su metabolización procesos de reducción o hidrólisis podrán en tales circunstancias seguir degradándose tras la muerte y a medida que avanza el proceso de putrefacción. Es obvio que no todos los tóxicos sufrirán degradación *post mortem*, proceso que dependerá de su estructura química y metabolismo.

El metabolismo *post mortem* no sólo incluye la acción de microorganismos (reducción, hidrólisis) sino también la acción de enzimas que seguirán actuando sobre los tóxicos tras la muerte.

Fuentes generadoras del grupo OH

La putrefacción causada por microorganismos ejerce efectos muy importantes en la conservación de muestras destinadas al análisis toxicológico. Algunos tóxicos pueden ser destruidos por la actividad microbiana y, por el contrario, también se pueden generar sustancias como alcohol, sulfuro de hidrógeno y ácido cianhídrico, que dificultan la interpretación de un resultado analítico.

Para obtener un resultado fiable y distinguir entre la producción de alcohol ante y post mortem se tendrían que tomar varias muestras de sangre en diferentes sitios, así como del corazón derecho e izquierdo. Cada muestra se dividiría en dos partes, una de las cuales se guardaría con fluoruro Sódico al 1 %. Si las muestras sin conservador y con él tienen concentraciones diferentes, será debido a la producción o destrucción de alcohol por los microorganismos en la sangre. Si en ambas muestras se obtiene el mismo resultado, se descarta la influencia de la putrefacción.

Los restos de alimentos presentes en el estómago de un cadáver se fermentan y producen alcohol que después se difunde a los tejidos circundantes del tracto gastrointestinal. Un intenso olor a fermentación al abrir el estómago sugiere que se ha ingerido una gran cantidad de alcohol antes de la muerte, aunque esto es una indicación poco fiable de la cantidad realmente ingerida. También puede formarse una pequeña cantidad de alcohol tras la muerte si se inhaló acetato de etilo, ya que este compuesto es hidrolizado rápidamente a alcohol y ácido acético.

Se ha considerado que la glucosa de una muestra de sangre es convertida a alcohol; sin embargo, este hecho parece poco probable, ya que en realidad el contenido de glucosa de una muestra sanguínea sin conservadores desaparece en unas pocas horas, mientras que la producción de alcohol post mortem requiere un mínimo de varios días, así como la presencia de microorganismos en cantidad suficiente.

Degradantes del grupo OH

Además de la posibilidad de generación post mortem, también es posible la degradación del alcohol presente en sangre y tejidos. Dicha pérdida se origina por mecanismos químicos o bioquímicos. Así, en recipientes perfectamente sellados la concentración de alcohol, puede disminuir por un proceso de oxidación a acetaldehído y ácido acético, dependiente de la temperatura, que ocurre dentro de los eritrocitos con el concurso de la oxihemoglobina y metahemoglobina. Parece ser que, el aire presente en el recipiente influye en el proceso de oxidación química del etanol, ya que puede originar oxihemoglobina la cual posteriormente cataliza la oxidación del etanol; por lo que se recomienda llenar completamente los frascos que contengan muestras de sangre para alcoholemia.

En muestras de orina las pérdidas de etanol son menores que en sangre, probablemente porque en dicha muestra no existe ese mecanismo de oxidación mediado por los eritrocitos. En este caso la pérdida puede ser debida a la volatilización.

Existe también un mecanismo bioquímico mediado por microorganismos que lleva a la pérdida de etanol. Muchos microorganismos son capaces de utilizar etanol como fuente de energía. No obstante, el efecto sobre la concentración de alcohol no parece ser muy importante a no ser que exista una gran proliferación de dichos microorganismos. Si bien en muestras de orina y sangre procedentes de un sujeto vivo y conservadas adecuadamente las pérdidas son inapreciables, este hecho tiene importancia en el proceso de putrefacción cuando aumenta extraordinariamente el número de microorganismos; en tal caso las pérdidas pueden ser importantes. Aunque en principio parece tratarse de un proceso aeróbico bastante raro en recipientes completamente llenos, existen también mecanismos anaeróbicos por los cuales es utilizado el etanol como en la síntesis de ácidos grasos por el género *Clostridium* en la putrefacción.

Variaciones Post Mortem del Alcohol

1. Difusión pasiva. Está suficientemente probado que el alcohol puede difundir pasivamente post mortem desde el estómago y el intestino a los órganos y tejidos circundantes. Si la concentración de alcohol en el estómago es superior a 500 mg/dL, quiere decir que la muerte sobrevino momentos después de la ingestión, cuando aún estaba en la primera fase de absorción. Ese alcohol puede difundir al líquido pericárdico, líquido pleural y, posiblemente, a la bilis, así como a la cavidad peritoneal. En cambio, es prácticamente imposible que llegue a las cavidades cardíacas. El problema del grado real de impregnación alcohólica se resuelve analizando las concentraciones de alcohol en humor vítreo y en orina, que en este caso siempre serán inferiores a la concentración encontrada en el ventrículo derecho.

2. *Alteración post mortem*. La alcoholemia real del individuo, es decir, aquella que refleja la cantidad de alcohol absorbido, puede sufrir diversos procesos que conducen a una alteración de la concentración y, por tanto, a un error en el análisis. Se pueden presentar dos situaciones: pérdida de alcohol y ganancia de alcohol.

a) *Pérdida de alcohol*. La pérdida puede tener un mecanismo físico: la evaporación. Se produce cuando el almacenamiento no es correcto y se deja un espacio libre entre el nivel de la sangre en el tubo y el tapón. El alcohol pasa a la cámara de aire y si no se tiene la precaución de invertir el tubo varias veces, con suavidad, se escapará al abrirlo.

También se puede perder por oxidación microbiana, tanto aerobia como anaerobia, aunque es mayor en el primer caso. Por todo ello, en los viales que contienen el alcohol para su remisión al laboratorio no se debe dejar ninguna cámara de aire y añadir un inhibidor microbiano.

b) *Ganancia de alcohol*. El alcohol producido *post mortem*, denominado endógeno, es alcohol etílico idéntico al de origen exógeno. No hay ningún método analítico, por tanto, capaz de diferenciarlos, debiendo recurrir para ello a métodos indirectos. El alcohol endógeno se forma por los microorganismos, a partir de la glucosa fundamentalmente. Deben, por tanto, coexistir ambos elementos. La sangre cardíaca es la que contiene más glucosa y donde la bacteriemia es mayor, por lo que será éste el lugar donde se forma más alcohol. Por el contrario, la orina y el humor vítreo tienen poca glucosa (cero gramos a partir de las 15 horas de la muerte) y la contaminación bacteriana es escasa. Por lo anterior, un método válido para reconocer el origen endógeno del alcohol es comparar los niveles de éste en los tres compartimentos. La presencia de cantidades moderadas (menos de 0,8 g/1.000 mL) en la sangre cardíaca y la ausencia en el humor vítreo y la orina indican el carácter endógeno del alcohol, siempre que no haya alcohol en el estómago, pues también podría ser que el sujeto hubiera fallecido en la primera fase de absorción.

La presencia de alcohol en todas las muestras indica un origen exógeno. Cuando sólo se dispone de una muestra para el análisis, es muy difícil sacar conclusiones en los casos de una putrefacción ya iniciada. Otro método para la distinción entre el alcohol endógeno y el exógeno es investigar simultáneamente la presencia de otro alcohol, el propanol, que normalmente se produce en el proceso de putrefacción. A favor del carácter endógeno habla el hecho de que la concentración en el músculo de propanol sea un 10 % mayor que la de etanol.

La ganancia puede proceder también de una contaminación de los envases o de errores cometidos en el momento de la toma; en ambos casos la sangre puede contaminarse por otros fluidos más ricos en alcohol: contenido gástrico, líquido cefalorraquídeo, líquido pleural o pericárdico, etc.

3. *Preservación de la muestra*. La muestra de sangre debe ser recogida en un envase de vidrio, con agujas y material estériles; se llena el envase por completo y se adiciona fluoruro sódico y oxalato como anticoagulante. El fluoruro se ha mostrado como el más eficaz inhibidor de las enzimas catalíticas e incluso como bactericida. La sangre debe almacenarse en refrigeración a -20°C.¹⁸

Espectrofotometría UV-Visible

La espectrofotometría se refiere a métodos cuantitativos de análisis químico que utilizan la luz para medir la concentración de las sustancias químicas. Se conocen como métodos espectrofotométricos y, según sea la radiación utilizada, como espectrofotometría de absorción visible (colorimetría), ultravioleta, infrarroja.

Espectrofotómetro Ultravioleta-Visible

El espectrofotómetro UV-Visible mide la intensidad de luz que pasa a través de una muestra (I), y la compara con la intensidad de luz antes de pasar a través de la muestra (I₀). La relación I / I₀ se llama transmitancia, y se expresa habitualmente como un porcentaje (%T). La absorbancia (A) se basa en la transmisión:

$$A = -\log (\%T)$$

Las partes básicas de un espectrofotómetro son una fuente de luz (a menudo una bombilla incandescente para las longitudes de onda visibles, o una lámpara de arco de deuterio en el ultravioleta), un soporte para la muestra, una rejilla de difracción o monocromador para separar las diferentes longitudes de onda de la luz y un detector. El detector suele ser un fotodiodo. Los fotodiodos se usan con monocromadores, que filtran la luz de modo que una sola longitud de onda alcanza el detector.

Las muestras se colocan en una celda transparente, conocida como cubeta. Las cubetas suelen ser rectangulares, con longitud interior de 1 cm; b, en la Ley de Beer-Lambert. También se pueden usar tubos de ensayo como cubetas en algunos instrumentos. El cristal y la mayoría de los plásticos absorben en el UV, lo que limita su utilidad para longitudes de onda visibles.

Componentes del Espectrofotómetro UV-Visible

- Fuente de luz: Debe cumplir con las condiciones de estabilidad, direccionabilidad, distribución de energía espectral continua y larga vida. Las fuentes empleadas son lámpara de tungsteno y lámpara de deuterio.
- Monocromador: Para obtener luz monocromática, constituido por las rendijas de entrada y salida; el monocromador aísla las radiaciones de longitud de onda deseada que inciden o se reflejan desde el conjunto.

- Colimador: Es un sistema que a partir de un haz de luz divergente obtiene un haz paralelo. Sirve para homogeneizar las trayectorias o rayos que, emitidos por una fuente, salen en todas direcciones y obtiene un conjunto de rayos con las mismas propiedades.
- Celda: Contiene la disolución objeto de estudio; en el caso de luz visible se pueden usar celdas de plástico vidrio y para ultravioleta se usan celdas de cuarzo.
- Fotodetector o fotodiodo: El fotodiodo es un dispositivo que conduce una cantidad de corriente eléctrica proporcional a la cantidad de luz que lo incide o ilumina. En los instrumentos modernos se encuentra una serie de 16 fotodetectores para percibir la señal en forma simultánea en 16 longitudes de onda, cubriendo el espectro visible; esto reduce el tiempo de medida.
- Medidor o Registrador: Da la lectura de la absorbancia obtenida.²⁷

Componentes del Espectrofotómetro UV-Visible

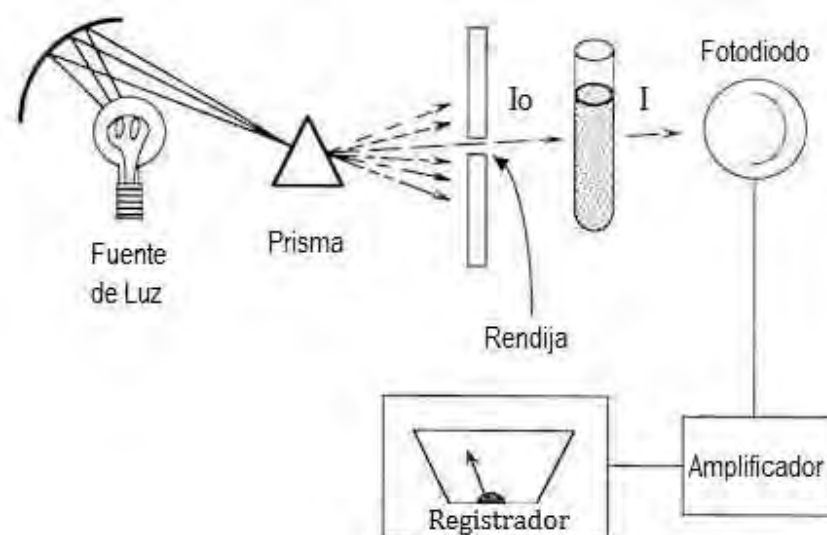


Figura 7.1 I_0 es la luz incidente y representa el 100% de la luz que golpea la celda. I es la luz transmitida. Esta es la luz que no ha sido absorbida por la solución que está en la celda y llega al fotodiodo o detector. Los fotones de la luz que llegan al fotodiodo se convertirán en energía eléctrica. Esta corriente que se ha producido es muy pequeña y debe ser amplificada antes de que pueda ser detectado de manera eficiente por el registrador. La desviación de la aguja en el Registrador es proporcional a la cantidad de luz que llegó inicialmente al fotodiodo y por lo tanto es una medida exacta de la cantidad de luz que ha pasado a través de la muestra; es decir la luz que se transmitió.²⁸

Espectrofotómetro de doble y un solo haz

Un espectrofotómetro puede ser de uno o doble haz. En un instrumento de un solo haz, toda la luz pasa a través de la célula muestra. La I_0 (inicial o lectura de blanco) debe medirse retirando la muestra.

En un instrumento de doble haz, la luz se divide en dos haces antes de llegar a la muestra. Un haz se utiliza como referencia, y el otro haz de luz pasa a través de la muestra.

En la figura 7.2 se muestra un espectrofotómetro Ultravioleta-Visible de doble haz. La luz blanca procede de una lámpara de halógeno de cuarzo y la fuente ultravioleta es una lámpara de arco de deuterio, que emite en el intervalo de 200-400 nm. Se usa una única lámpara a la vez. La red de difracción selecciona una banda estrecha de longitudes de onda, que entra en el monocromador, y éste selecciona una banda aún más estrecha, que es la que pasa a través de la muestra. Después de cortado el haz, y una vez que pasa por las cubetas de la muestra y referencia, la señal es detectada por un fotodiodo, que produce una corriente eléctrica proporcional a la potencia radiante que llega al detector.²⁹

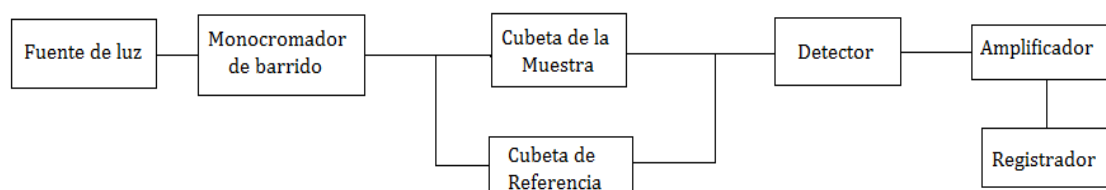


Figura 7.2. Esquema de un espectrofotómetro de doble haz. El haz incidente pasa alternadamente por las cubetas de la muestra y de referencia, gracias a la rotación del espejo del cortado.²⁹

Espectro Ultravioleta-Visible

Un espectro ultravioleta-visible es la gráfica de absorbancia o transmitancia en función de la longitud de onda; sirve para seleccionar una longitud de onda óptima con la cuál realizar una determinación.

Las longitudes de onda de los picos de absorción se correlacionan con los tipos de enlace en una determinada molécula, y son valiosos para determinar los grupos funcionales dentro de la molécula. La absorción UV-Vis no es una prueba específica para ningún compuesto determinado. La naturaleza del disolvente, el pH de la solución, la temperatura, la

concentración de electrolitos, y la presencia de sustancias interferentes pueden influir en los espectros de absorción de los compuestos.²⁷

Ley de Beer-Lambert

Bourguer, Lambert y Beer, a través de sus observaciones establecieron relaciones de la variación de la intensidad de luz transmitida por una muestra con el espesor de ella o con la concentración de la sustancia, para materiales translúcidos. Estas relaciones se conocen como la ley de Bourguer-Lambert-Beer o ley general de la espectrofotometría, que permite hallar la concentración de una especie química a partir de la medida de la intensidad de luz absorbida por la muestra.

$$A = abc$$

La absorbancia A de una solución es directamente proporcional a la concentración c del soluto absorbente.

Esta ley se puede expresar en términos de potencia de luz o de intensidad de luz, asumiendo luz monocromática, como:

$$I_t / I_0 = 10^{-e bc}$$

Donde:

I: Es la intensidad de la luz transmitida por la muestra.

I_0 : Es la intensidad de la luz que incide sobre la muestra y que proviene de la fuente.

e: Es el coeficiente de absortividad molar en unidades de $M^{-3} \cdot cm^{-1}$; su valor depende de la especie absorbente, de la longitud de onda y del disolvente.

b: Es la longitud de la trayectoria del haz de luz a través de la muestra, el espesor de la celda en cm ó paso óptico.

c: Concentración.

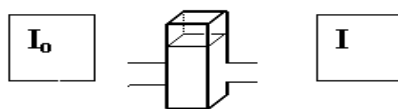


Figura 7.3 Muestra que I_0 es la intensidad que viene de la fuente de luz que incide con la muestra y da como resultado I que es la intensidad de luz transmitida por la muestra.

La relación I / I_0 se conoce como transmitancia T esta es la medida primaria que se realiza en los instrumentos para medir la absorción de luz por parte de una muestra. Si la relación se expresa en forma porcentual se llama porcentaje de transmitancia.

$$\% T = 100 (I / I_0)$$

La luz absorbida es la diferencia entre la intensidad de la luz incidente I_0 y la intensidad transmitida después de pasar a través de la muestra I .

La ley de Beer se expresa como:

$$A = abc$$

Donde:

A: Absorbancia resultante.

a: Es una constante denominada coeficiente de absorptividad molar cuyas unidades dependen de las unidades de concentración utilizadas g/L o g/100mL. Está en función de la longitud de onda, del índice de refracción de la solución y es característico de cada sistema soluto-disolvente. Es una propiedad intensiva, que no depende de la concentración de la sustancia y representa la absorción de luz por parte de un mol de soluto para una longitud de onda dada.

b: Es la longitud de la trayectoria dada en cm; espesor de la celda.

c: Es la concentración del soluto en moles / litro de solución.

Limitaciones de la Ley de Beer

- Limitaciones propias: La ley de Beer solo se cumple en disoluciones a concentraciones menores de 0.01 M, por encima de este valor la recta se curva debido a que a medida que aumenta la concentración de especies absorbentes, estas se van aproximando entre sí hasta que se dan las interacciones electrostáticas, alterando la capacidad de las especies a absorber a unas determinadas longitudes de onda. No vamos a obtener por lo tanto una relación lineal entre A y c. Los niveles de energía en los que se mueven los electrones son distintos.

Lo mismo ocurre en disoluciones de baja concentración de especies absorbentes, pero con concentraciones elevadas de otras especies como las sales interferentes; los iones de estas sales interactúan con las especies absorbentes y se modifica la capacidad de absorción. De esta manera el diagrama de energía y la capacidad de absorción de radiación variarían. Por lo tanto el efecto salino también afecta.

- Limitaciones debidas a interferencias químicas: Tienen lugar cuando el analito se disocia, asocia o reacciona con el disolvente para dar lugar a un producto con un espectro de absorción diferente al del analito. Y esta asociación, disociación, reacción depende de la dilución. La ley de Beer no se cumple debido a los cambios en los equilibrios que se producen. Cuanto más parecidos sean los coeficientes de absorción molar de las especies, la relación lineal tiende a ser más recta.
- Desviaciones instrumentales con radiaciones policromáticas: Otra de las razones por las que no se obtiene una linealidad es debido a las desviaciones instrumentales, del instrumento en sí. Si se selecciona una única longitud de onda, lo ideal sería que el monocromador dejase escapar esa longitud de onda seleccionada (Radiación monocromática). Sin embargo la resolución del monocromador no es tan buena como para dejar pasar una sola longitud de onda y poderla aislar completamente.³⁰

Planteamiento del problema

La alcoholemia en muestras de sangre pertenecientes a occisos es una prueba de amplia ejecución en el laboratorio de química forense. en este caso la prueba del alcoholímetro no es apta para el tratamiento de las muestras, ya que es un estudio para él cual se necesita aire exhalado; por otro lado muchos laboratorios no cuentan con el equipo necesario para la determinación enzimática de etanol ó un cromatógrafo de gases para realizar dicho estudio; por lo cual se recurre a técnicas analíticas alternativas para determinar la concentración de etanol en sangre; como la elaboración de una curva estándar, utilizando la reacción colorimétrica con dicromato de potasio.

La aplicación de esta técnica causa desconfianza ya que no se ha estudiado debidamente para conocer sus condiciones y confiabilidad; por lo tanto es conveniente llevar a cabo este tipo de estudios y difundirlos para poder adquirir una técnica analítica, fácil de llevar a la práctica.

Objetivos

Objetivo Principal

Estudiar la técnica analítica, curva estándar utilizando la reacción colorimétrica con dicromato de potasio para la cuantificación de etanol en sangre, que cumpla con las características de ser eficaz, eficiente y repetible.

Objetivos Secundarios

- A. Determinar el tipo de matriz, concentración de reactivo, volumen de muestra, y tiempo de reacción para la obtención de una curva estándar para la cuantificación de etanol en sangre.
- B. Estudiar cómo se modifican los resultados de la concentración de etanol en sangre, de acuerdo a las condiciones de temperatura y tiempo de almacenamiento.

Hipótesis

Si se determinan las variables; concentración de reactivo de dicromato de potasio, tipo de matriz, volumen de muestra y tiempo de reacción se obtendrá una curva estándar con las características de ser práctica y eficiente para la cuantificación de etanol en sangre, en las muestras pertenecientes a occisos, remitidas al laboratorio de química forense.

Material

Micropipeta de volumen variable 10 mL	Incubadora
Matraz Volumétrico 100 mL	Vaso de Precipitados 150 mL
Pipeta graduada 5 mL	Matraz Erlenmeyer 250 mL
Probeta 250 mL	Gradilla
Matraz Volumétrico 1 L	Matraz Volumétrico 50 mL
Espectrofotómetro UV-Visible Perkin-Elmer	Tubos de ensaye
	Cámaras de Conway
Reactivos	
Dicromato de Potasio	Disolución Salina 0.85%
Alcohol Etilico 95.45%	Ácido Sulfúrico concentrado

Metodología

Metodología General

- Búsqueda y revisión bibliográfica.
- Ordenamiento y clasificación de la información.
- Preparación de reactivos
- Determinación de la longitud de onda de trabajo por medio de un barrido
- Determinación de la concentración de la solución de Dicromato de Potasio
- Determinación de Matriz
- Determinación de volumen de muestra
- Determinación del tiempo de Reacción
- Elaboración de la curva estándar
- Analizar los factores que afectan la concentración de etanol en sangre
- Análisis de resultados y conclusiones

Metodología Particular

1. Preparación de Reactivos

- Dicromato de Potasio

Se emplean 2.5, 4.5, 6.5 y 8.5g de Dicromato de Potasio, se disuelven en 150 mL de agua destilada. Se miden 250 mL de Ácido Sulfúrico y se adicionan poco a poco al Dicromato de Potasio en baño de agua fría; posteriormente se afora a 1 L con agua destilada.

- Soluciones Estándar para preparar Curva Estándar

Se preparan soluciones de concentración conocida como se muestra en la tabla M1. Utilizando agua destilada o solución salina según sea el caso.

Tabla M1. Esquema de la preparación de las soluciones estándar.

7 mL EtOH 95.45% ← Aforo 100mL d= 0.789 g/mL		
↓		Concentración
0mL / 50mL	→	0 mg/dL
0.5mL/50mL	→	52.71 mg/dL
1.0mL / 50mL	→	105.15 mg/dL
1.5mL/50mL	→	158.15 mg/dL
2.0mL/50mL	→	210.86 mg/dL
2.5mL/50mL	→	263.58 mg/dL
3.0mL/50mL	→	2.30 g/dL

2. Determinación de la longitud de onda de trabajo por medio de un barrido

Se preparó una curva estándar utilizando dicromato de potasio 4.5 g/L; las soluciones de dicromato de potasio, producto de la reacción; fueron medidas en el espectrofotómetro en un rango de longitud de onda de 560 nm a 620 nm.

3. Determinación de la Concentración de la solución de Dicromato de Potasio

Se prepara una curva estándar con cada una de las concentraciones del reactivo de Dicromato de Potasio; 2.5, 4.5, 6.5 y 8.5 g/L.

Se colocan 2 mL de cada solución Estándar (preparadas en disolución salina) en el compartimento exterior de la cámara de Conway; en el compartimento interno se colocan 4 mL del reactivo de Dicromato de Potasio; se meten a la incubadora durante 40 minutos a 75°C. Posteriormente se obtiene la curva estándar, leyendo el Dicromato de Potasio producto de la reacción en el espectrofotómetro Ultravioleta Visible a 586.5 nm. Cada curva se hace por triplicado.

4. Determinación de Matriz

Se prepara una curva con las soluciones estándar aforadas con agua destilada y otra con disolución salina; depositando 2 mL de cada estándar en la parte exterior de la cámara; 4 mL de Dicromato de Potasio 8.5g/L en el compartimento interno, se incuba a 75°C durante 40 minutos. Posteriormente se obtiene la curva estándar, leyendo el Dicromato de Potasio producto de la reacción en el espectrofotómetro Ultravioleta Visible a 586.5 nm. Cada curva se hace por triplicado.

5. Determinación del tiempo de Reacción

Se preparan 3 curvas diferentes. Se colocan 2 mL de cada solución estándar (solución salina) en el compartimento externo de la cámara; 4 mL de Dicromato de Potasio 8.5g/L en el compartimento interno y se incuba a 75°C durante 30, 40 y 50 minutos. Posteriormente se obtiene la curva estándar, leyendo el Dicromato de Potasio producto de la reacción en el espectrofotómetro Ultravioleta Visible a 586.5 nm. Cada curva se hace por triplicado.

6. Determinación de volumen de Muestra

Se preparan 3 curvas diferentes; colocando 1 mL, 2 mL y 3 mL de las soluciones estándar (disolución salina), en el compartimento externo de la cámara; 4 mL de Dicromato de Potasio 8.5g/L en el compartimento interno, se incuba a 75°C durante 30 minutos. Posteriormente se obtiene la curva estándar, leyendo el Dicromato de Potasio producto de la reacción en el espectrofotómetro Ultravioleta Visible a 586.5 nm. Cada curva se hace por triplicado.

7. Preparación de la curva Estándar

2 mL de cada solución estándar preparada en disolución salina se hace reaccionar en presencia de 4 mL de Dicromato de Potasio a 75°C, durante 30 minutos. El dicromato de potasio producto de la reacción se lee en el espectrofotómetro Ultravioleta Visible a una longitud de onda de 586.5 nm. Cada curva se hace por triplicado.

Para crear un método en el Espectrofotómetro UV-Visible: se elige cualquier método existente en la pestaña de concentración, posteriormente se guarda con el nombre deseado y se trabaja sobre el nuevo método. Se capturan siete concentraciones iniciando con 0 mg/dL y finalizando con 316.30 mg/dL.

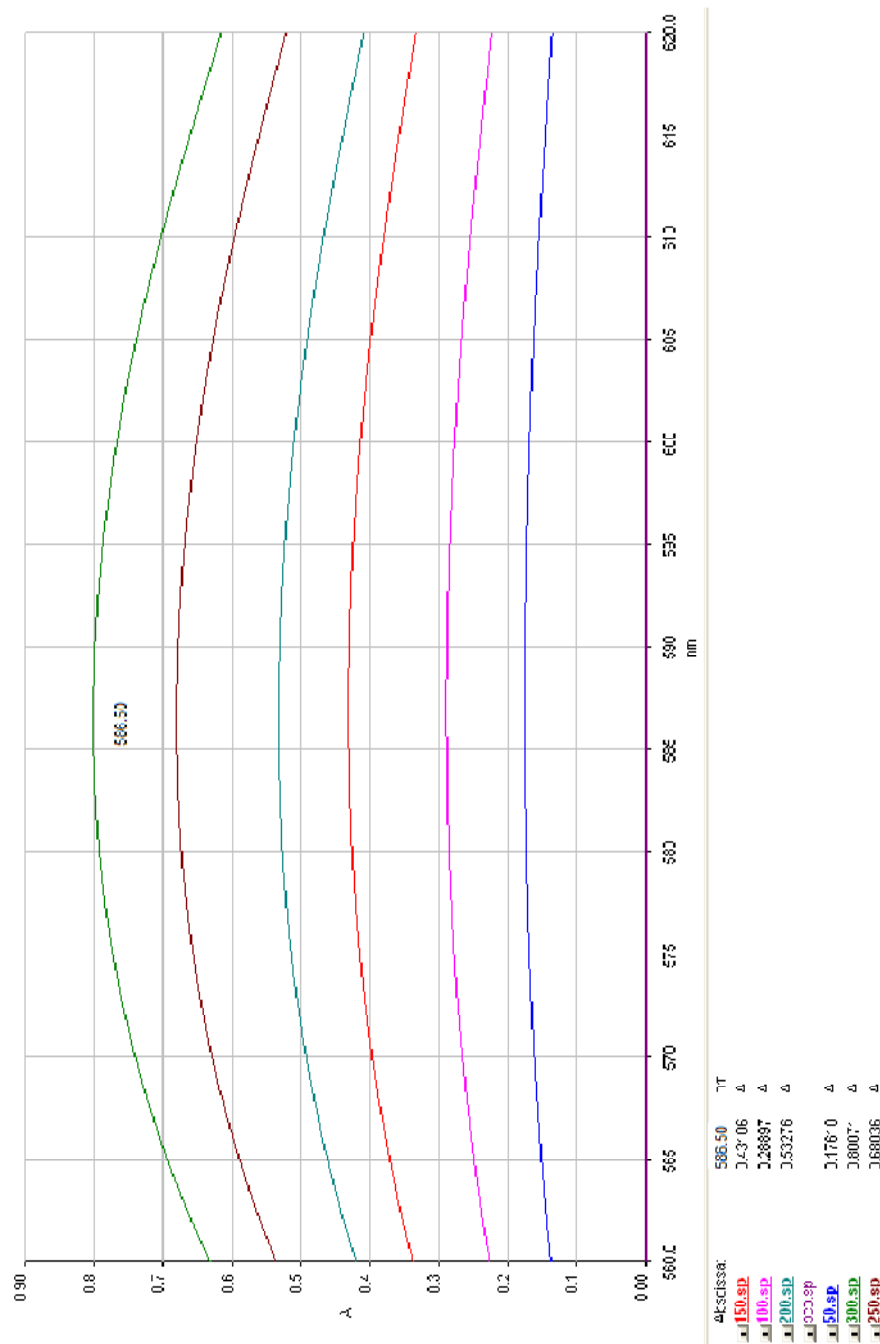
8. Análisis los factores que afectan la concentración de Etanol en Sangre

Se eligen al azar veinte muestras; se hacen cuatro grupos de cinco muestras cada uno; en un grupo se encontraran muestras positivas, en el siguiente negativas; estos primeros se almacenan tapados y en refrigeración a 7°C; los otros dos grupos serán almacenados a temperatura ambiente e igualmente estarán conformados uno por muestras positivas y el otro por negativas.

Determinación de la longitud de onda de trabajo

Resultados

Gráfico R1. Barrido espectral realizado con el dicromato de potasio 8.5 g/L, producto de la reacción con las soluciones estándar de etanol.



Determinación de la Concentración de la solución de Dicromato de Potasio

Resultados

Tabla R1.1 Valores obtenidos utilizando Dicromato de Potasio con una concentración de 2.5g/L

Dicromato 2.5g/L		Coeficiente de Correlación: 0.8847	
Espectrofotómetro: Perkin-Elmer Lambda 40		Serie-Nr: 101N0112002	
Método: EtOH_CD_1		Longitud de Onda: 586.5	
ID	Concentración mg/dL	Absorbancia	
A	0	0	
B	52.717	0.0822	
C	105.43	0.1645	
D	158.15	0.2379	
E	210.86	0.2670	
F	263.58	0.2655	
G	316.30	0.2688	

Gráfico R1.1 Curva Estándar obtenida con los valores de la Tabla R1.1

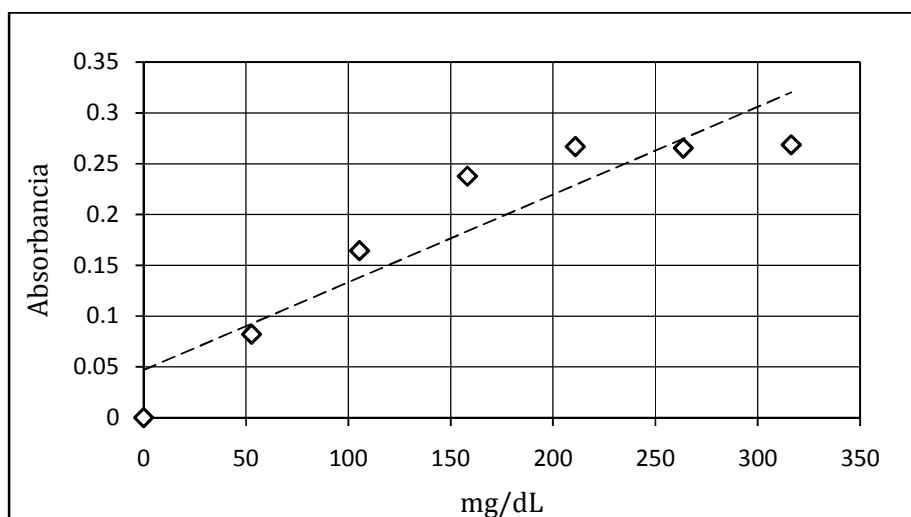
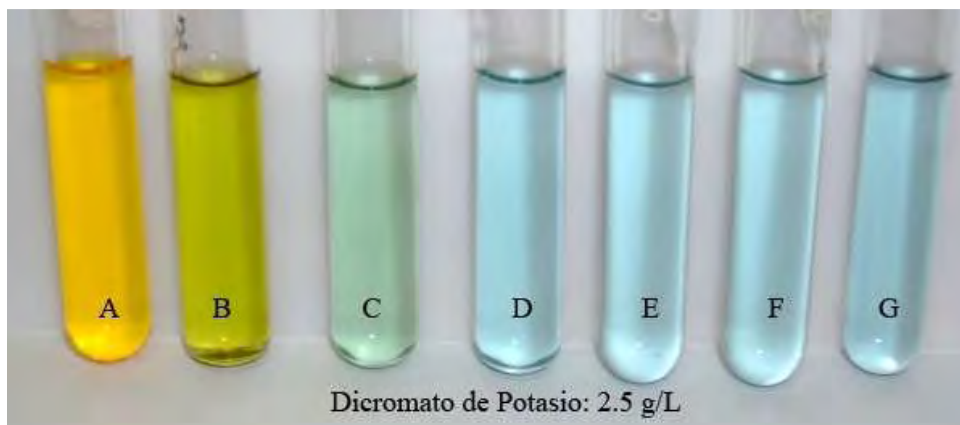


Imagen R1. Tonalidades del Dicromato de Potasio al reaccionar con etanol.



Determinación de la Concentración de la solución de Dicromato de Potasio

Tabla R1.2 Valores obtenidos utilizando Dicromato de Potasio con una concentración de 2.5g/L

Dicromato 2.5g/L		Coeficiente de Correlación: 0.8754	
Espectrofotómetro: Perkin-Elmer Lambda 40		Serie-Nr: 101N0112002	
Método: EtOH_CD_1		Longitud de Onda: 586.5	
ID	Concentración mg/dL	Absorbancia	
		Replica 2	Replica 3
A	0	0	0
B	52.717	0.0819	0.0789
C	105.43	0.1641	0.1531
D	158.15	0.2378	0.2267
E	210.86	0.2674	0.2563
F	263.58	0.2656	0.2545
G	316.30	0.2686	0.2567

Gráfico R1.2 Curva Estándar obtenida con los valores de la Tabla R1.2, Replica 2.

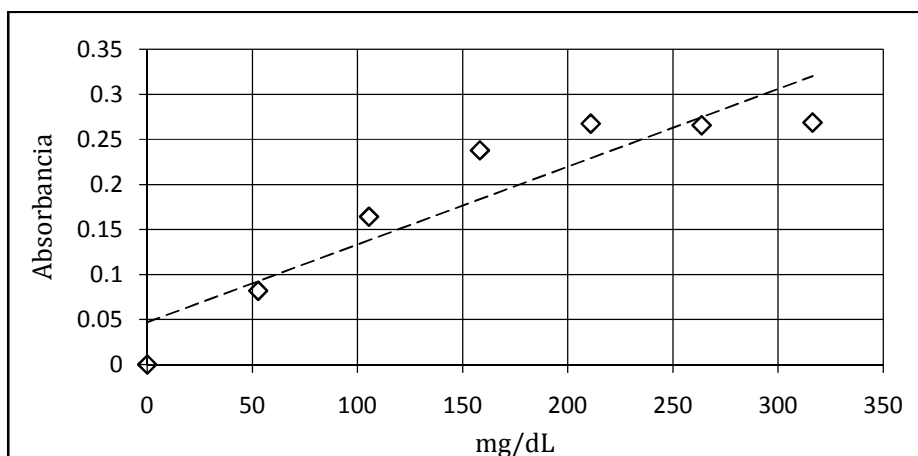
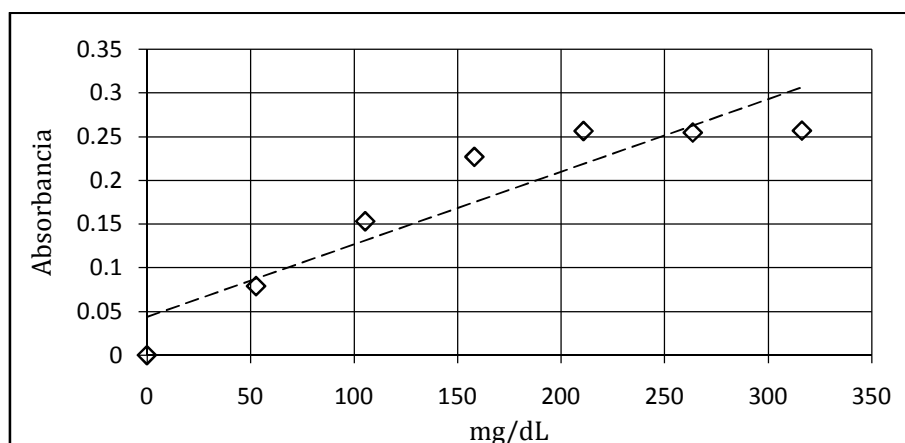


Gráfico R1.3 Curva Estándar obtenida con los valores de la Tabla R1.2, Replica 3.



Determinación de la Concentración de la solución de Dicromato de Potasio

Tabla R2.1 Valores obtenidos utilizando Dicromato de Potasio con una concentración de 4.25g/L

Dicromato 4.25 g/L		Coefficiente de Correlación: 0.9694
Espectrofotómetro: Perkin-Elmer Lambda 40		Serie-Nr: 101N0112002
Método: EtOH_CD_2		Longitud de Onda: 586.5
ID	Concentración mg/dL	Absorbancia
A	0	0
B	52.717	0.0853
C	105.43	0.1698
D	158.15	0.2611
E	210.86	0.3322
F	263.58	0.3814
G	316.30	0.3788

Gráfico R2.1 Curva Estándar obtenida con los valores de la Tabla R2.1

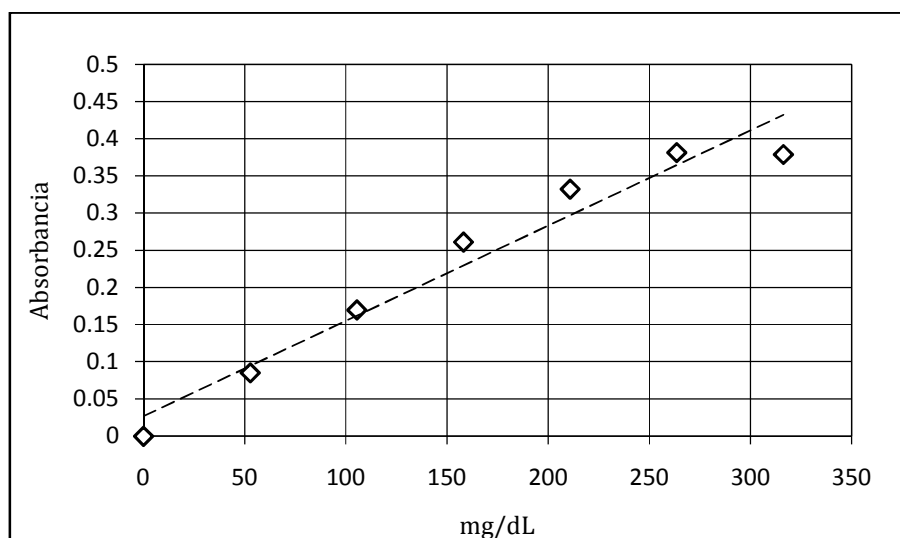


Imagen R2. Tonalidades del Dicromato de Potasio al reaccionar con etanol.



Determinación de la Concentración de la solución de Dicromato de Potasio

Tabla R2.2 Valores obtenidos utilizando Dicromato de Potasio con una concentración de 4.25g/L

Dicromato 4.25 g/L		Coeficiente de Correlación: 0.9689	
Espectrofotómetro: Perkin-Elmer Lambda 40		Serie-Nr: 101N0112002	
Método: EtOH_CD_2		Longitud de Onda: 586.5	
ID	Concentración mg/dL	Absorbancia	
		Replica 2	Replica 3
A	0	0	0
B	52.717	0.0745	0.0854
C	105.43	0.1272	0.1701
D	158.15	0.1689	0.2545
E	210.86	0.2211	0.3534
F	263.58	0.2709	0.3815
G	316.30	0.2677	0.3854

Gráfico R2.2 Curva Estándar obtenida con los valores de la Tabla R2.2, Replica 2.

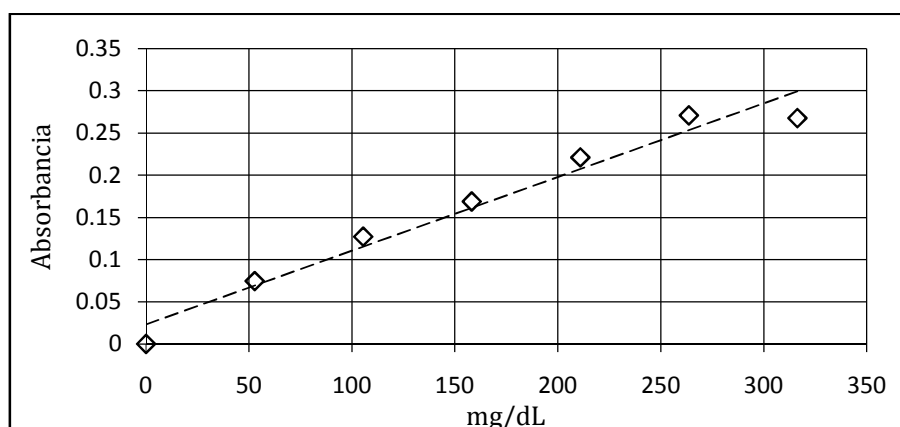
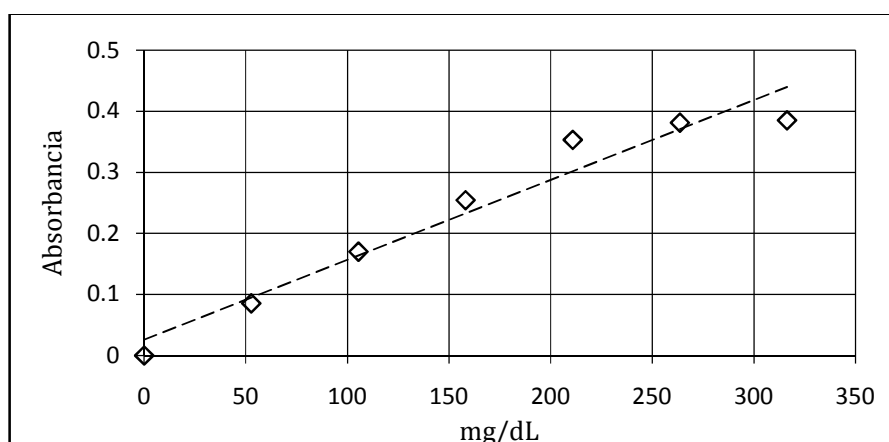


Gráfico R2.3 Curva Estándar obtenida con los valores de la Tabla R2.2, Replica 3.



Determinación de la Concentración de la solución de Dicromato de Potasio

Tabla R3.1 Valores obtenidos utilizando Dicromato de Potasio con una concentración de 6.5g/L

Dicromato 6.5 g/L		Coefficiente de Correlación: 0.9851
Espectrofotómetro: Perkin-Elmer Lambda 40		Serie-Nr: 101N0112002
Método: EtOH_CD_3		Longitud de Onda: 586.5
ID	Concentración mg/dL	Absorbancia
A	0	0
B	52.717	0.1244
C	105.43	0.2562
D	158.15	0.3867
E	210.86	0.4993
F	263.58	0.6164
G	316.30	0.6723

Gráfico R3.1 Curva Estándar obtenida con los valores de la Tabla R3.1

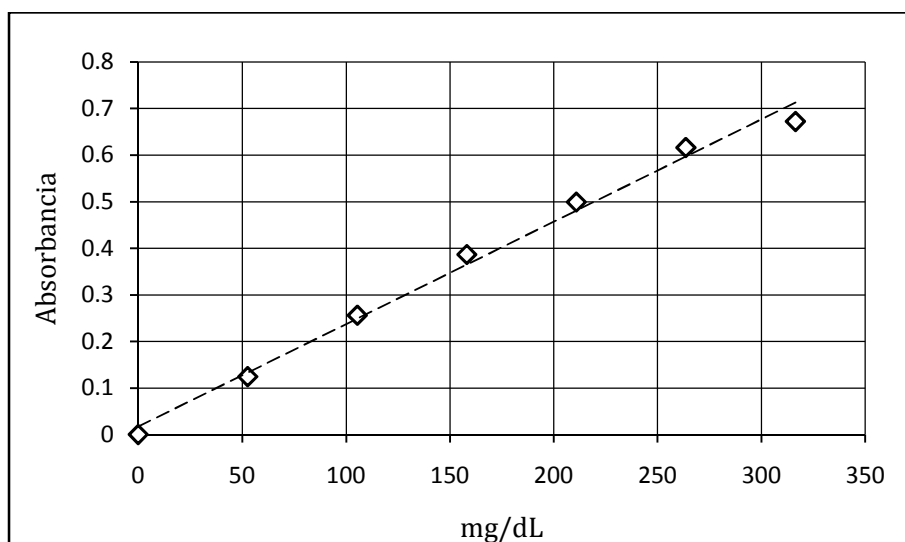


Imagen R3 Tonalidades del Dicromato de Potasio al reaccionar con etanol.



Determinación de la Concentración de la solución de Dicromato de Potasio

Tabla R3.2 Valores obtenidos utilizando Dicromato de Potasio con una concentración de 6.5g/L

Dicromato 6.5 g/L		Coeficiente de Correlación: 0.9853	
Espectrofotómetro: Perkin-Elmer Lambda 40		Serie-Nr: 101N0112002	
Método: EtOH_CD_3		Longitud de Onda: 586.5	
ID	Concentración mg/dL	Absorbancia	
		Replica 2	Replica 3
A	0	0	0
B	52.717	0.1242	0.1299
C	105.43	0.2561	0.2559
D	158.15	0.3868	0.3657
E	210.86	0.4996	0.4677
F	263.58	0.6166	0.5677
G	316.30	0.6724	0.6123

Gráfico R3.2 Curva Estándar obtenida con los valores de la Tabla R3.2, Replica 2.

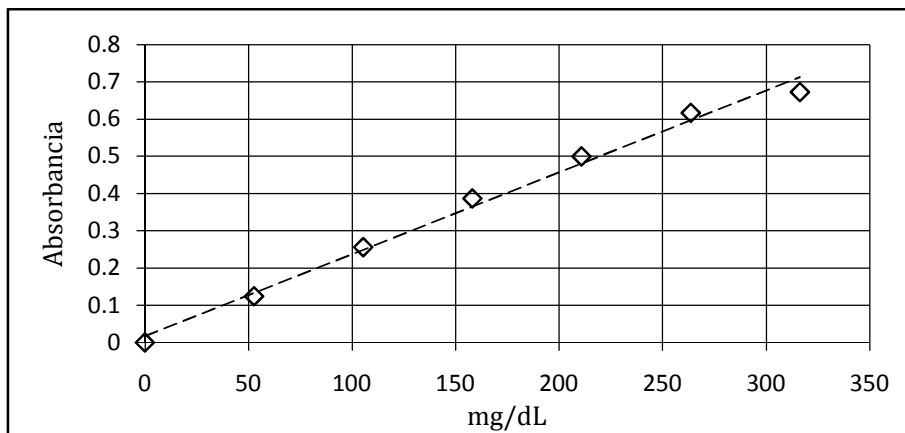
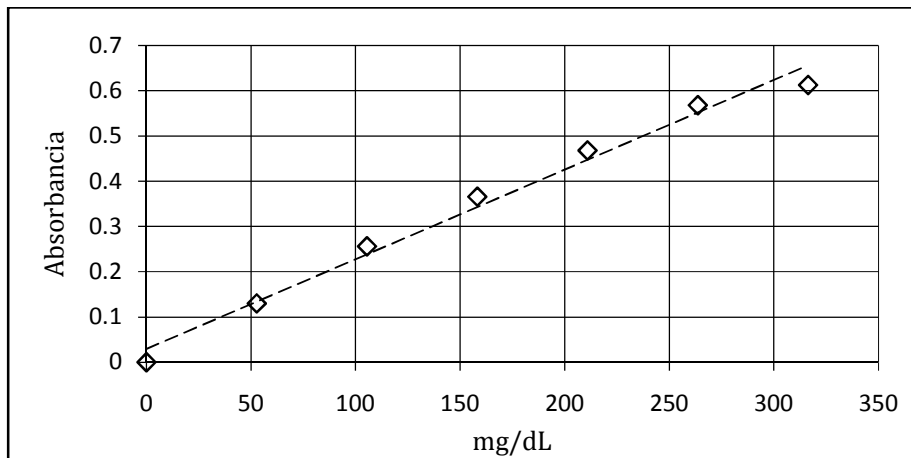


Gráfico R3.3 Curva Estándar obtenida con los valores de la Tabla R3.2, Replica 3.



Determinación de la Concentración de la solución de Dicromato de Potasio

Tabla R4.1 Valores obtenidos utilizando Dicromato de Potasio con una concentración de 8.5g/L

Dicromato 8.560g/L		Coeficiente de Correlación: 0.9977	
Espectrofotómetro: Perkin-Elmer Lambda 40		Serie-Nr: 101N0112002	
Método: EtOH_CD_4		Longitud de Onda: 586.5	
ID	Concentración mg/dL	Absorbancia	
A	0	0	
B	52.717	0.0988	
C	105.43	0.2003	
D	158.15	0.3008	
E	210.86	0.3755	
F	263.58	0.4708	
G	316.30	0.5792	

Gráfico R4.1 Curva Estándar obtenida con los valores de la Tabla R4.1

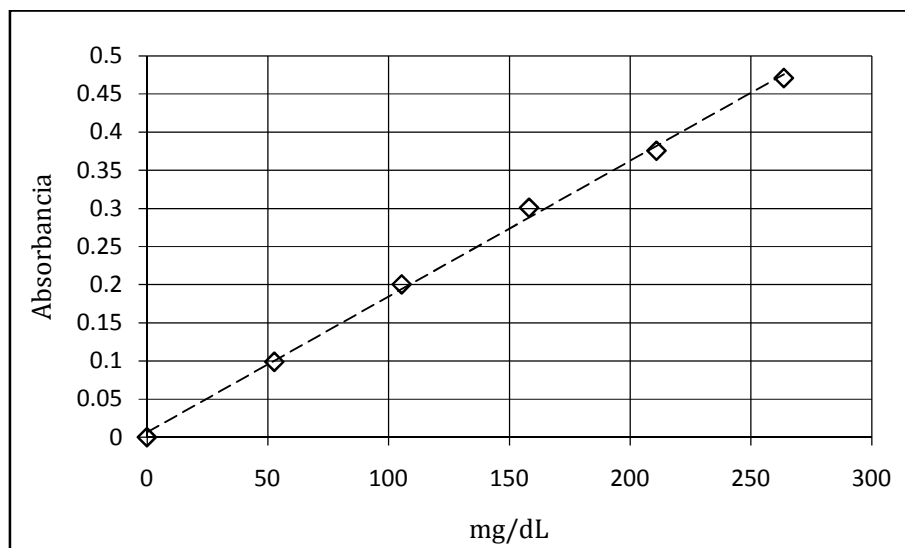


Imagen R4 Tonalidades del Dicromato de Potasio al reaccionar con etanol.



Determinación de la Concentración de la solución de Dicromato de Potasio

Tabla R4.2 Valores obtenidos utilizando Dicromato de Potasio con una concentración de 8.5g/L

Dicromato 8.560g/L		Coeficiente de Correlación: 0.9979	
Espectrofotómetro: Perkin-Elmer Lambda 40		Serie-Nr: 101N0112002	
Método: EtOH_CD_4		Longitud de Onda: 586.5	
ID	Concentración mg/dL	Absorbancia	
		Replica 2	Replica 3
A	0	0	0
B	52.717	0.0991	0.0981
C	105.43	0.2001	0.1989
D	158.15	0.3023	0.2934
E	210.86	0.3821	0.3887
F	263.58	0.4711	0.4799
G	316.30	0.5790	0.5698

Gráfico R4.2 Curva Estándar obtenida con los valores de la Tabla R4.2, Replica 2.

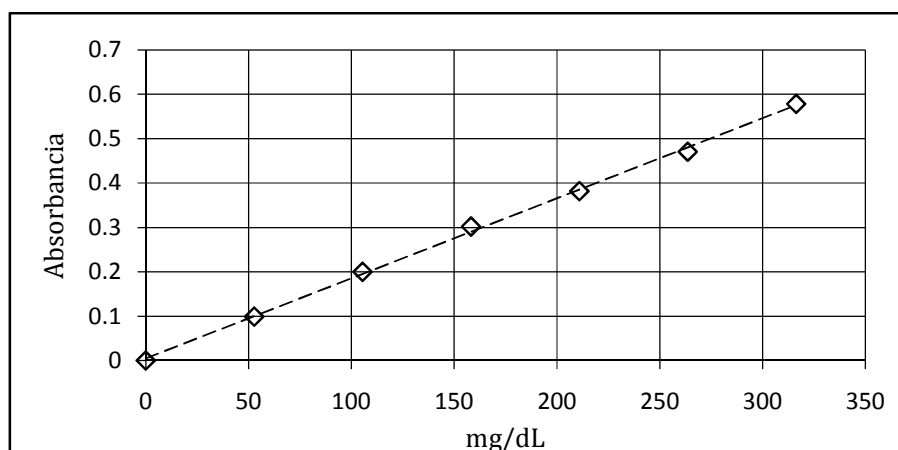
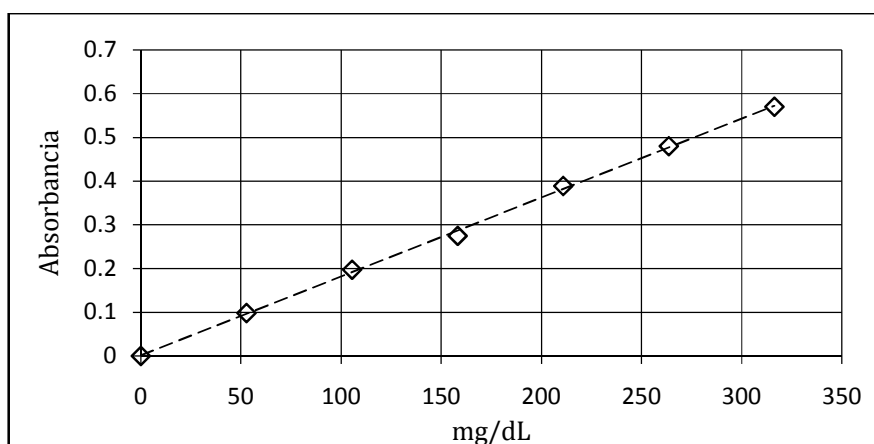


Gráfico R4.3 Curva Estándar obtenida con los valores de la Tabla R4.2, Replica 3.



Determinación de Matriz

Tabla R5.1 Valores obtenidos utilizando Agua Destilada como matriz.

Dicromato 8.50 g/L Agua Destilada		Factor de Correlación: 0.9957
Espectrofotómetro: Perkin-Elmer Lambda 40		Serie-Nr: 101N0112002
Método: EtOH_MZ_1_AD		Longitud de Onda: 586.5
ID	Concentración mg/dL	Absorbancia
A	0	0
B	52.717	0.0977
C	105.43	0.2001
D	158.15	0.3006
E	210.86	0.3633
F	263.58	0.4706
G	316.3	0.5789

Gráfico R5.1 Curva Estándar obtenida con los valores de la Tabla R5.1

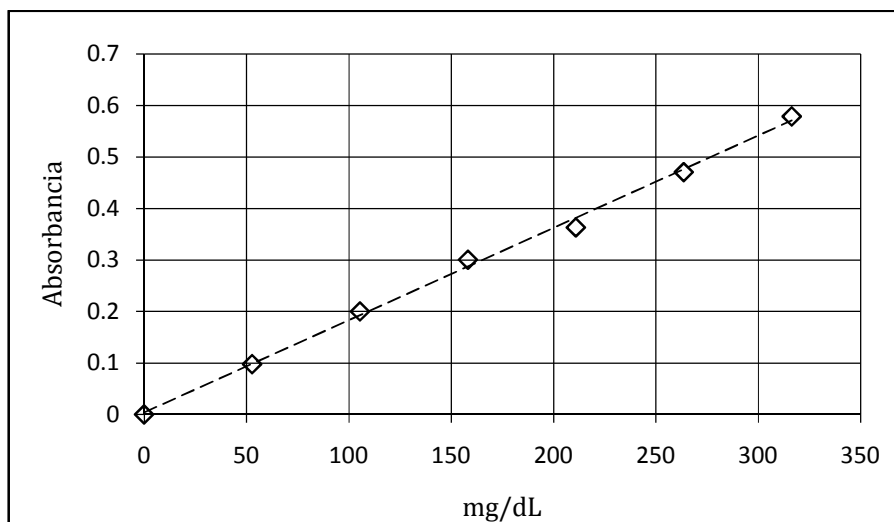


Imagen R5. Tonalidades del Dicromato de Potasio al reaccionar con etanol.



Determinación de Matriz

Tabla R5.2 Valores obtenidos utilizando Agua Destilada como matriz.

Dicromato 8.50 g/L Agua Destilada		Factor de Correlación: 0.9956	
Espectrofotómetro: Perkin-Elmer Lambda 40 Serie-Nr: 101N0112002			
Método: EtOH_MZ_1_AD		Longitud de Onda: 586.5	
ID	Concentración mg/dL	Absorbancia	
		Replica 2	Replica 3
A	0	0	0
B	52.717	0.1088	0.0896
C	105.43	0.2073	0.1925
D	158.15	0.3108	0.2796
E	210.86	0.3601	0.3597
F	263.58	0.4806	0.4589
G	316.3	0.5889	0.5572

Gráfico R5.2 Curva Estándar obtenida con los valores de la Tabla R5.2, Replica 2.

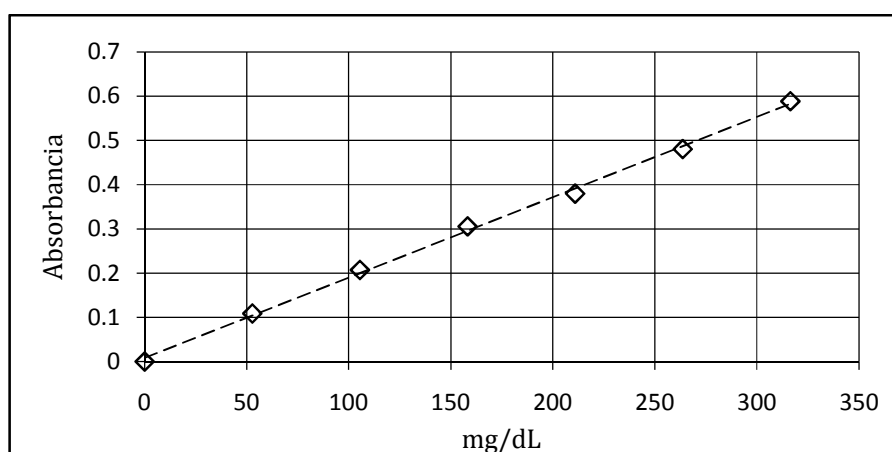
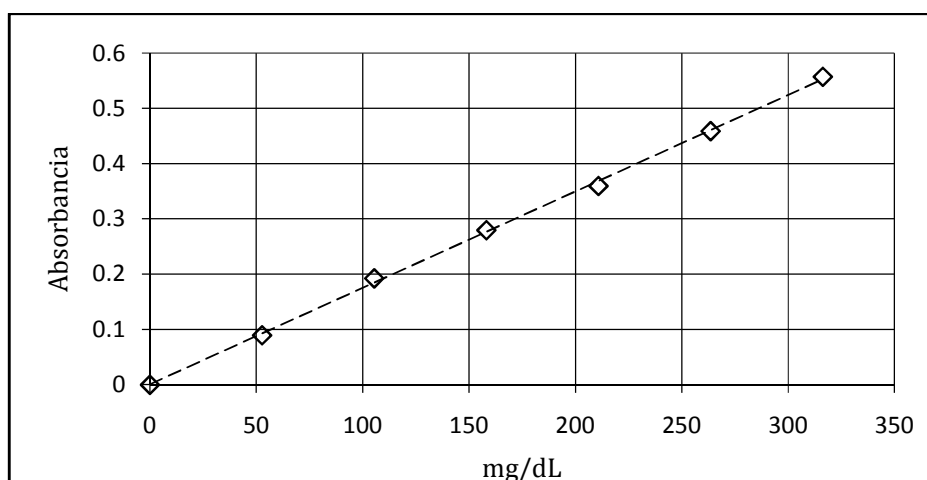


Gráfico R5.3 Curva Estándar obtenida con los valores de la Tabla R5.2, Replica 3.



Determinación de Matriz

Tabla R6.1 Valores obtenidos utilizando Solución Salina como matriz.

Dicromato 8.50 g/L Solución Salina Factor de Correlación: 0.9975		
Espectrofotómetro: Perkin-Elmer Lambda 40 Serie-Nr: 101N0112002		
Método: EtOH_MZ_2_SS Longitud de Onda: 586.5		
ID	Concentración mg/dL	Absorbancia
A	0	0
B	52.717	0.1038
C	105.43	0.2284
D	158.15	0.3205
E	210.86	0.4389
F	263.58	0.5465
G	316.3	0.6438

Gráfico R6.1 Curva Estándar obtenida con los valores de la Tabla R6.1

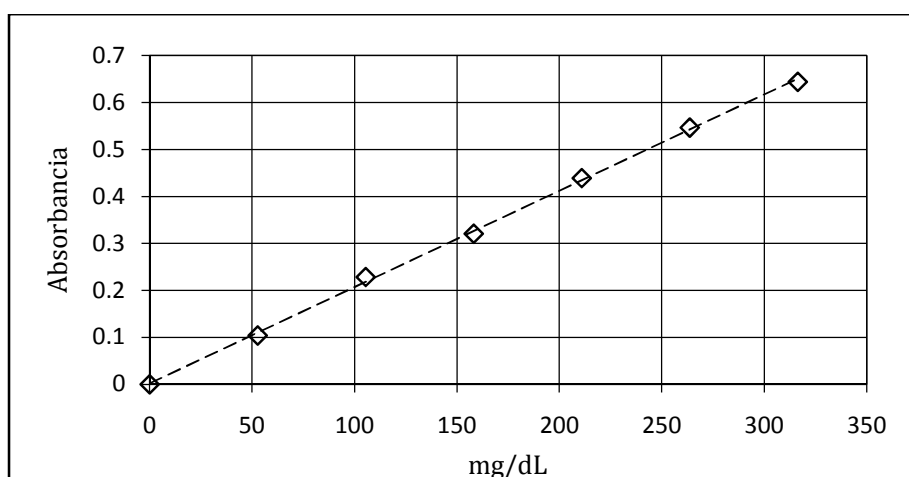


Imagen R6. Tonalidades del Dicromato de Potasio al reaccionar con etanol.



Determinación de Matriz

Tabla R6.2 Valores obtenidos utilizando Solución Salina como matriz.

Dicromato 8.50 g/L Solución Salina Factor de Correlación: 0.9975		Espectrofotómetro: Perkin-Elmer Lambda 40 Serie-Nr: 101N0112002	
Método: EtOH_MZ_2_SS		Longitud de Onda: 586.5	
ID	Concentración mg/dL	Absorbancia	
		Replica 2	Replica 3
A	0	0	0
B	52.717	0.0891	0.1038
C	105.43	0.2068	0.2081
D	158.15	0.2863	0.2987
E	210.86	0.3962	0.4389
F	263.58	0.5001	0.5465
G	316.3	0.5966	0.6434

Gráfico R6.2 Curva Estándar obtenida con los valores de la Tabla R6.2, Replica 2.

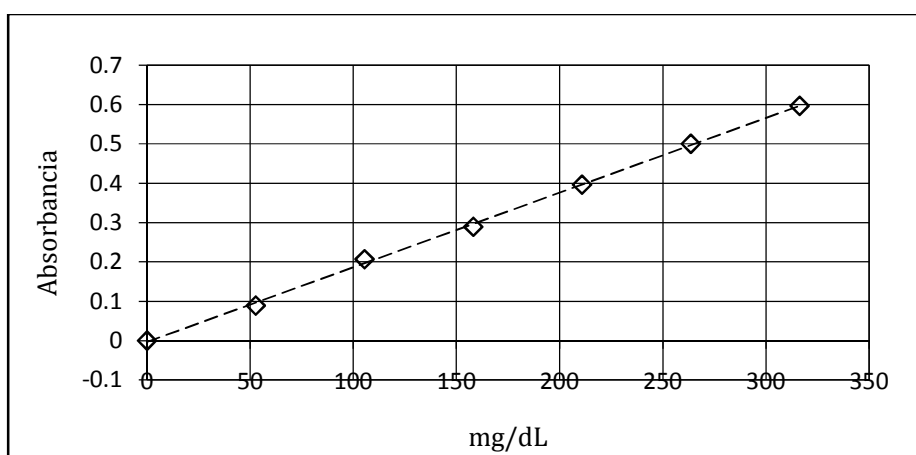
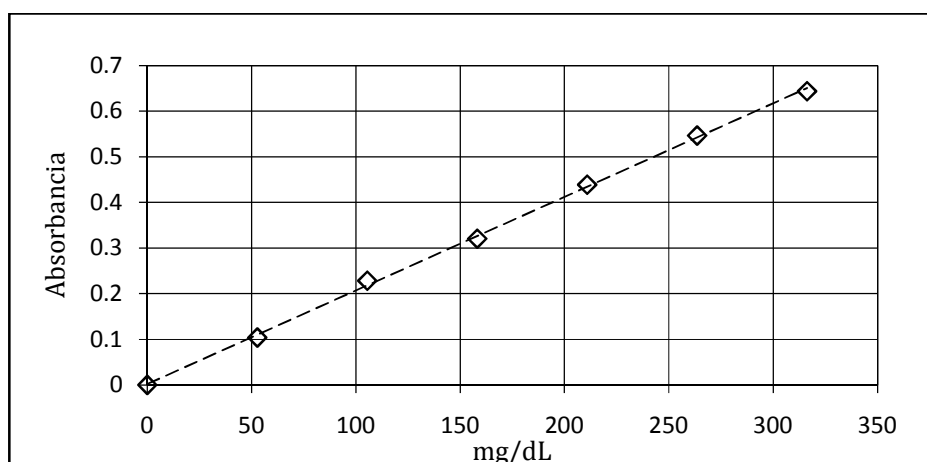


Gráfico R6.3 Curva Estándar obtenida con los valores de la Tabla R6.2, Replica 3.



Determinación del Tiempo de Reacción

Tabla R7.1 Valores obtenidos con una incubación de 30 minutos.

Dicromato 8.50 g/L 30 minutos Factor de Correlación: 0.9984		
Espectrofotómetro: Perkin-Elmer Lambda 40 Serie-Nr: 101N0112002		
Método: EtOH_TR_1_30min Longitud de Onda: 586.5		
	Concentración mg/dL	Absorbancia
ID	0	0
A	52.717	0.0892
B	105.43	0.2069
C	158.15	0.3104
D	210.86	0.3963
E	263.58	0.5002
F	316.3	0.5967

Gráfico R7.1 Curva Estándar obtenida con los valores de la Tabla R7.1

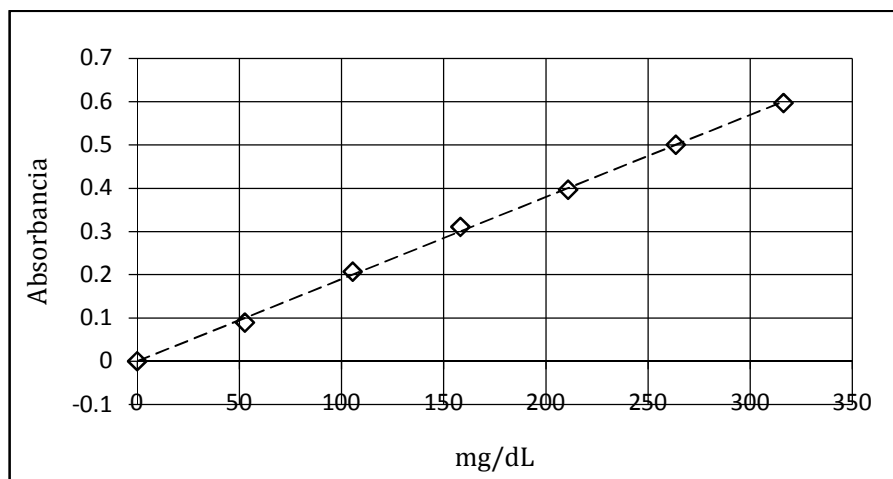


Imagen R7 Tonalidades del Dicromato de Potasio al reaccionar con etanol.



Determinación del Tiempo de Reacción

Tabla R7.2 Valores obtenidos con una incubación de 30 minutos.

Dicromato 8.50 g/L		30 minutos		Factor de Correlación: 0.9985	
Espectrofotómetro: Perkin-Elmer Lambda 40		Serie-Nr: 101N0112002			
Método: EtOH_TR_1_30min		Longitud de Onda: 586.5			
Concentración mg/dL		Absorbancia			
ID		Replica 2	Replica 3		
	0	0	0		
A	52.717	0.0881	0.1392		
B	105.43	0.2058	0.2501		
C	158.15	0.3071	0.3584		
D	210.86	0.3952	0.4863		
E	263.58	0.4991	0.6002		
F	316.3	0.5956	0.7067		

Gráfico R7.2 Curva Estándar obtenida con los valores de la Tabla R7.2, Replica 2.

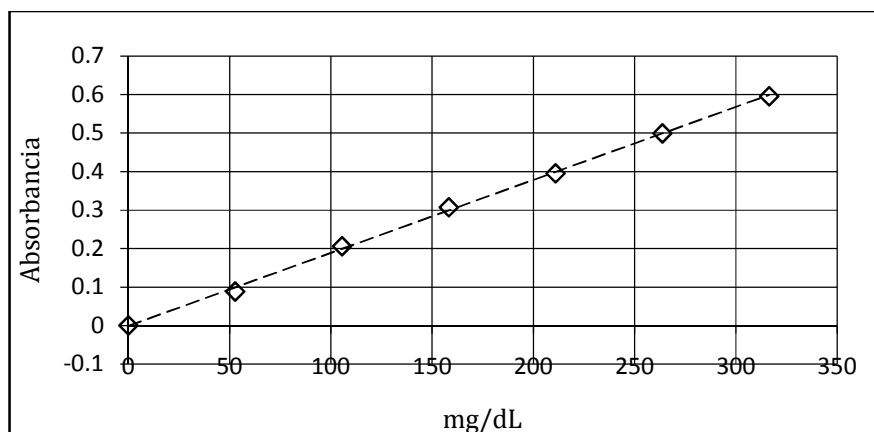
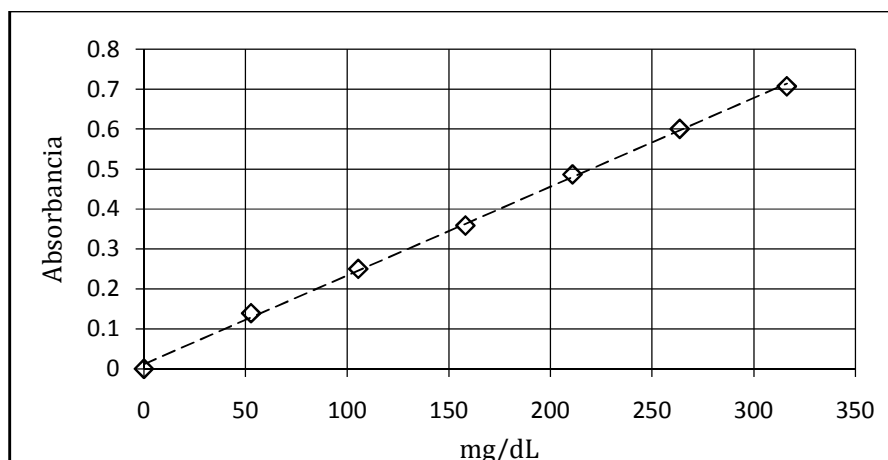


Gráfico R7.3 Curva Estándar obtenida con los valores de la Tabla R7.2, Replica 3.



Determinación del Tiempo de Reacción

Tabla R8.1 Valores obtenidos con una incubación de 40 minutos.

Dicromato 8.50 g/L 40 minutos Factor de Correlación: 0.9872		
Espectrofotómetro: Perkin-Elmer Lambda 40 Serie-Nr: 101N0112002		
Método: EtOH_TR_1_40min Longitud de Onda: 586.5		
	Concentración mg/dL	Absorbancia
ID	0	0
A	52.717	0.0966
B	105.43	0.1921
C	158.15	0.3092
D	210.86	0.3674
E	263.58	0.5064
F	316.3	0.5647

Gráfico R8.1 Curva Estándar obtenida con los valores de la Tabla R8.1

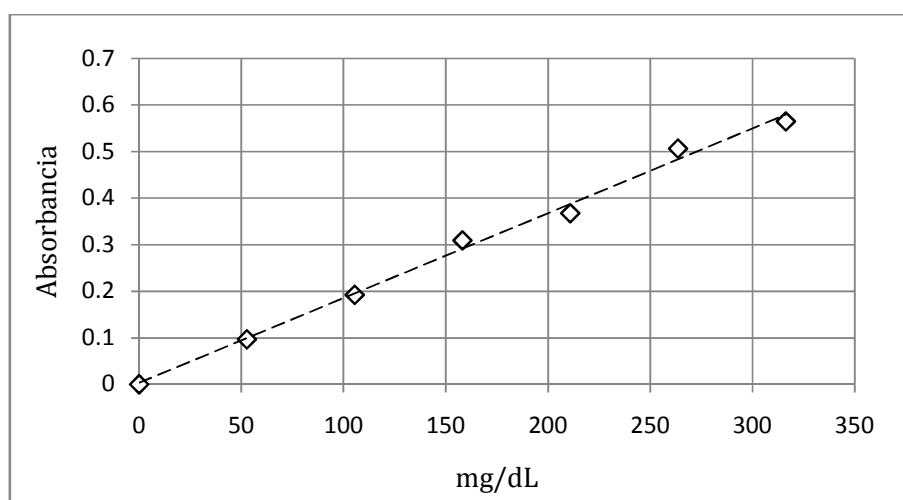


Imagen R8 Tonalidades del Dicromato de Potasio al reaccionar con etanol.



Determinación del Tiempo de Reacción

Tabla R8.2 Valores obtenidos con una incubación de 40 minutos.

Dicromato 8.50 g/L 40 minutos Factor de Correlación: 0.9874			
Espectrofotómetro: Perkin-Elmer Lambda 40 Serie-Nr: 101N0112002			
Método: EtOH_TR_1_40min			
Longitud de Onda: 586.5			
	Concentración mg/dL	Absorbancia	
		Replica 2	Replica 3
ID	0	0	0
A	52.717	0.0955	0.1205
B	105.43	0.1911	0.2189
C	158.15	0.3081	0.3598
D	210.86	0.3873	0.4573
E	263.58	0.4993	0.5893
F	316.3	0.5736	0.6929

Gráfico R8.2 Curva Estándar obtenida con los valores de la Tabla R8.2, Replica 2.

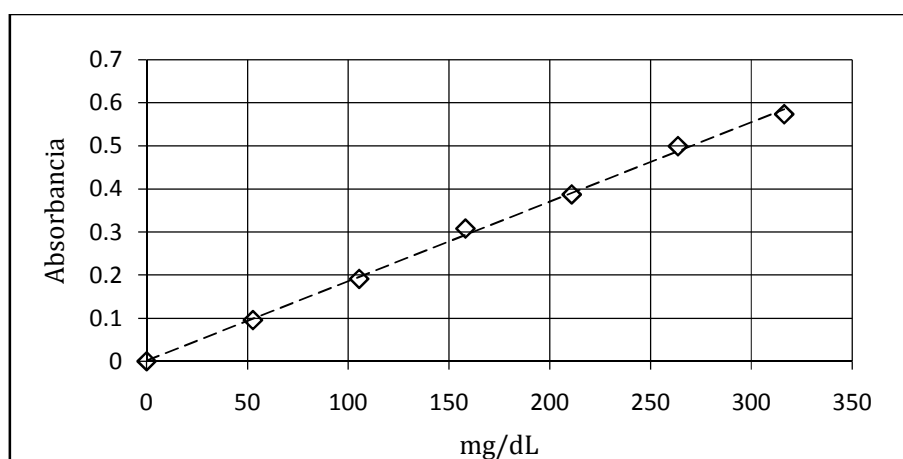
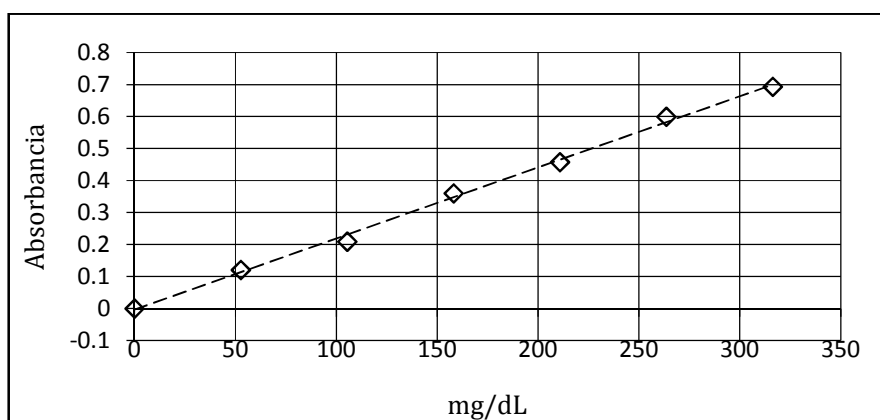


Gráfico R8.3 Curva Estándar obtenida con los valores de la Tabla R8.2, Replica 3.



Determinación del Tiempo de Reacción

Tabla R9.1 Valores obtenidos con una incubación de 50 minutos.

Dicromato 8.50 g/L 50 minutos Factor de Correlación: 0.9358		
Espectrofotómetro: Perkin-Elmer Lambda 40 Serie-Nr: 101N0112002		
Método: EtOH_TR_1_40min Longitud de Onda: 586.5		
	Concentración mg/dL	Absorbancia
ID	0	0
A	52.717	0.0959
B	105.43	0.2002
C	158.15	0.3931
D	210.86	0.3025
E	263.58	0.4909
F	316.3	0.6136

Gráfico R9.1 Curva Estándar obtenida con los valores de la Tabla R9.1

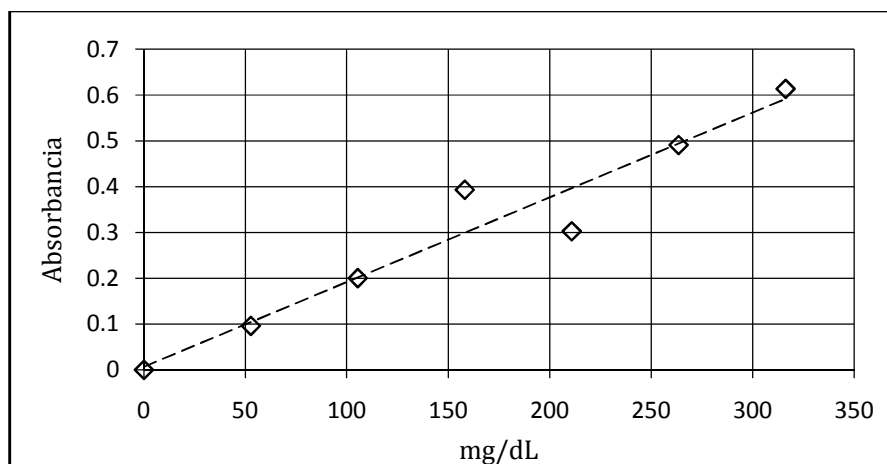


Imagen R9.1 Tonalidades del Dicromato de Potasio al reaccionar con etanol.



Determinación del Tiempo de Reacción

Tabla R9.2 Valores obtenidos con una incubación de 50 minutos.

Dicromato 8.50 g/L		50 minutos		Factor de Correlación: 0.9331	
Espectrofotómetro: Perkin-Elmer Lambda 40		Serie-Nr: 101N0112002			
Método: EtOH_TR_1_40min		Longitud de Onda: 586.5			
Concentración mg/dL		Absorbancia			
		Replica 2	Replica 3		
ID	0	0	0		
A	52.717	0.0991	0.0891		
B	105.43	0.2034	0.1984		
C	158.15	0.3821	0.2821		
D	210.86	0.2914	0.1914		
E	263.58	0.4812	0.3812		
F	316.3	0.5993	0.4993		

Gráfico R9.2 Curva Estándar obtenida con los valores de la Tabla R9.2, Replica 2.

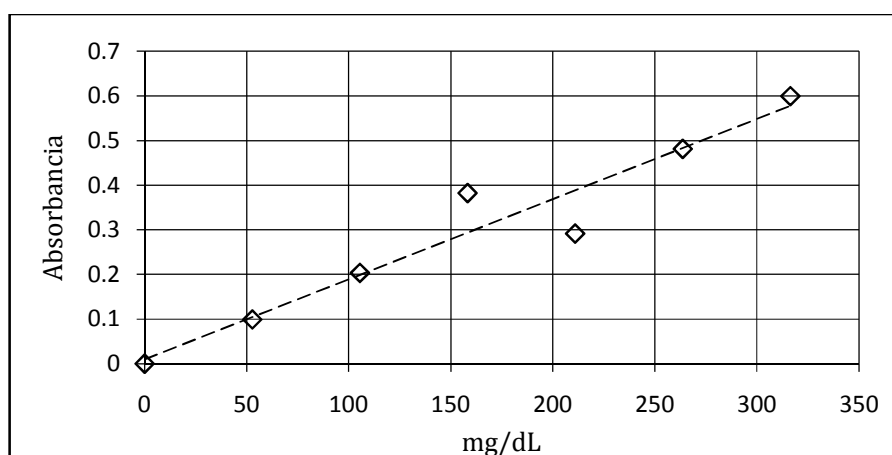
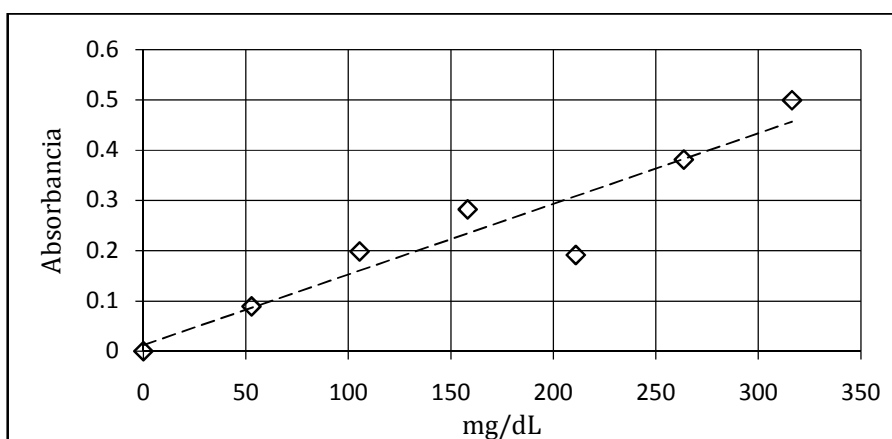


Gráfico R9.3 Curva Estándar obtenida con los valores de la Tabla R9.2, Replica 3.



Determinación de Volumen de Muestra

Tabla R10.1 Valores obtenidos utilizando 1 mL de Muestra para la reacción con Dicromato de Potasio.

ID	Concentración mg/dL	Absorbancia
A	0	0
B	52.717	0.0532
C	105.43	0.1072
D	158.15	0.1351
E	210.86	0.2094
F	263.58	0.2593
G	316.3	0.3116

Gráfico R10.1 Curva Estándar obtenida con los valores de la Tabla R10.1

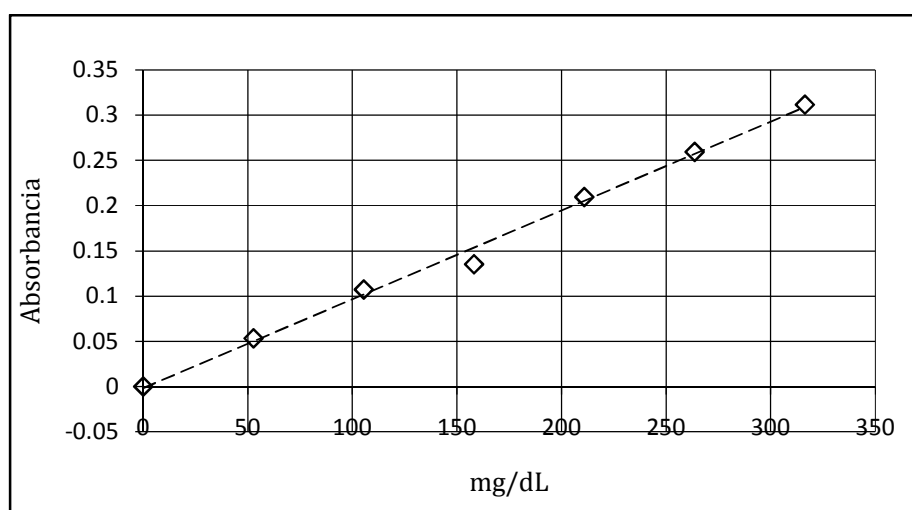


Imagen R10. Tonalidades del Dicromato de Potasio al reaccionar con etanol.



Determinación de Volumen de Muestra

Tabla R10.2 Valores obtenidos utilizando 1 mL de Muestra para la reacción con Dicromato de Potasio.

Dicromato 8.50 g/L		1 mL	Factor de Correlación: 0.9930	
Espectrofotómetro: Perkin-Elmer Lambda 40 Serie-Nr: 101N0112002				
Método: EtOH_TR_1_30min			Longitud de Onda: 586.5	
ID	Concentración mg/dL	Absorbancia		
		Replica 2	Replica 3	
A	0	0	0	
B	52.717	0.0875	0.0967	
C	105.43	0.1272	0.1348	
D	158.15	0.1771	0.1857	
E	210.86	0.2414	0.2458	
F	263.58	0.3097	0.2899	
G	316.3	0.3516	0.365	

Gráfico R10.2 Curva Estándar obtenida con los valores de la Tabla R10.2, Replica 2.

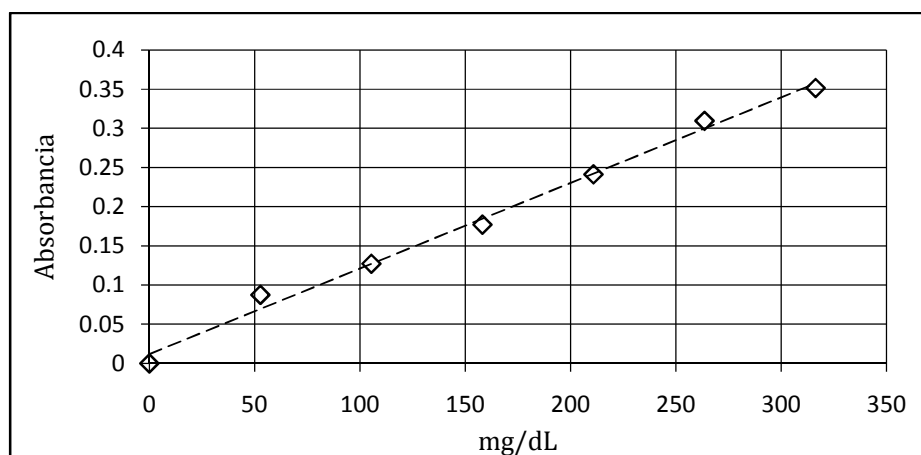
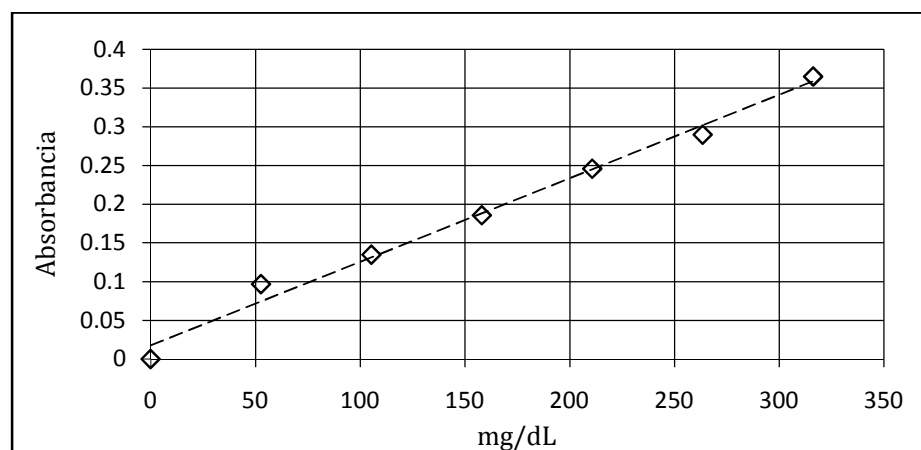


Gráfico R10.3 Curva Estándar obtenida con los valores de la Tabla R10.2, Replica 3.



Determinación de Volumen de Muestra

Tabla R11.1 Valores obtenidos utilizando 2 mL de Muestra para la reacción con Dicromato de Potasio.

Dicromato 8.50 g/L		2 mL	Factor de Correlación: 0.9984
Espectrofotómetro: Perkin-Elmer Lambda 40		Serie-Nr: 101N0112002	
Método: EtOH_TR_1_30min		Longitud de Onda: 586.5	
ID	Concentración mg/dL	Absorbancia	
A	0	0	
B	52.717	0.1071	
C	105.43	0.2104	
D	158.15	0.2888	
E	210.86	0.3745	
F	263.58	0.4792	
G	316.3	0.5874	

Gráfico R11.1 Curva Estándar obtenida con los valores de la Tabla R11.1

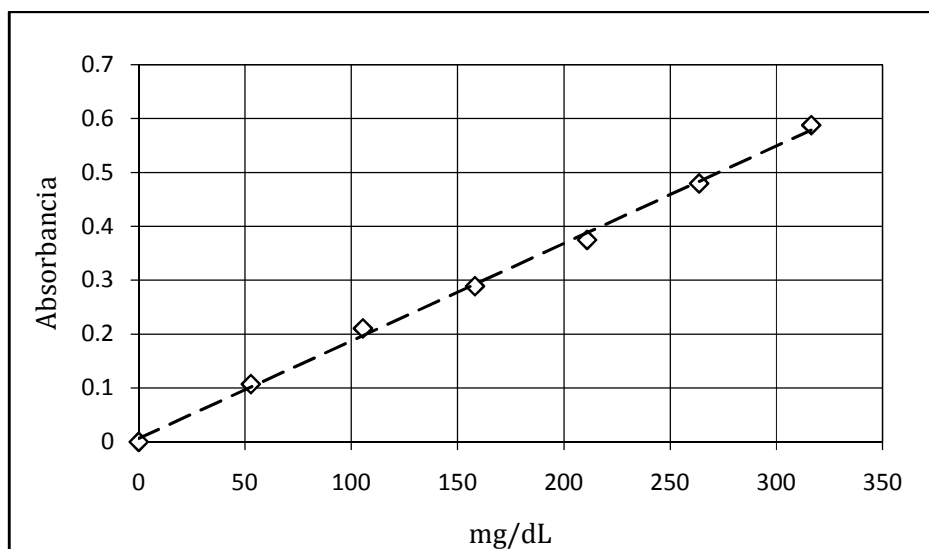


Imagen R11. Tonalidades del Dicromato de Potasio al reaccionar con etanol.



Determinación de Volumen de Muestra

Tabla R11.2 Valores obtenidos utilizando 2 mL de Muestra para la reacción con Dicromato de Potasio.

Dicromato 8.50 g/L		2 mL		Factor de Correlación: 0.9984	
Espectrofotómetro: Perkin-Elmer Lambda 40				Serie-Nr: 101N0112002	
Método: EtOH_TR_1_30min			Longitud de Onda: 586.5		
ID	Concentración mg/dL	Absorbancia			
		Replica 2	Replica 3		
A	0	0	0		
B	52.717	0.1093	0.1608		
C	105.43	0.2005	0.2814		
D	158.15	0.2989	0.4199		
E	210.86	0.3846	0.5657		
F	263.58	0.4893	0.7031		
G	316.3	0.5976	0.8293		

Gráfico R11.2 Curva Estándar obtenida con los valores de la Tabla R11.2, Replica 2.

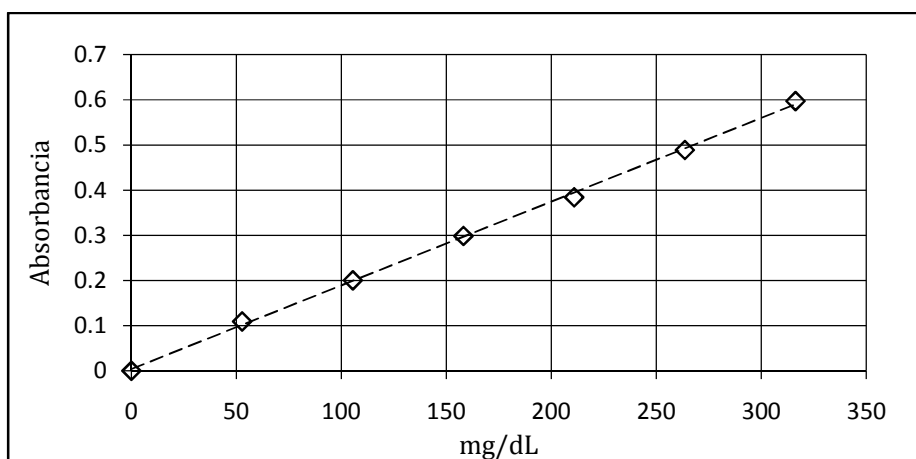
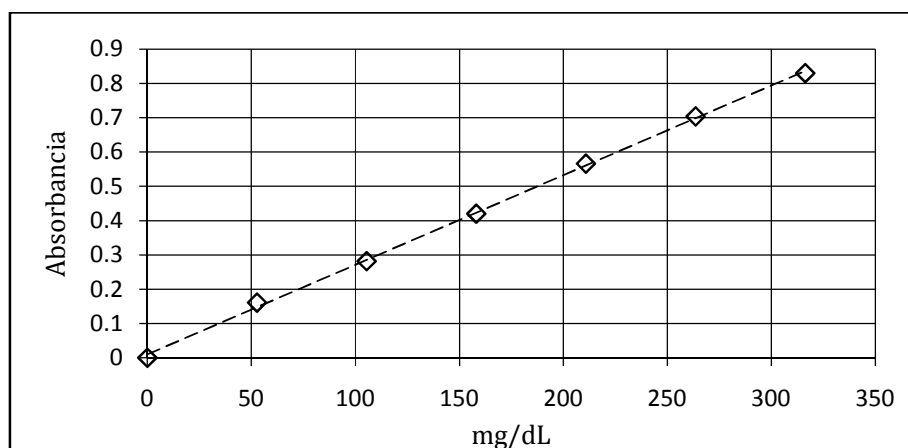


Gráfico R11.3 Curva Estándar obtenida con los valores de la Tabla R11.2, Replica 3.



Determinación de Volumen de Muestra

Tabla R12.1 Valores obtenidos utilizando 3 mL de Muestra para la reacción con Dicromato de Potasio.

Dicromato 8.50 g/L		3 mL	Factor de Correlación: 0.8558
Espectrofotómetro: Perkin-Elmer Lambda 40 Serie-Nr: 101N0112002			
Método: EtOH_TR_1_30min		Longitud de Onda: 586.5	
ID	Concentración mg/dL	Absorbancia	
A	0	0	
B	52.717	0.2308	
C	105.43	0.3720	
D	158.15	0.3897	
E	210.86	0.4337	
F	263.58	0.5599	
G	316.3	0.6745	

Gráfico R12.1 Curva Estándar obtenida con los valores de la Tabla R12.1

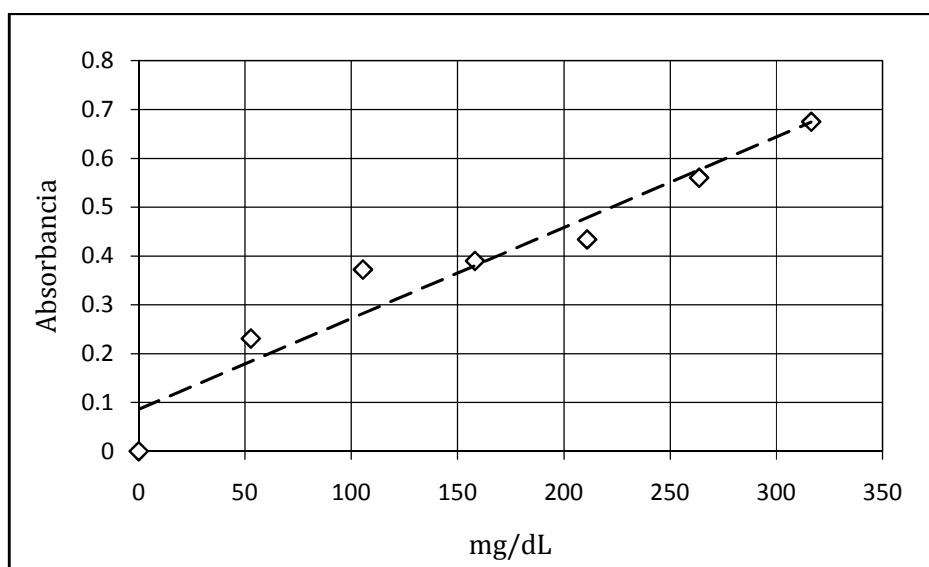


Imagen R12. Tonalidades del Dicromato de Potasio al reaccionar con etanol.



Determinación de Volumen de Muestra

Tabla R12.2 Valores obtenidos utilizando 3 mL de Muestra para la reacción con Dicromato de Potasio.

Dicromato 8.50 g/L		3 mL	Factor de Correlación: 0.8540	
Espectrofotómetro: Perkin-Elmer Lambda 40 Serie-Nr: 101N0112002				
Método: EtOH_TR_1_30min		Longitud de Onda: 586.5		
ID	Concentración mg/dL	Absorbancia		
		Replica 2	Replica 3	
A	0	0	0	
B	52.717	0.1196	0.2401	
C	105.43	0.2611	0.3832	
D	158.15	0.2786	0.4192	
E	210.86	0.3226	0.5109	
F	263.58	0.4488	0.6234	
G	316.3	0.5631	0.7145	

Gráfico R12.2 Curva Estándar obtenida con los valores de la Tabla R12.2, Replica 2.

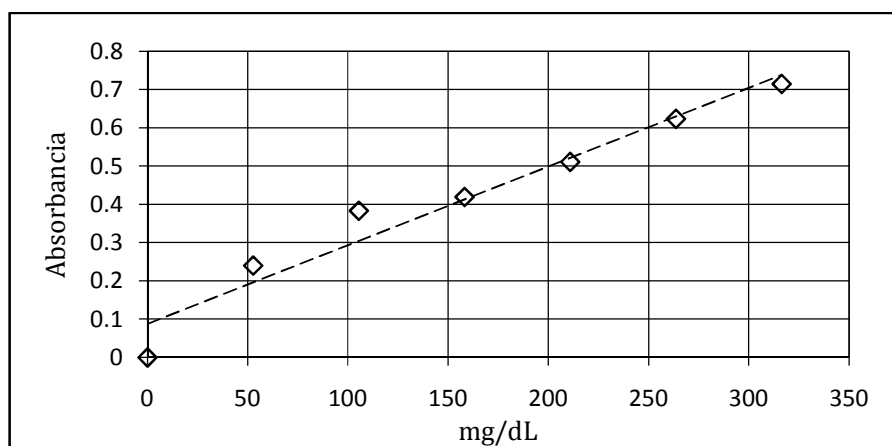
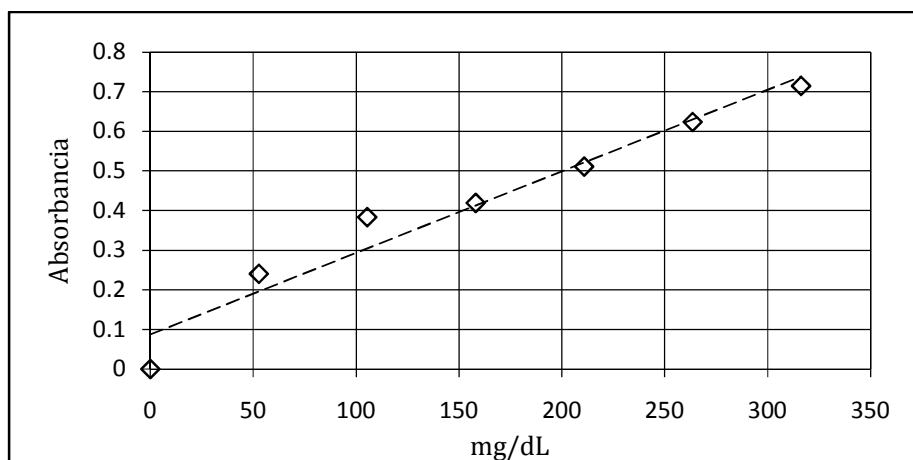


Gráfico R12.3 Curva Estándar obtenida con los valores de la Tabla R12.2, Replica 3.



Curva Estándar

Tabla R13.1 Valores obtenidos para la Curva Estándar final.

Dicromato 8.50 g/L		Factor de Correlación: 0.9985
Espectrofotómetro: Perkin-Elmer Lambda 40		Serie-Nr: 101N0112002
Método: EtOH Curva		Longitud de Onda: 586.5
ID	Concentración mg/dL	Absorbancia
A	0	0
B	52.717	0.1509
C	105.43	0.2914
D	158.15	0.4299
E	210.86	0.5757
F	263.58	0.7131
G	316.30	0.8422

Gráfico R13.1 Curva Estándar obtenida con los valores de la Tabla R13.1

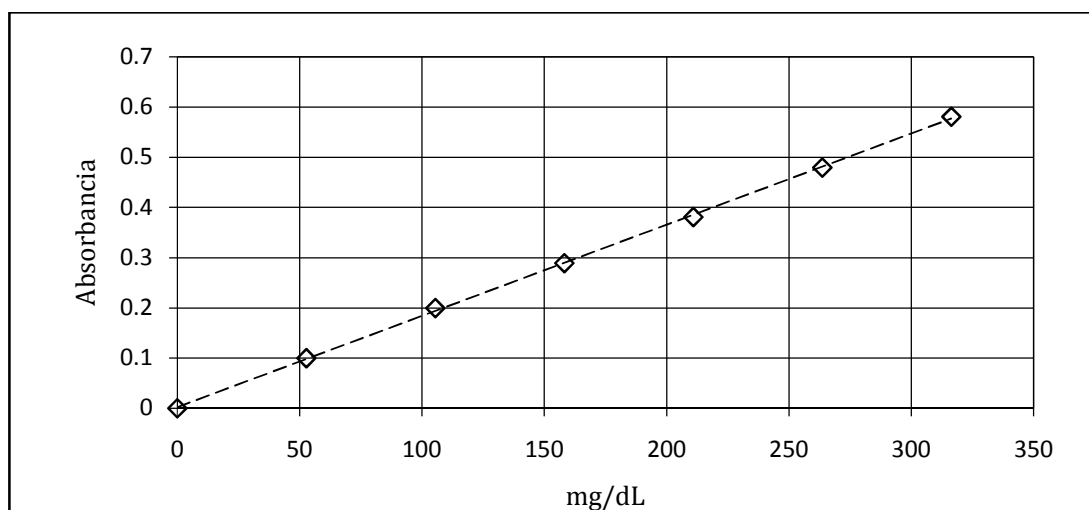


Imagen R13.1 Tonalidades del Dicromato de Potasio al reaccionar con etanol.



Curva Estándar

Tabla R13.2 Valores obtenidos para la Curva Estándar final.

Dicromato 8.50 g/L		Factor de Correlación: 0.9984	
Espectrofotómetro: Perkin-Elmer Lambda 40		Serie-Nr: 101N0112002	
Método: EtOH Curva		Longitud de Onda: 586.5	
ID	Concentración mg/dL	Absorbancia	
		Replica 2	Replica 3
A	0	0	0
B	52.717	0.0998	0.1709
C	105.43	0.1990	0.2914
D	158.15	0.2889	0.4299
E	210.86	0.3809	0.5757
F	263.58	0.4793	0.7131
G	316.30	0.5805	0.8322

Gráfico R13.2 Curva Estándar obtenida con los valores de la Tabla R13.2, Replica 2.

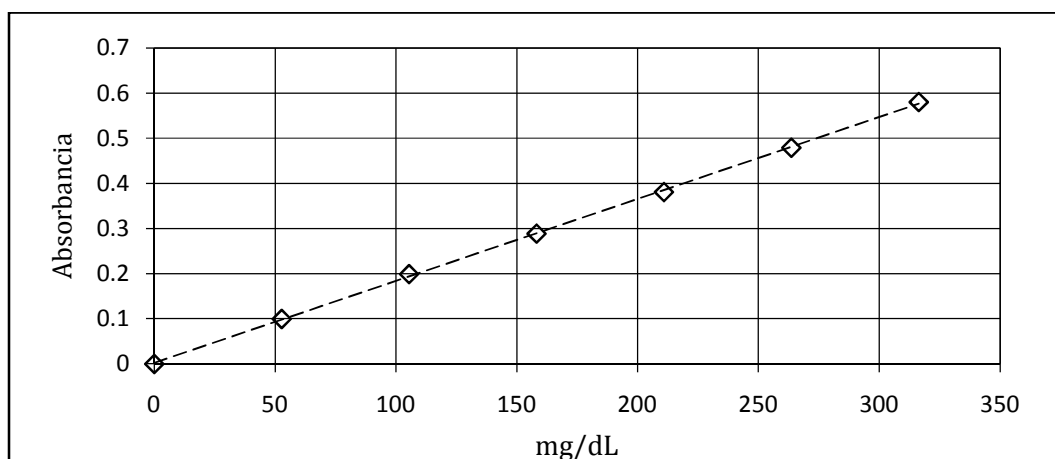
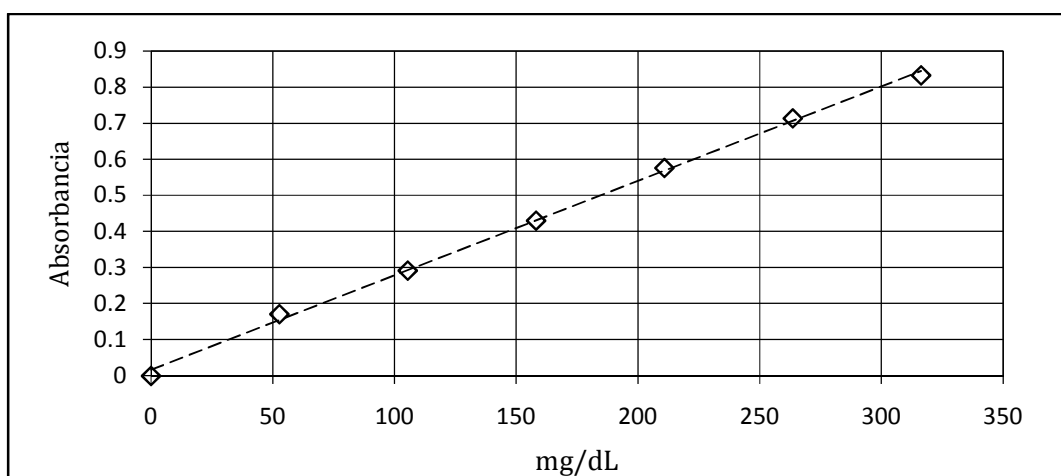


Gráfico R13.3 Curva Estándar obtenida con los valores de la Tabla R13.2, Replica 3.



Análisis de Factores que Afectan a la Concentración de Etanol

Tabla R14.1 Valores de concentración (mg/dL) en muestras recibidas en el Laboratorio de Química Forense; conservadas a 7°C.

Muestras Conservadas en Refrigeración a 7°C (Positivas)					
Día	A mg(dL)	B mg(dL)	C mg(dL)	D mg(dL)	E mg(dL)
0	180	105	218	51	255
2	188	103	220	47	254
4	193	104	219	47	254
6	—	100	220	46	253
8	—	99	222	46	256
10	—	100	220	47	256
12	—	100	220	46	257

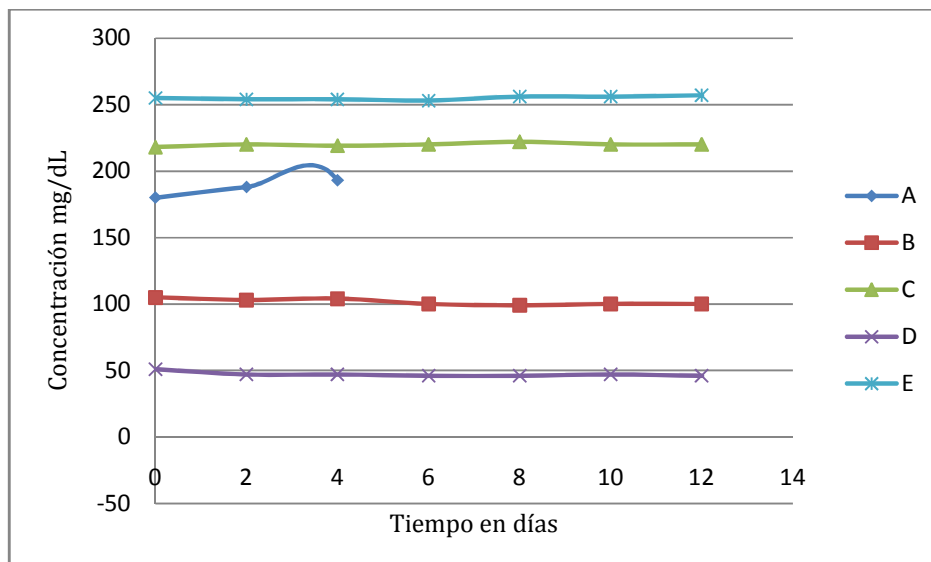
Simbología

— Muestra en estado de Putrefacción

- Disminución

+ Aumento

Gráfico R14.1 Representación del comportamiento de la concentración con respecto al tiempo.



Análisis de Factores que Afectan a la Concentración de Etanol

Tabla R14.2 Valores de concentración (mg/dL) en muestras recibidas en el Laboratorio de Química Forense; conservadas a 7°C.

Muestras Conservadas en Refrigeración a 7°C (Negativas)					
Día	A mg(dL)	B mg(dL)	C mg(dL)	D mg(dL)	E mg(dL)
0	14	6	7	12	7
2	16	4	7	12	7
4	—	5	7	11	6
6	—	6	8	10	7
8	—	7	8	9	8
10	—	7	—	10	8
12	—	—	—	—	—

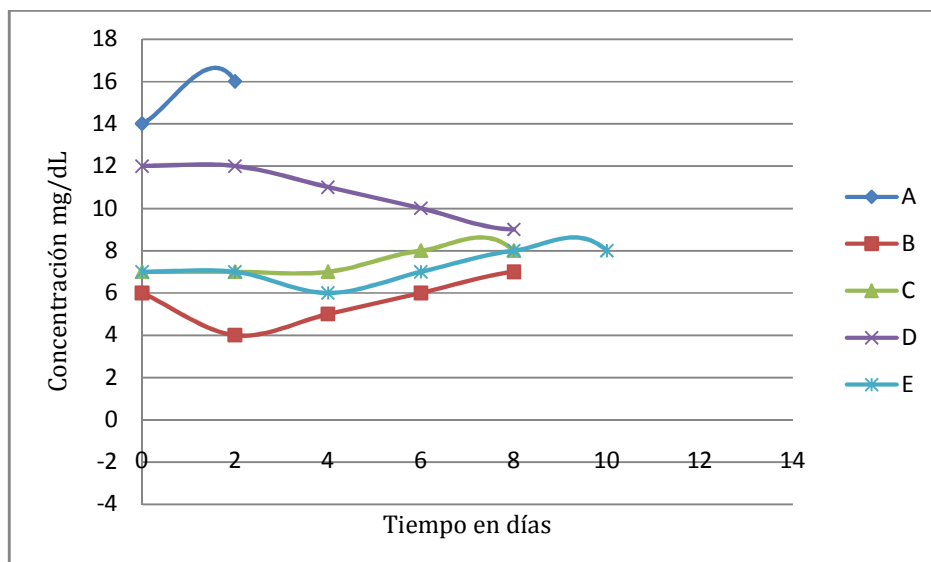
Simbología

— Muestra en estado de Putrefacción

- Disminución

+ Aumento

Gráfico R14.2 Representación del comportamiento de la concentración con respecto al tiempo.



Análisis de Factores que Afectan a la Concentración de Etanol

Tabla R15.1 Valores de concentración (mg/dL) en muestras recibidas en el Laboratorio de Química Forense; conservadas a temperatura ambiente 25°C.

Muestras Conservadas a temperatura ambiente 25°C					
Día	A mg(dL)	B mg(dL)	C mg(dL)	D mg(dL)	E mg(dL)
0	279	105	160	51	255
2	282	103	167	52	258
4	280	106	—	46	256
6	283	104	—	48	257
8	284	103	—	50	258
10	283	101	—	48	257
12	285	—	—	—	260

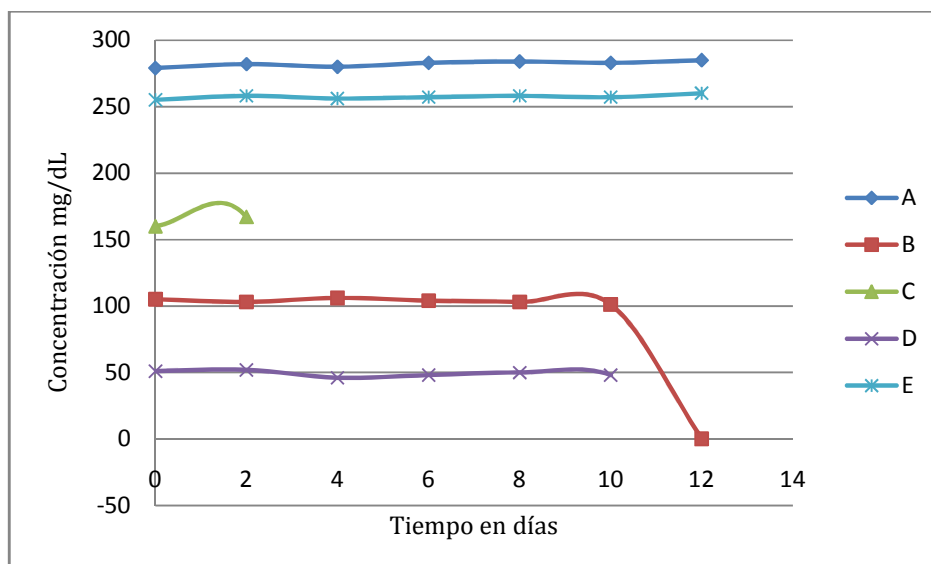
Simbología

— Muestra en estado de Putrefacción

- Disminución

+ Aumento

Gráfico R15.1 Representación del comportamiento de la concentración con respecto al tiempo.



Análisis de Factores que Afectan a la Concentración de Etanol

Tabla R15.2 Valores de concentración (mg/dL) en muestras recibidas en el Laboratorio de Química Forense; conservadas a temperatura ambiente 25°C.

Muestras Conservadas a temperatura ambiente 25°C.					
Día	A mg(dL)	B mg(dL)	C mg(dL)	D mg(dL)	E mg(dL)
0	7	6	7	9	10
2	8	8	8	12	10
4	10	8	8	13	11
6	—	7	9	13	12
8	—	9	12	13	14
10	—	9	—	15	—
12	—	10	—	—	—

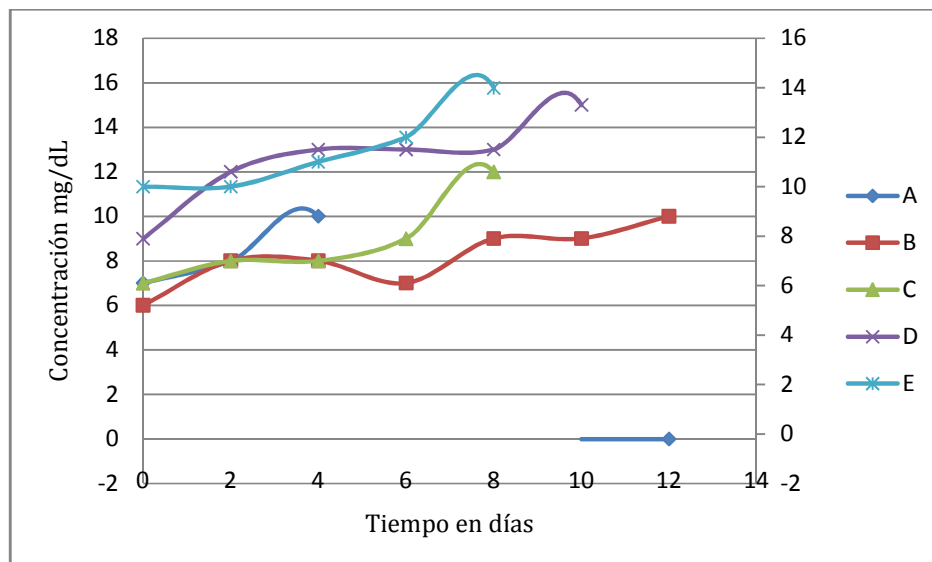
Simbología

— Muestra en estado de Putrefacción

- Disminución

+ Aumento

Gráfico R15.2 Representación del comportamiento de la concentración con respecto al tiempo.



Análisis y Discusión de Resultados

Determinación de la longitud de onda de trabajo, mediante barrido Espectral.

El punto máximo de absorbancia se encontró a 586.5 nm; el barrido se llevó a cabo usando el dicromato de potasio de concentraciones 4.5 g/L y 8.5 g/L. Se elige la longitud de onda de 586.5 nm para trabajar las curvas, ya que no se encontró diferencia significativa entre las lecturas de las dos concentraciones de dicromato de potasio.

Determinación de la concentración de Dicromato de Potasio.

Al preparar una concentración de 4.5 g/L de Dicromato de Potasio, la cual está descrita en la técnica en la que se está basando, y después de haberla hecho reaccionar en presencia de diferentes concentraciones de etanol (A, B, C, D, E, F Y G); para posteriormente leerlas, en la Tabla R2.1 se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.9694, el cual se pudiese suponer como aceptable, sin embargo, al observar el comportamiento de los datos en el Gráfico R2.1, se observa que éstos no tienen un comportamiento lineal, esto es, que no cumplen con la Ley de Beer. Por lo tanto, se procedió a preparar, a partir de esta concentración, soluciones de mayor y menor concentración (2.5 g/L, 6.5 g/L y 8.5 g/L). Al utilizar la concentración de 2.5 g/L, se observa en la Imagen R1 que las tonalidades del Dicromato de Potasio, a partir de la concentración C (105.43 mg/dL), se tornan de color azul, obteniéndose en la Tabla R1.1 un coeficiente de correlación de 0.8847, y observando en el Gráfico R1.1 de la curva que los datos a partir de esa concentración no son lineales y por lo tanto no es adecuada esa concentración de Dicromato de Potasio para los fines requeridos.

Para la concentración de 6.5 g/L, en la Tabla R3.1 se obtuvo un coeficiente de correlación promedio de 0.9851, el cual nuevamente se pudiese tomar como aceptable, posteriormente se graficó el comportamiento de los datos y se observó en la Imagen R3 que para la concentración G (316.30 mg/dL), nuevamente no tiene un comportamiento lineal, por consiguiente se decide no aceptar la concentración de 6.5 g/L.

Para el caso de la última concentración de 8.5 g/L el coeficiente de correlación promedio obtenido en la Tabla R4.1 fue de 0.9977, y como en el caso de las anteriores, se procedió a graficar los datos y para esta concentración el comportamiento de datos fue lineal como se muestra en el Gráfico R4.1, ya que al trazar una recta partiendo de cero, ésta cruzó todos los puntos, siendo esta concentración de 8.5 g/L, la que cumplió con los requisitos para ser empleada como concentración de trabajo.

Determinación de la Matriz

En lo que respecta a la determinación del tipo de matriz a emplear, se sometieron a prueba, agua destilada y solución salina; ambas obtuvieron un coeficiente de correlación promedio de 0.9957 (Tabla R5.1) en el caso del agua destilada y de 0.9975 (Tabla R6.1) cuando se empleó solución salina, de igual forma al momento de graficar los resultados de ambos casos se observó un comportamiento similar en la linealidad, lo que nos indicaría que ambas matrices

son idóneas para trabajar, pero analizando más a fondo los factores del coeficiente de correlación, se observa que el obtenido para la solución salina es mayor, este posible resultado del comportamiento de la solución de etanol en la cámara de Conway, pudo haber sido debido a que la adición de solutos a una solución, disminuye la presión de vapor; por lo tanto, al utilizar sal en solución, provoca que la evaporación y condensación del etanol sea más uniforme. Con base a lo anterior se decidió emplear solución salina para preparar las soluciones estándar, porque se observó que ésta tiene un mejor comportamiento.

Determinación del Tiempo de Reacción

Una vez determinada la concentración de trabajo, así como la matriz; se evaluó el tiempo en el cual se obtuviera un comportamiento lineal de la reacción del dicromato con el etanol, para tal fin se hicieron reaccionar los estándares de etanol con el dicromato de potasio; los tiempos a los que se sometió la reacción fueron a 30, 40 y 50 minutos. Cuando se realizó la reacción con un tiempo de 30 minutos, en la Tabla R7.1 se obtuvo un factor de correlación promedio de 0.9984 y a su vez, en el Gráfico R7.1 los datos presentaron un comportamiento lineal.

Cuando se trazó la curva para el tiempo de 40 minutos, en la Tabla R8.1 se obtuvo un coeficiente de correlación promedio de 0.9872, y en el Gráfico R8.1 se observa que el comportamiento de los datos sigue siendo lineal, sin embargo, se aprecia un desplazamiento de estos en la curva; ya que entre más prolongado sea el tiempo, más intensos serán los colores desarrollados en el dicromato de potasio y al ser leídos, el equipo asigna valores no correspondientes a la concentración.

En la curva correspondiente al tiempo de reacción de 50 minutos (Gráfico R9.1) se obtuvieron coeficientes de correlación de 0.9358, 0.9331 y 0.8879, y en las gráficas correspondientes (Gráfico R9.1, R9.2 y R9.3) no se observa un comportamiento lineal de los datos, lo anterior es debido a que las coloraciones que presenta el dicromato de potasio al finalizar la reacción en la Imagen R9.1 son muy intensas; por acción de un proceso prolongado de óxido-reducción.

Determinación del Volumen de Muestra

Una vez establecidos, la concentración de dicromato de potasio, la matriz y el tiempo de reacción; se evaluó el volumen de muestra necesario para llevar a cabo la reacción con los mejores resultados. En las determinaciones anteriores se utilizaron 2 mL como volumen de muestra; sin embargo se evaluaron los resultados obtenidos con volúmenes de 1 y 3 mL, para determinar si había una mejoría en la linealidad o de otra manera, descartar el uso de volúmenes diferentes. Cuando se utilizó 1 mL de muestra, en la Tabla R 10.1 se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.9934, habiendo ligeras descentralizaciones de los puntos a lo largo de la recta, lo cual no ocurre con los Gráficos R 11.1, 11.2 y 11.3, obtenidos utilizando 2 mL de muestra, ya que la linealidad en estas se mantiene a lo largo de la recta y tienen un coeficiente de correlación promedio de 0.9984. Las gráficas obtenidas usando 3 mL (Gráfico R12.1), no presentan linealidad y en la Tabla R12.1, 12.2 y 12.3 tienen un coeficiente de correlación de 0.8558.

Factores que afectan a la concentración de etanol

Una vez que se establecieron los parámetros de trabajo para la cuantificación de etanol, se emplearon muestras de sangre remitidas al Laboratorio de Química Forense, las cuales se sometieron a dos condiciones diferentes, éstas consistieron en refrigeración a 7°C y a temperatura ambiente; haciéndose mediciones de las mismas, desde la recepción de la muestra hasta por un período de 12 días, en intervalos de 48 horas. En dichas muestras, el resultado se vio afectado tanto por el procedimiento de almacenamiento, así como también por el tiempo, provocando que hubiese incrementos y decrementos de las concentraciones iniciales de alcohol. Lo cual sucede probablemente por la volatilización del etanol ó por la producción metabólica de la actividad microbiana.

Conclusiones

La técnica para la identificación de etanol con la reacción de dicromato de potasio, es una técnica que por sus características en sus inicios cumplía con las necesidades requeridas, por lo tanto, al retomar dicha técnica para un trabajo de rutina fue necesario establecer nuevos parámetros y condiciones, que se adecuaron a las necesidades actuales de trabajo, las cuales consistieron en determinar la concentración de dicromato de potasio, el tipo de matriz, el tiempo de reacción, volumen de muestra, volumen de dicromato de potasio y la longitud de onda.

Con base a lo anterior se estableció como longitud de onda de trabajo 586.5 nm; la concentración de dicromato de potasio de 8.5 g/L, solución salina como matriz, un tiempo de reacción de 30 minutos, volumen de dicromato de potasio de 4 mL y el volumen de muestra de 2 mL; al correr la curva con estas condiciones, se obtuvo un coeficiente de correlación promedio de 0.9985; y en las gráficas un comportamiento lineal de los datos, por lo tanto se puede asegurar que éstas son las condiciones ideales de trabajo para ésta técnica; ya que a partir de esto se obtienen datos de concentración de alcohol obtenidos mediante el apoyo de un equipo instrumental y ya no por criterios basados en los sentidos.

En las determinaciones de la concentración de etanol en las muestras de sangre remitidas al Laboratorio de Química Forense; se apreció que se ve significativamente afectada la concentración y por consiguiente la determinación de alcohol; ya que si no se tiene una conservación y embalaje adecuado, la muestra por sus características propias de origen biológico, por las condiciones en las cuales se recolecta y sobre todo por ser muestras, el cual su origen es de personas que fallecen de muerte violenta en circunstancias extremas; es muy probable que se vea afectada la concentración de alcohol, pudiéndose emitir resultados falsos negativos o falsos positivos.

Referencias Bibliográficas

1. Estadística Anual de Libro de Gobierno del Área de Química Forense, con sede en Texcoco en el periodo del 2007 al 2008.
2. Vogt E. El Vino: Obtención, Elaboración y Análisis. 9ª ed. España: Acriba; 1986.
3. Aleixandre J. La Cultura del Vino, Cata y Degustación. 3ª ed Valencia: Universidad Politécnica; 2003.
4. Vincent M. Química Industrial Orgánica. 2ª ed. Valencia: Universidad Politécnica; 2006.
5. Blouin J. Enología Práctica: Conocimiento y Elaboración del Vino. 4ª ed. España: Mundi-Prensa; 2003.
6. Bataller R. Toxicología Clínica en medicina interna y general. 2ª ed. Valencia: Universitat de València; 2004.
7. Citamedica.com. Fórmula para Calcular el Grado de Alcoholemia. Citamedica.com; 2000 [actualización 03 de Agosto de 2008, acceso 23 de Abril de 2009]. Disponible en: www.citamedica.com/alcoholemia.htm
8. Secretaría de Salud. Agenda de Salud. 5ª ed. México: Ediciones Fiscales; 2004.
9. H. Congreso de la Unión. Reglamento de Tránsito Metropolitano. México: Sista; 2007.
10. Vargas E. Medicina Forense y Deontología Médica. 4ª ed México: Trillas; 1991.
11. Saferstein R. Criminalities: an Introduction to Forensic Science. 8ª ed. New Jersey: Pearson Hall; 2004.
12. Secretaría de Salud. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. Vol. 2. 8ª ed. México: SSA; 2004.
13. Secretaría de Salud. Norma Oficial Mexicana NOM-028-SSA2-1999; Para la prevención, tratamiento y control de las adicciones. México: SSA; 1999.
14. Secretaría de Salud. Norma Oficial Mexicana NOM-047-SSA1-1993; Establece los límites biológicos máximos permisibles de disolventes orgánicos en el personal ocupacionalmente expuesto. México: SSA; 1994.

15. Morini L, Politi L, Poletini A. Ethyl glucuronide in hair. A sensitive and specific marker of chronic heavy drinking. *Addiction*. 2009; 104(6):915-20.
16. Clarke E. Isolation and Identification of Drugs and poisons. 2^a ed. Londres: The Pharmaceutical Press; 1986.
17. Wexler P. Encyclopedia of Toxicology. Vol. I. USA: Academic Press; 1998.
18. Calabuig G. Medicina Legal y Toxicología. 6^a ed. España: Masson; 2004.
19. Goodman G. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 2^a ed. México: McGraw Hill Interamericana; 1996.
20. Kugelberg F, Jones A. Interpreting results of ethanol analysis in postmortem specimens: a review of the literature. *Forensic Sci Int*. 2007; 165(1):10-29.
21. Dettling A, Skopp G, Graw M, Haffner T. The influence of sex hormones on the elimination kinetics of ethanol. *Forensic Sci Int*. 2008; 177(2-3):85-9.
22. Hoisetha G, Morinib L, Polettinic A, Christophersena A, Morland J. Blood kinetics of ethyl glucuronide and ethyl sulphate in heavy drinkers during alcohol detoxification. *Forensic Sci Int*. 2009; 188(1-3):52-6.
23. Martinis B, Paula C, Braga A, Moreira H, Martin C. Alcohol Distribution in Different Postmortem Body Fluids. *Hum Exp Toxicol*. 2006; 25(2):93-7.
24. Lewis R, Johnson R, Angier M, Nicole T. Ethanol formation in unadulterated postmortem tissues. *Forensic Sci Int*. 2004; 146(1):17-24.
25. Pavlic M, Grubwieser P, Libiseller K, Rabl W. Elimination rates of breath alcohol. *Forensic Sci Int*. 2007; 171(1):16-21.
26. Ayres G. Análisis Químico Cuantitativo. 4^a ed. México: Harla; 1990.
27. Espectrometría.com. Espectrometría Ultravioleta-Visible. EUA: Espectrometría.com; 2002 [acceso 09 de Mayo de 2009]. Disponible en: <http://www.espectrometria.com>
28. Faculty.uca.edu. Introduction to Spectrophotometry. EUA: University of Central Arkansas; 2008 [acceso 09 de Mayo de 2009]. Disponible en: <http://faculty.uca.edu/>
29. Harris D. Análisis Químico Cuantitativo. 3^a ed. España: Reverté; 2006.
30. Skoog D. Principios de Análisis Instrumental. 5^a ed. Argentina: McGraw Hill; 2001.