

UNIVERSIDAD DE CUENCA



FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

CARRERA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO PARA ALCOHOLEMIAS POR
CROMATOGRFÍA DE GASES”**

**TESIS PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE BIOQUÍMICA FARMACÉUTICA**

AUTORAS: DIANA ESTEFANÍA NARVÁEZ CHACÓN

NANCY YOLANDA QUITO UCHO

DIRECTORA: SILVIA JOHANA ORTIZ ULLOA, Ph.D.

ASESOR: DR. MANUEL GUILLERMO VEGA CUESTA

CUENCA-ECUADOR

2015

RESUMEN

La ingesta de etanol se ha relacionado a consecuencias lamentables a nivel social, familiar y jurídico; siendo importante el desarrollo de métodos de detección de etanol en sangre, prueba más confiable a nivel cuantitativo.

En el presente trabajo se realizó la primera fase de la optimización de un método para el análisis de alcoholemia por cromatografía de gases con inyección directa y detección de ionización de llama (GC-FID). Se realizó la optimización de algunos parámetros cualitativos y cuantitativos, incluyendo tiempos de retención estables, selectividad del método demostrado por la ausencia de sustancias interferentes en el análisis; linealidad a bajos niveles con un coeficiente de determinación de $R^2 = 0.996$. La aplicabilidad del método en un pool de 33 muestras con distintas concentraciones de etanol tomadas como puntos de referencia de baja, media y alta concentración. La cuantificación se realizó por estandarización interna mediante el uso de un estándar interno (n-butanol) y la estandarización externa mediante la curva de calibración a 4 niveles.

Palabras claves: Alcoholemia, cromatografía de gases, ionización de llama, optimización.

ABSTRACT

The ethanol intake has been linked to unfortunate consequences at the social level, family and legal; remain important the development of methods for the detection of ethanol in blood, more reliable test at quantitative level.

In the present work was realized the first phase of the optimization of a method for the alcoholemia analysis by gas chromatography with direct injection and detection of ionization of flame (GC-FID). There was realized the optimization of some qualitative and quantitative parameters, including stable retention times, selectivity of the method demonstrated by the absence of interfering substances in the analysis; linearity at low levels with a coefficient of determination $R^2 = 0,996$. The applicability of the method in a grouping of 33 samples with different taken ethanol concentrations how points of reference of low, average and high concentration. The quantification was carried out by internal standardization through the use of an internal standard (n-butanol) and the external standardization through the calibration curve to 4 levels.

Key Words: alcohol, gas chromatography, flame ionization, optimization



INDICE

RESUMEN	2
ABSTRACT	3
CLÁUSULA DE DERECHOS DE AUTOR	7
CLÁUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL	9
AGRADECIMIENTOS	11
DEDICATORIA	12
INTRODUCCIÓN	14
1. MARCO TEÓRICO	15
1.1 Alcoholemia	15
1.1.1 Manifestaciones tóxicas del alcohol etílico.	16
1.2 Fundamentación Legal	17
1.3 Métodos analíticos de determinación de alcohol en sangre	18
1.4 Cromatografía de gases	19
1.4.1 Sistema neumático.	20
1.4.2 Gas portador.	20
1.4.3 Filtros de oxígeno.	21
1.4.4 Inyector.	21
1.4.5 Columna cromatográfica.	22
1.4.6 Horno de la columna.	22
1.4.7 Sistemas de detección	22
1.4.7.1 Detector de ionización de llama (FID).	22
1.4.8 Sistema informático.	23
1.5 Análisis de datos cromatográficos.....	23
1.5.1 Aspectos cualitativos.....	23
1.5.2 Análisis cuantitativo.....	24
1.5.2.1 Método estándar externo.....	24
1.5.2.2 Método de estándar interno	25
1.5.2.3 Normalización del área.	26
1.5.2.4 Factor de respuesta.	26
1.6 Determinación de alcohol en otros fluidos corporales	27
1.6.1 Análisis de alcohol en orina.....	27
1.6.2 Análisis de alcohol en la saliva.	28
1.6.3 Análisis de alcohol en el líquido cerebral.....	29
1.6.4 Análisis de alcohol en el humor vítreo.	29
1.6.5 Análisis de alcohol en el aire espirado.....	29



1.6.6 Análisis de alcoholemias por cromatografía de gases.	30
2. METODOLOGÍA	32
2.1 Tipo de estudio	32
2.2 Análisis cromatográfico	32
2.2.1 Materiales, equipos y reactivos	32
2.2.2 Instrumentación.	32
2.2.3 Preparación de estándares y curvas de calibración.....	33
2.2.4 Optimización del método.	34
2.2.4.1 Tratamiento de muestras.	34
2.2.4.2 Linealidad.	35
2.2.4.3 Selectividad.	35
2.2.5 Aplicabilidad del método.....	35
2.2.5.1 Toma de muestras sanguíneas.	36
2.2.5.2 Procesamiento y análisis de datos.	36
3. RESULTADOS.....	37
3.1 Optimización del tratamiento de la muestra	37
3.2 Optimización de los parámetros cromatográficos.....	37
3.2.1 Parámetros cualitativos.	37
3.2.2 Parámetros cuantitativos.	38
3.3 <i>Aplicabilidad en pool de muestras sanguíneas</i>	40
4. DISCUSIÓN	44
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	46
5.1 Conclusiones	46
5.2 Recomendaciones	46
REFERENCIAS	47

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Áreas y concentraciones del pool de muestras de sangre de alta, media y baja concentración de etanol	33
Tabla 2 Concentraciones del etanol y n-butanol.....	34
Tabla 3 Áreas y concentraciones de los estándares en la curva de calibración de etanol con estándar interno.	39
Tabla 4 Áreas y concentraciones del pool de muestras de sangre de alta, media y baja concentración de etanol	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Esquema del cromatógrafo de gases.	20
Figura 2 Detector de ionización de flama.	23
Figura 3. Cromatograma del análisis de etanol en sangre a una concentración de 0,15 g/L de etanol y 8,1 g/L de n-butanol	38
Figura 4 Curva de calibración para el etanol/n-butanol.....	39



CLÁUSULA DE DERECHOS DE AUTOR

Cláusula de derechos de autor

Yo Diana Estefanía Narváez Chacón, autora de la tesis "**ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO PARA ALCOHOLEMIAS POR CROMATOGRFÍA DE GASES**", reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Bioquímica Farmacéutica. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autora.

Cuenca, 15 de mayo del 2015

Diana Estefanía Narváez Chacón

C.I: 0106542806

Cláusula de derechos de autor

Yo Nancy Yolanda Quito Ucho, autora de la tesis "**ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO PARA ALCOHOLEMIAS POR CROMATOGRFÍA DE GASES**", reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Bioquímica Farmacéutica. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autora.

Cuenca, 15 de mayo del 2015



Nancy Yolanda Quito Ucho

C.I: 0105014468



CLÁUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL

Cláusula de propiedad intelectual

Yo, Diana Estefanía Narváez Chacón autora de la tesis "**ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO PARA ALCOHOLEMIAS POR CROMATOGRFÍA DE GASES**", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 15 de mayo del 2015

Diana Estefanía Narváez Chacón

C.I: 0106542806



Cláusula de propiedad intelectual

Yo Nancy Yolanda Quito Ucho, autora de la tesis "**ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO PARA ALCOHOLEMIAS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES**", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 15 de mayo del 2015

Nancy Yolanda Quito Ucho

C.I: 0105014468

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo queremos agradecer en primer a Dios y a la Virgen María por llenarnos de sabiduría, bendiciones y fortaleza para superar obstáculos y dificultades en la elaboración de este trabajo y porque nos permitieron realizar este sueño anhelado.

También queremos agradecer a Dios de una manera especial por poner al frente de este trabajo a nuestra Directora Johana Ortiz Ulloa Ph.D, quién con su sabiduría, paciencia, esfuerzo y tiempo ha sabido guiarnos y motivarnos de la mejor manera para la realización de este sueño.

Al Dr. Manuel Vega, por su apoyo, tiempo, dedicación y orientación que ha importante para este trabajo

A nuestras familias, quienes han sido motivación durante las largas noches de estudio, en los momentos de alegría y tristeza durante la carrera estudiantil y elaboración de este proyecto.

A la Universidad de Cuenca, y a su vez a la Facultad de Ciencias Químicas que nos han brindado y dado las oportunidades necesarias para poder formarnos profesionalmente.

Como no agradecer a nuestra querida Escuela de Bioquímica y Farmacia y a todos nuestros docentes quienes con esmero y dedicación nos han enseñado más que materias nos han enseñado la verdadera ciencia de la vida.

DEDICATORIA

Quiero dedicar esta meta alcanzada a Dios, por haberme dado la oportunidad de cumplir un sueño, por brindarme amor en todos los momentos de mi vida y haberme permitido llevar conmigo experiencias, alegrías, desvelos, logros, amigos, a lo largo de mi carrera estudiantil.

También quiero dedicar este trabajo a mi mami Beatriz Chacón, quién con su amor, apoyo, fortaleza y trabajo supo ser un pilar y motivación para cumplir cada una de mis metas.

A mis abuelitos Alipio y Rosario, quienes fueron ejemplo de superación, ayuda en cada uno de los momentos de mi vida estudiantil

A mi tías Piedad, y Blanca, quienes con su amor y alegría, supieron motivarme en los momentos de alegría y dificultad.

A mis hermanas Andrea, Silvia, Gaby, por apoyarme en cada uno de los momentos de mi vida, y por ser ejemplo para mí.

A mis sobrinos por su alegría y amor que llenan mi vida.

A todos mis amigos, quienes de una u otra manera compartieron grandes momentos juntos, y me ayudaron para alcanzar esta meta.

A mi amiga Nancy Quito, que con su comprensión y esfuerzo pudimos realizar este trabajo.

Diana Narváez

DEDICATORIA

A Dios por haberme dado la sabiduría y las fuerzas necesarias para cumplir una de mis metas y permitirme llegar a este momento tan especial en mi vida.

A mis padres quienes han sido el pilar más importante y me han demostrado siempre su cariño y apoyo incondicional; con sus consejos me han sabido guiar para culminar mi carrera profesional.

A mi esposo, por acompañarme durante este arduo camino y compartir alegrías, fracasos y demostrarme que siempre podré contar con él.

A mí más apreciado tesoro Belén quien con su ternura fue mi estímulo y motivo para continuar.

A mi familia en general, porque me han brindado su apoyo incondicional y por compartir conmigo buenos y malos momentos.

A mi compañera de tesis Diana que a pesar de varios obstáculos que se nos presentó logramos terminar este proyecto.

Nancy Quito.

INTRODUCCIÓN

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), Ecuador en el 2013, fue el segundo país en América Latina con mayor consumo de alcohol per cápita correspondiente a un promedio 9,4 litros de alcohol por habitante al año. Según la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (2012), la edad de inicio de consumo de alcohol es de 13 a 15 años y se lo ha relacionado a consecuencias lamentables que incluyen la participación en escándalos, agresiones, alteraciones psicosociales, enfermedades, accidentes de tránsito, violencia intrafamiliar y muerte (Rosero, 2014). Además, según la Agencia Nacional de Tránsito, la embriaguez es la quinta causa probable de siniestros a nivel nacional.

La evaluación de la ingesta de alcohol inicia con pruebas físicas de equilibrio, coordinación y percepción espacial; pero esta relación es difícilmente cuantificable. Otra opción es la aplicación de la prueba de alcoholemia determinando el etanol expirado (alcohol sensor), la cual es una prueba poco confiable a nivel cuantitativo por lo que la prueba de mayor utilidad en toxicología forense y en tribunales de justicia es la determinación de etanol en sangre por cromatografía de gases que permite la detección y cuantificación de etanol de una manera rápida, precisa y sensible (Henao & Vaca, 2010). En el presente trabajo de tesis, se presenta la primera fase de la optimización de un método analítico por cromatografía de gases con inyección directa y detección de ionización a la llama (GC-FID) para el análisis de etanol en sangre para su posterior validación y estandarización en el laboratorio de Análisis Instrumental de la Facultad de Ciencias Químicas.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Alcholemla

Alcholemla es la presencia pasajera de alcohol en sangre como consecuencia de la ingestión de bebidas alcohólicas o subproducto del metabolismo. Su medición implica la determinación cuantitativa de la concentración de alcohol etílico expresado en gramos por litro de sangre en un individuo (Téllez, 2002), (Silva, 1995).

En bebedores habituales manifiestan los efectos tóxicos del etanol a concentraciones de sangre superiores a las de los niños o a las de adultos bebedores esporádicos. El etanol se elimina en los no bebedores habituales a una velocidad de 15 – 20 mg/100 ml/h, conocido como etiloxidación, siendo necesario de 6-7 horas para que la alcholemla disminuya en 100 mg/ dl. En los alcohólicos o bebedores habituales la velocidad de eliminación alcanza un promedio de 25–35 mg/100ml/h) (Bataller, 2004)

En individuos no bebedores, la alcholemla oscila entre 0 y 0,03 g/L, a lo que se denomina alcohol endógeno y se debe a la fermentación intestinal de la peptina y a la reducción de acetaldehído de otras procedencias. Además, estados de infección intestinal y la ingesta de comidas ricas en carbohidratos pueden conllevar a elevar el alcohol endógeno (Camean, y otros, 1995), (Bataller, 2004).

La alcholemla suele alcanzar su punto máximo entre los 30 y 90 minutos después de haber ingerido alcohol etílico (Camean, y otros, 1995) y comienza a descender a una tasa de 0,15 gramos por hora. Esta tasa es variable de persona a persona y también depende de la actividad física de la persona luego de haber ingerido alcohol etílico(Silva, 1995).

1.1.1 Manifestaciones tóxicas del alcohol etílico. La clásica exteriorización del alcoholismo agudo es la ebriedad (Buzzo & Soria, 1960). Los efectos tóxicos del etanol radican en la depresión de las funciones del Sistema nervioso, produciendo una correlación proporcional entre los efectos depresores y la concentración de alcohol en sangre central (Bataller, 2004). Así hablamos de intoxicación:

1) Ligera (Concentración de etanol en sangre de 0,5 - 1,5 g/L): Caracterizada por locuacidad, alegría transitoria, ligera falta de coordinación muscular (Bataller, 2004). Además se presenta un estado psíquico de extroversión más o menos exagerada (Buzzo & Soria, 1960).

2) Moderada (Concentración de etanol en sangre de 1,5 – 3 g/L): Se caracteriza por la disminución de las facultades intelectuales superiores (conducta), falta de autocontrol, excitación sexual psíquica sin aumento de la potencia genital, incoordinación de movimientos (Buzzo & Soria, 1960). Además presenta trastorno de la visión, pérdida sensorial, coordinación motora (Bataller, 2004) .

3) Grave (Concentración de etanol en sangre de 3 – 5 g/L): Caracterizado por trastorno falta de coordinación muscular, visión borrosa, estado de conciencia próximo al estupor. En ocasiones se puede presentar hipoglucemia grave con hipotermia, desviación conjugada de los ojos (Bataller, 2004).

4) Coma alcohólico (Concentración superior a 5 g/L): Caracterizada por inconsciencia, respiración lenta, hiporreflexia, pérdida de la sensibilidad y, con frecuencia fallecimiento del paciente. En general los pacientes en coma alcohólico, pueden desarrollar hipotermia, hipoventilación, acidosis metabólica (Bataller, 2004).

1.2 Fundamentación Legal

Entre las varias consecuencias que trae consigo el consumo de alcohol, los accidentes de tránsito constituyen uno de los principales problemas y causas de muerte en el Ecuador. Según Juan Manuel Leño, especialista de Transporte del Banco Interamericano para el Desarrollo (BID) Ecuador, es el segundo país con más accidentes de tránsito por consumo de alcohol.

En el marco legal de la constitución de la República del Ecuador en el Artículo 364 se establece la responsabilidad del estado a desarrollar programas de información, prevención, control, tratamiento y rehabilitación para consumidores de etanol, tabaco y sustancias estupefacientes y psicotrópicas (Constitucion de la Republica del Ecuador, 2008).

Las siguientes normativas hacen referencia específica a la alcoholemia y sus consecuencias (Ley Orgánica de Transporte Terrestre Tránsito y Seguridad Vial, 2014):

- La ley de tránsito (Art. 145.2) quien condujera en estado de embriaguez, será sancionado de acuerdo a la siguiente escala:
 - a. Si el nivel de alcohol por litro de sangre excede de 0,3 gramos y es inferior a 0,8 gramos, se aplicará la multa de una remuneración básica del trabajador en general, pérdida de cinco puntos en su licencia de conducir y cinco días de prisión.
 - b. Si el nivel de alcohol por litro de sangre es de 0,8 gramos o más, se aplicará la multa de una remuneración básica del trabajador en general, pérdida diez puntos en su licencia de conducir y quince días de prisión.
- De las pruebas y su valoración (Art. 150), cuando un agente de tránsito presuma que quien conduce un vehículo se encuentra en estado de embriaguez, procederá a realizar de inmediato el examen de alcohotest. Para el efecto, los agentes portarán un alcoholímetro. No obstante, si fuere posible, se prefieren los exámenes de sangre y de orina en una clínica, hospital o cualquier otro establecimiento médico o laboratorio de análisis clínico.

- La ley de tránsito y transporte terrestre (Art. 151), cuando producido un accidente de tránsito se presume que quién lo causó se encontraba en estado de embriaguez, se procederá a realizar de inmediato los exámenes de alcoholemia. Si las condiciones físicas del causante del accidente imposibilitan realizar las mencionadas pruebas, el agente que toma procedimiento acompañará el traslado del herido a una clínica, hospital u otro establecimiento médico, en donde se le realizará los exámenes correspondientes.
- En el juzgamiento de los delitos de tránsito (Art. 153), se ordenará la prisión preventiva del imputado y el retiro de su licencia de conducir vehículos a motor. Se ordenará también la prohibición de enajenar del vehículo con el que se ocasionó el accidente, fuere o no su propietario el conductor, para efecto de la responsabilidad civil pertinente.
- De los delitos de tránsito (Art. 126), quien conduciendo un vehículo en estado de embriaguez, ocasionare un accidente de tránsito del que resultaren muertas una o más personas será sancionado con reclusión mayor ordinaria de ocho a doce años, revocatoria definitiva de la licencia para conducir vehículos y multa equivalente a treinta remuneraciones básicas unificadas del trabajador en general.
- De los delitos de tránsito (Art. 126.1), será sancionado con prisión de cuatro a cinco años quien conduzca un vehículo en estado de embriaguez y que ocasionare un accidente de tránsito del que resulten una o más personas lesionadas con incapacidad laboral superior a noventa días (Ley Orgánica de Transporte Terrestre Tránsito y Seguridad Vial, 2014).

1.3 Métodos analíticos de determinación de alcohol en sangre

Existen varios métodos para la determinación de alcohol en la sangre que incluyen métodos enzimáticos, de microdifusión (los más antiguos) y de cromatografía de gases.

Los métodos enzimáticos y los de microdifusión no son específicos ya que existen interferencia con todas las sustancias volátiles de carácter reductor;

además tienen baja velocidad de reacción por lo que dan resultados inciertos (Ferrari, 2008). Particularmente, el método enzimático se basa en la reacción con la enzima alcohol deshidrogenasa (no es específica para el etanol) (Repetto, 1995). Por su parte, el método de microdifusión se basa en una reacción de óxido-reducción, en la que el alcohol presente en la muestra se difunde y reacciona con el agente oxidante (mezcla sulfocrómica) cambiando de color naranja a verde manzana. El exceso de dicromato de la muestra es leído espectrofotométricamente y corregido con el blanco de prueba. La sensibilidad de éste método es de 30 mg / 100 ml (Uribe, 2013).

En la actualidad, el método cromatográfico es de mayor aceptación, pues es muy sensible, versátil, de excelente precisión y exactitud, el cuál es en él que se basa el presente trabajo.

1.4 Cromatografía de gases

La cromatografía de gases (GC) es la técnica analítica de separación de compuestos que permite la identificación, purificación y cuantificación de los componentes fundamentado en las diferencias de volatilidad y solubilidad de la mezcla de los solutos a separar. Está técnica ofrece mejor poder de resolución para compuestos orgánicos volátiles siendo considerada como una de las técnicas más sensibles. Su principal limitación se encuentra en labilidad térmica de los analitos, los cuales deben ser estables a la temperatura requerida para su volatilización (Varcancel & Gomez, 1988).

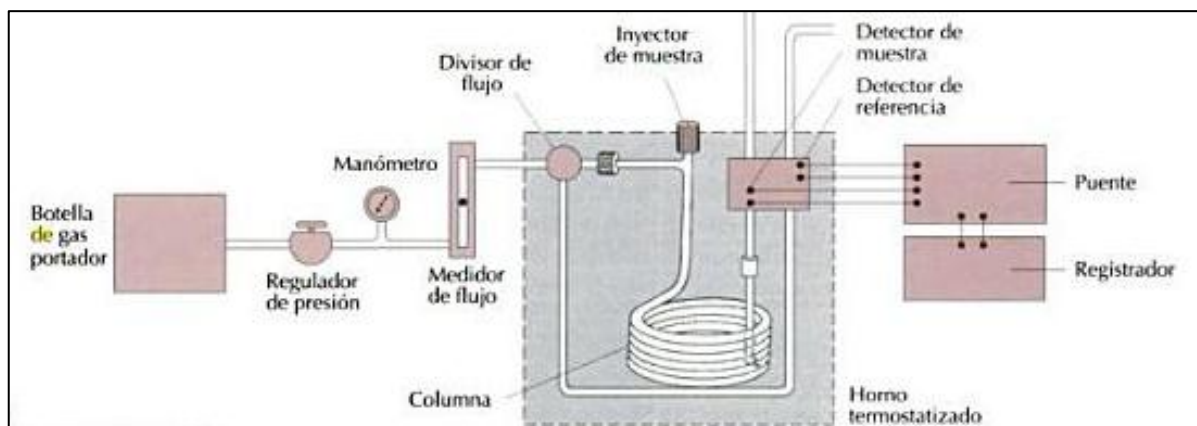
En la cromatografía de gases la fase móvil es un gas, mientras que la fase estacionaria puede ser: (a) un sólido adsorbente, o (b) un líquido retenido en un soporte sólido (columna empaquetada) o en las paredes de un capilar (columna capilar).

Los componentes básicos de un cromatógrafo de gases son: (Figura 1)

- Sistema neumático
- Gas portador
- Filtros de oxígeno y humedad
- Inyector
- Columna cromatográfica

- Horno de la columna
- Sistema de detección
- Sistema informático

Figura 1 Esquema del cromatógrafo de gases.



Fuente: (Skoog A., Vest M. , & Holler, 2001)

1.4.1 Sistema neumático. Está compuesto por los gases que alimentan al sistema cromatográfico, manómetros y válvulas reguladoras de los cilindros de gas. Los manómetros y válvulas que controlan y regulan la entrada de los gases al sistema. La presión interna de un cilindro de gas suele estar por encima de 200 lbs/ pulg² (psi), y debe ser reducido a las presiones de entrada que están entre 10 psi y 50 psi (Barquero, 2006).

1.4.2 Gas portador. Los gases portadores que se usan comúnmente son: helio, nitrógeno y el hidrogeno. El grado de pureza de estos gases debe ser de 99,99% (Barquero Quirós, 2006). Este grado de pureza asegura que no haya impurezas que originan ruido en la línea base, causando a su vez una disminución de la sensibilidad y los límites de detección de la separación (Linde, 2001).

La función del gas portador es la de transportar el analito a través de la fase estacionaria por lo que deberá ser inerte tanto con el analito como con la fase estacionaria de la columna.

La elección del gas dependerá de la eficiencia y velocidad que tenga para la separación, y del tipo de detector que se va a utilizar:

- El hidrógeno permite una alta movilidad originando tiempos de análisis cortos, debido a que este tiene la más baja viscosidad en comparación con otros gases.
- El helio proporciona en la mayoría de los casos las mejores resoluciones, y es el más usado.
- El nitrógeno es barato, seguro, tiene una fácil purificación, pero presenta baja conductividad térmica (Varcancel & Gomez, 1988).

1.4.3 Filtros de oxígeno. El sistema de filtros de purificación de gases proporciona gases más puros y reduce el riesgo de que la columna sufra daños produciendo una pérdida de sensibilidad y precisión en el cromatógrafo de gases y que este se quede inactivo. (Agilent, 2001). Los principales agentes que deben filtrarse son oxígeno, agua e hidrocarburos (Barquero, 2006).

1.4.4 Inyector. La precisión de la inyección depende de la velocidad de inyección y la cantidad de muestra inyectada. Los volúmenes de inyección son típicamente muy pequeños (del orden de μl) por lo que se usan micro jeringas.

La temperatura de inyección debe ser lo suficientemente elevada como para volatilizar todos los componentes de la muestra, no debiéndose elevar más allá de este nivel para evitar posibles descomposiciones térmicas de la muestra (Barquero, 2006)

Al inyectar lentamente, las bandas se ensanchan y la resolución es mala. En algunos equipos se dispone de automuestreadores automáticos que reducen los errores de precisión.

Algunos inyectores pueden funcionar en el denominado modo split/splitless (división/sin división). En el modo división (Split) la muestra se divide antes de entrar en la columna y se aplica para muestras muy concentradas para evitar sobrecarga de muestra en la columna. En el modo sin división (splitless) toda la muestra se inyecta en la columna.

1.4.5 Columna cromatográfica. La columna es el componente esencial del cromatógrafo ya que es donde se produce la separación de los solutos, en esta se encuentra la fase estacionaria (líquida o sólida). Actualmente se emplean columnas capilares que son rápidas y eficientes, con mejor resolución, menores tiempos de análisis, y mayor sensibilidad a pequeñas cantidades de analito. La longitud de las columnas varía de longitud desde 2 metros hasta 100 metros y suelen estar enrolladas a fin de que encajen en el horno. El material de las columnas es de acero inoxidable, vidrio, sílice fundida o teflón. Las columnas capilares de sílice fundida son muy frágiles, por lo que están recubiertas de poliimida (Harris, Análisis Químico Cuantitativo, 2003).

1.4.6 Horno de la columna. La temperatura de la columna es una variable importante por lo que la columna normalmente se introduce dentro de un horno termostatzado. La temperatura óptima de la columna depende del punto de ebullición de las muestras y el grado de separación necesario. En el caso de muestras complejas se utiliza un programa de rampas de temperatura para lograr la separación de los componentes de la muestra (Barquero, 2006).

El horno de la columna consta de un sistema de flujo de aire adecuado que permita el rápido calentamiento y enfriamiento del horno (Parrales, Reyes, & Pine, 2012). Dentro del horno la columna se conecta en un extremo al puerto de inyección, y en el otro al detector (Rodríguez & Olguín, 2004).

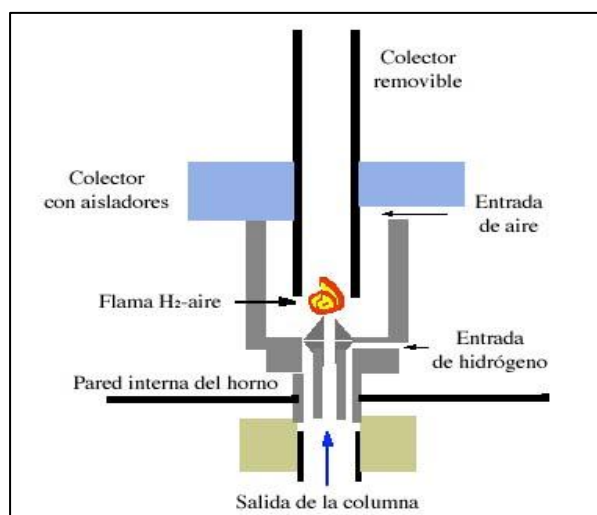
1.4.7 Sistemas de detección. Una vez separado los componentes de la muestra en la columna, estos pasan por un sistema de detección que origina una señal proporcional a la cantidad de soluto (Anzano, 2002). Independiente del tipo de detector, su temperatura siempre debe ser más elevada que la máxima temperatura de trabajo a que se someta la columna, con el fin de evitar que se puedan condensar en el detector compuestos eluidos de baja volatilidad.

El detector utilizado en el presente trabajo es el detector de ionización a la llama (FID), el cual se describe a continuación.

1.4.7.1 Detector de ionización de llama (FID). El funcionamiento del FID se basa en la acción de una flama de hidrógeno/ aire sobre la muestra que sale de

la columna. Las moléculas orgánicas que atraviesan la flama se rompen y se produce iones, los cuales son colectados en un electrodo parcial y produce una señal eléctrica. El FID es extremadamente sensible en un amplio rango dinámico. La respuesta del FID se basa en el número de carbonos y otros elementos como halógenos (Olguín & Rodríguez, 2004) (Figura 2).

Figura 2 Detector de ionización de flama.



Fuente: (Rodríguez & Olguín, 2004)

1.4.8 Sistema informático. El sistema informático incorporado al cromatógrafo recibe la señal generada en el detector y la traduce en información digital que permite el tratamiento computarizado de los datos, incluyendo la integración del área del pico cromatográfico y la medición del tiempo de retención de los analitos (Varcancel & Gomez, 1988)

1.5 Análisis de datos cromatográficos

1.5.1 Aspectos cualitativos. Uno de los parámetros característicos que permite la identificación de una sustancia es el tiempo de retención (t_R) que es el tiempo que transcurre después de la inyección de la muestra para que el pico del analito alcance el detector. Los tiempos de retención dependen de una variedad de condiciones experimentales como temperatura, fase estacionaria, gas portador (Varcancel & Gomez, 1988).

1.5.2 Análisis cuantitativo. Se basa en la comparación del área o altura del pico del componente de interés con la de estándares de esta sustancia de concentración conocida, sabiendo que existe una relación lineal entre el área o altura de pico y la concentración en un determinado intervalo de concentraciones.

Cuando el análisis se basa en la altura del pico se requiere que el ancho de los picos no sufra modificaciones durante la obtención de los cromatogramas de la muestra y los estándares para obtener resultados exactos. Por esta razón comúnmente los análisis se basan en el área del pico debido a que este es un parámetro independiente de los efectos de ensanchamiento (Skoog, Holler, & Nieman, 2001).

1.5.2.1 Método estándar externo. Con el área o la altura del pico conocido se puede determinar la masa o concentración de la muestra inyectada si se conoce la curva de calibración que relaciona la respuesta del detector con la cantidad de compuesto inyectada. La calibración se realiza mediante el uso de patrones externos. Se obtienen los cromatogramas de disoluciones patrón de distinta concentración y se representa el área de pico en función de la concentración para construir la curva de calibración. Por interpolación se obtiene la concentración de los componentes de la muestra (Skoog A., Vest M., & Holler, 2001).

Por lo general los detectores presentan curvas de tipo sigmoidea, razón por la cual es conveniente trabajar siempre dentro del rango dinámico lineal del detector, que se define como la zona del rango dinámico en la que la respuesta del detector es lineal frente a la concentración de soluto.

El detector produce una respuesta dependiente de la concentración del soluto que llega a él; el valor mínimo de este rango corresponde a la sensibilidad del detector, y el valor máximo corresponde con la concentración del soluto a partir de la cual la respuesta es constante (CSIC, 2008).

Uno de los problemas que se presenta en este método de calibración es la reproducibilidad de la inyección y el control estricto de la cantidad inyectada, por lo que se debe tomar las debidas precauciones para alcanzar la exactitud.

Además la calibración debe repetirse periódicamente para verificar la fiabilidad de la cuantificación. Debido al problema de irreproducibilidad en la inyección, resulta útil el empleo de un estándar interno (UCV, 2008).

1.5.2.2 Método de estándar interno. Se utiliza con frecuencia en el análisis cuantitativo para compensar posibles errores derivados de la manipulación de la muestra y de la inyección ya que de esta manera el estándar y la muestra serán afectados de igual forma por las diversas condiciones que afectan la inyección.

La característica que debe tener el estándar interno es ser una sustancia que produce un pico separado de los picos de la muestra, pero que se encuentre cerca de ellos y que tenga características similares a la de la muestra que se va analizar.

La adición de un estándar interno debe hacerse a la muestra y a cada disolución patrón en una cantidad iguales exactamente medidas. Para la cuantificación, se emplea la relación entre el área de pico del componente de interés/área de pico del estándar interno y concentración del analito/concentración del estándar interno (Barquero, 2006).

Con la curva de calibración se obtiene la ecuación lineal que nos permitirá calcular la concentración del analito:

$$y = mx + b$$

En donde,

$$y = \text{área patrón} / \text{área de estándar}$$

$$x = \text{concentración de patrón} / \text{concentración de estándar}$$

$$m = \text{pendiente}$$

$$b = \text{intercepto}$$

Del cromatograma se obtienen las áreas de analito y del estándar y luego con la ecuación de la curva de calibración y conociendo la masa del estándar se puede obtener la masa del analito en la muestra (Fernández & Garcia, 2010)

La ventaja de este método es que es independiente del volumen de inyección de muestra lo que es sumamente importante para aquellas técnicas cromatográficas que utilizan un método de introducción de muestra no automatizado como por ejemplo el uso de jeringas de inyección en cromatografía gaseosa (Fernández & García, 2010).

1.5.2.3 Normalización del área. Este procedimiento evita las incertidumbres asociadas con la inyección de la muestra.

Este método permite establecer el porcentaje de cada componente en la muestra. Se calcula dividiendo el área de cada componente entre el área total y multiplicando por 100%, es decir:

$$\% \text{ Analito} = (\text{área de a} / \text{área total}) \times 100$$

En donde,

Área de a= área de un analito determinado

Área total = suma del área de todos los analitos homólogos.

Este término es independiente del volumen de inyección de muestra, y para su cálculo todos los picos deben estar separados (Skoog, Holler, & Nieman, 2001).

1.5.2.4 Factor de respuesta. Cada detector tiene una forma particular de respuesta para cada analito y permite ajustar el cálculo de la normalización de las áreas. La respuesta del detector de ionización a la llama (FID) es independiente de la temperatura, del flujo de gas de arrastre y de la velocidad de flujo; por lo que se facilita los cálculos debido a que se pueden establecer relaciones directas de peso de muestra.

El cálculo de factor de respuesta se realiza experimentalmente pesando la cantidad exactamente conocida del patrón del analito a estudiar, se determina su área en el cromatógrafo y luego se realiza el cálculo.

$$(F_R) \text{ analito} = \text{conc. Analito} / \text{área analito}$$

En donde,

F_R = Factor de respuesta

Conc. = concentración del analito

1.6 Determinación de alcohol en otros fluidos corporales

La determinación de alcohol etílico puede hacerse en diferentes fluidos corporales, incluyendo sangre, orina, saliva, aire espirado, cerebro, humor vítreo, entre otros (Vargas, 1991).

Las determinaciones en sangre son las más eficaces. De hecho, el análisis en otros biofluidos, lo que en realidad se intenta es calcular ***la concentración de etanol en sangre.***

Los procedimientos de análisis del etanol en biofluidos, pueden agruparse en tres grupos, cada uno de los cuales tiene sus ventajas y limitaciones. El primer grupo hace referencia a las técnicas de microdifusión, cuya reacción es poco específica pero su ejecución es económica pues no requiere medios o instrumentos especiales. El segundo grupo se basa en la oxidación mediante aldehído deshidrogenasa, el cual es un procedimiento sencillo, específico, muy utilizado por laboratorios de análisis clínicos. Sin embargo, esta técnica puede dar falsos resultados en presencia de otros alcoholes. El tercer grupo hace referencia a técnicas cromatográficas, específicamente a cromatografía de gases. Este es un procedimiento más específico, sensible y fiable que permite simultáneamente realizar el análisis cualitativo y cuantitativo del etanol (Ladrón de Guevara & Moya, 1995).

1.6.1 Análisis de alcohol en orina.

Al menos un 10% de etanol ingerido se elimina sin metabolizar por orina. Los estudios experimentales han demostrado la gran variabilidad de la correlación de alcohol en orina/sangre, ya que la alcoholuria depende de muchos factores, como:

- a) La diuresis, ya sea por retención urinaria fisiológica o patológica o por el efecto diurético propio del etanol.
- b) Estado de hidratación del sujeto, dieta y función renal, que influyen en la densidad de la orina.

- c) Momento de la toma de muestra, ya que la alcoholuria es inferior a la alcoholemia hasta en máximo de ésta, a partir de ahí se invierten los términos.

Debido a esto, la valoración de alcohol en la orina presenta una serie de inconvenientes, especialmente ligadas al hecho que al llegar el alcohol a la vejiga se diluirá en la orina almacenada en ésta, por lo que la concentración en ella será inferior a la de la sangre.

En consecuencia, a pesar de la sencillez de obtención de la muestra, y de la mejor conservación de la misma, no parece que la determinación de alcohol en orina sea un procedimiento recomendable a efecto de aplicación de la legislación; sino más bien para otros fines como control de la bebida en el trabajo o en programas de rehabilitación, etc (Reppeto, 1995).

Se ha propuesto el siguiente factor de correlación de la concentración de alcohol en orina y sangre, indicándose entre paréntesis los valores medios calculados por Budd en cadáveres:

Orina / sangre: 1,4 (1,5) (Reppeto, 1995).

El rango de medición de alcohol etílico en orina va de 10 mg/dL - 600 mg/dL. (Beckman Coulter, 2003)

1.6.2 Análisis de alcohol en la saliva.

Ha sido propuesto que la tasa de alcohol en la saliva y sangre es casi idéntica, que la saliva normal esta desprovista de sustancias reductoras volátiles y que el hecho de fumar no modifica el tenor de estas sustancias (Fabre & Truhaut, 1976). Después de la ingestión de una bebida alcohólica concentrada, el alcohol que impregna la boca desaparece casi del todo, a los 10 minutos y completamente a los 20 minutos.

Para la saliva el factor de correlación es de 1, 12, con grandes variaciones, acordes con las oscilaciones de la constitución de la saliva (Reppeto, 1995). El rango de detección en pruebas rápidas es de 0,02 g/dL y 0,3 g/dL (ABS, 2005)

1.6.3 Análisis de alcohol en el líquido cerebral.

En el caso de un peritaje médico legal, después de la autopsia, la determinación puede hacerse no solo en la sangre, sino también en el cerebro. El contenido de alcohol en este puede indicar, en efecto, si la muerte ha sobrevenido bruscamente o si la difusión ha ***podido efectuarse en todo el organismo*** (Fabre & Truhaut, 1976).

Para el líquido cerebral el factor de correlación es de 1,18 liquido cerebral / sangre (Reppeto, 1995).

1.6.4 Análisis de alcohol en el humor vítreo. El humor vítreo es considerado una muestra bastante útil debido a que aquí el alcohol permanece estable ya que no tiene contaminación bacteriana. El cociente de humor vítreo/sangre es de 1,3 (Serrano & Velez, 2011).

La cantidad de alcohol normalmente presente el humor es de 0,024g/L (Simonin, Sánchez, Sales, & Linares, 1962).

Según un trabajo de tesis realizado se ha observado que el rango de determinación de etanol en humor vítreo va desde 0,58 g/L a 3,88 g/L (Serrano & Velez, 2011) .

1.6.5 Análisis de alcohol en el aire espirado. La concentración de alcohol en el aire es independiente del volumen de la solución pero, en cambio, es influida por la temperatura y la concentración de sales. Para el alcohol, el grado de partición entre sangre y aire, a 37°C, es de 2100 a 1; es decir, dos mil cien mililitros de aire alveolar contiene el mismo peso de alcohol que contiene un mililitro de sangre.

En este método de análisis se distinguen tres fases:

- a) Recolección de una muestra de volumen y composición adecuados.
- b) Reacción del alcohol en esta muestra con reactivos como la solución de dicromato en ácido sulfúrico.
- c) Medida del cambio de color con esa reacción.

La confiabilidad de los aparatos de medición (alcoholímetros) aún es cuestionado, debido a que los resultados más confiables se logran mediante el análisis de sangre, los resultados pueden alterarse por las condiciones variables en que los oficiales de policía deben manejar estos instrumentos. (Vargas, 1991)

Una precaución elemental es evitar que el alcohol que humedece la boca durante la medición pueda falsear los resultados. Para ello debe insistir en que la muestra de aire se tome por lo menos quince minutos después de la ingestión de bebidas alcohólicas, y proceder siempre al enjuague con agua antes de iniciar la prueba. (Vargas, 1991)

Según el Reglamento Argentino de metrología para los medidores de concentración de alcohol en aire exhalado, éstos deberán ser capaces de medir en todas las concentraciones en masa en el rango que va de 0,00 g/L hasta al menos 1,50 g/L.

1.6.6 Análisis de alcoholemias por cromatografía de gases.

El medio ideal para apreciar la impregnación alcohólica de un individuo es la sangre, esto se debe a que contiene pocas sustancias volátiles reductoras susceptibles de interferir en la determinación, y también porque la concentración de alcohol está equilibrada con la del líquido cefalorraquídeo y sobre todo con el sistema nervioso central, constituyendo el receptor fundamental de la acción tóxica del alcohol (Truhaut & Fabre, 1977).

El método más aceptado para la determinación de alcoholemia es cromatografía de gases (Rodríguez & Mayero Franco, 2000). En los sistemas primitivos el análisis consistía en la desproteinización de la sangre y la posterior inyección en el cromatografo; o también hacer pasar la sangre diluida por un pirolizador conectado al cromatografo, para destruir la materia orgánica. Actualmente, el procedimiento de elección es la inyección de espacio de cabeza, de donde se extrae una muestra alícuota del vapor para su posterior inyección en el cromatógrafo, dejando atrás los interferentes de la matriz de la muestra sanguínea.



Para la determinación de alcoholemia en el caso de individuos vivos se obtiene la muestra de sangre de la vena radial o cubital de antebrazo; la toma de muestra de cadáveres debe hacerse de la vena femoral o axial, o bien de las cavidades cardíacas. La sangre venosa se debe extraer con jeringa de un solo uso, sin desinfección de la piel con alcohol o derivados de este. Sino con jabón, o con algún producto no alcohólico. Además debe añadirse a la sangre oxalato sódico como anticoagulante y fluoruro de sodio que evita la fermentación (Camean, y otros, 1995).

2. METODOLOGÍA

2.1 Tipo de estudio

El tipo de estudio fue de tipo descriptivo, analítico, cuantitativo.

2.2 Análisis cromatográfico

2.2.1 Materiales, equipos y reactivos

- Balones aforados 25 y 100 ml
- Pipetas serológicas 1, 2 y 5 ml
- Tubos de ensayo con tapa rosca
- Microjeringa Hamilton, capacidad 1 μ l
- Tubo con oxalato de potasio (6 mg) y fluoruro sódico (7.5 mg) para recolección de muestras sanguíneas.
- Micropipetas automáticas (0,5- 10,0 μ l; 10-100 μ l; 100-1000 μ l) marca Labmate
- Generador de Hidrógeno (Parker, modelo H2-90)
- Homogeneizador Vortex (Genie 2, modelo G-560)
- Cromatógrafo de gases con detector FID (Agilent, modelo 6890n G 1530 N)
- Etanol absoluto grado IR pureza 99,9% (Merck, Alemania)
- N- Butanol grado reactivo, pureza 99,8%, (Merck, Alemania)
- Acetonitrilo grado HPLC pureza 99,9% (Merck, Alemania)
- Tween 20 (Panreac, España).
- Agua purificada tipo I (conductividad de 0,78 $\mu\Omega$) obtenida mediante sistema Milli-Q (Millipore, USA)
- Gases (nitrógeno, aire sintético) pureza 99,99% (Linde, Alemania)

2.2.2 Instrumentación. La optimización de la técnica se realizó en un cromatógrafo de gases Agilent 6890n, con un detector de ionización a la llama (FID). La separación cromatográfica se realizó en una columna Agilent DB-624, de 30 metros de longitud, 530 μ m de diámetro interno y 3 μ m de grosor de película. El gas portador fue nitrógeno, el cual se utilizó a un caudal constante

de 5 ml/min. El cromatógrafo de gases fue operado en las condiciones que se describen en la Tabla .1

Tabla 1 Áreas y concentraciones del pool de muestras de sangre de alta, media y baja concentración de etanol

Inyector	Volumen de inyección	0,5 µl
	Modo	División (Split)
	Temperatura inicial	250 °C
	Presión	3,7 psi
	Relación de División (split ratio)	13,6:6
	Flujo de división	74,7ml/ min
	Ahorrador de gas	20 ml/min por 2 min
Columna	Modo de flujo	Constante
	Presión de columna	370 psi
	Flujo del gas portador	5,5 ml/min
	Velocidad de flujo promedio	39 cm/seg
Horno	Condiciones iniciales	40 °C por 3,30 min
	Rampa de temperatura	20 °C hasta 180 °C
	Equilibración de columna	220 °C durante 2 min
	Tiempo total de corrida	12,30 min
Detector	Temperatura	300 °C
	Flujo de hidrógeno	36 ml/min
	Flujo de aire	400 ml/min

2.2.3 Preparación de estándares y curvas de calibración. El análisis cuantitativo del método analítico optimizado se basó en la estandarización interna y la estandarización externa. Se utilizó como estándar interno al n-butanol, el cual fue adicionado a las soluciones estándar en un volumen constante (250 µl) equivalente a una concentración de 8,1 g/ l en la solución final (25 ml).

La curva de calibración de etanol se realizó a 4 niveles en un rango lineal de 0.01-0.5 g/l. Las soluciones estándares se obtuvieron a partir de etanol absoluto por dilución con agua destilada. La preparación de las soluciones estándares se detalla en la tabla 2.

Tabla 2 Concentraciones del etanol y n-butanol

ID	ETANOL ABSOLUTO		N-BUTANOL (estándar interno)			Vol. Aforo (ml)	Conc. Etanol(g/l)	Conc. n- butano l (g/l)
	Vol. Etanol (μl)	Conc. Etanol (mg)	Vol. n- butanol (μl)	Conc. n- butanol (g/l)	n-			
1	0,5	0,395	250	202,9		25	0,0158	8,1
2	1,5	1,186	250	202,9		25	0,0474	8,1
3	3	2,372	250	202,9		25	0,0948	8,1
4	16	12,652	250	202,9		25	0,5061	8,1

2.2.4 Optimización del método. En el presente trabajo se optimizó la preparación de la muestra, los parámetros de selectividad y linealidad del método analítico.

2.2.4.1 Tratamiento de muestras. Para la optimización de la preparación de las muestras sanguíneas se realizaron las siguientes modificaciones en la técnica:

- Inicialmente la preparación de las muestras se llevó a cabo siguiendo la metodología publicada (Pontes, y otros, 2009), en la que se mezcla: 100 μl de sangre, 10 μl de N-butanol, 195 μl de Acetonitrilo y 195 μl de Tween 20®, y luego se centrifuga por 5 minutos a 1600 rpm.
- A partir de este método se obtuvo una solución lechosa, por lo cual se decidió modificarla. La cantidad Tween 20® fue disminuída de 195 a 90 μl y, a su vez, se incrementó la cantidad de acetónitrilo de 195 a 300μl. Además se prolongó el tiempo de centrifugación de 5 a 10 min a 2000 rpm.
- A partir de esta modificación; se obtuvo una cantidad concentrada pero insuficiente de sobrenadante por lo que se prosiguió con la siguiente modificación. Se añadió agua destilada (500 μl) a la mezcla y se centrifugó.

Con esta última modificación se logró obtener una correcta separación del sobrenadante.

Mediante estas modificaciones se optimizó la extracción del etanol de la sangre total, cuyo procedimiento se detalla a continuación:

- a. Se colocaron 100 μ l de sangre en un tubo de vidrio tapa rosca.
- b. Se añadió 10 μ l n-butanol (estándar interno) y se mezcló en un homogeneizador vortex por 30 segundos.
- c. Se diluyó la muestra a 500 μ l, añadiendo 90 μ l de Tween 20® y 300 μ l de acetonitrilo. Esta solución se mezcló en un homogeneizador vortex por 30 segundos.
- d. La solución se centrifugó a 2000 rpm durante 10 minutos.
- e. Se extrajo el sobrenadante en otro tubo de vidrio y se adicionaron 500 μ l de agua destilada.
- f. La muestra se conservó a 4 °C hasta el momento de inyección en el cromatógrafo.

2.2.4.2 Linealidad. Se evaluó en un rango lineal desde 0,0158 g/ l hasta 0,5061 g/l considerando la relación entre la concentración (analito/ estándar interno) y el área (analito- estándar interno).

2.2.4.3 Selectividad. Para evaluar la selectividad del método los interferentes fueron descartados mediante la verificación de la ausencia de picos en los tiempos de retención de los analitos estudiados

2.2.5 Aplicabilidad del método. Para evaluar la aplicabilidad del método optimizado para la detección y cuantificación de etanol en sangre por cromatografía de gases (GC-FID) se analizaron muestras sanguíneas de voluntarios después de haber ingerido una bebida alcohólica (100 ml de Ron San Miguel de Oro). Estas muestras fueron tomadas a distintos horarios para poder ser usadas como puntos de referencia (pool de muestras) de alta, media y baja concentración de etanol en sangre, así:

- **Muestras de concentración alta:** Una parte de las muestras (pool donador 1-6) fueron extraídas en la mañana y la otra parte (pool

donador 7-11) fueron extraídas en la noche, las 2 extracciones se realizaron después de 1 hora tras la ingesta de la bebida alcohólica.

- **Muestras de concentración media:** Fueron extraídas en la mañana (pool donador 1-6) y noche (pool donador 7-11) después de 2 horas tras la ingesta de la bebida alcohólica.
- **Muestras de concentración baja:** Fueron extraídas en la mañana (pool donador 1-6) y noche (pool donador 7-11) con un ayuno previo de 6 horas.

2.2.5.1 Toma de muestras sanguíneas. Se recolectaron muestras de sangre total de 11 voluntarios, mediante el siguiente procedimiento:

- a. Se desinfectó la zona de punción con agua oxigenada (producto no alcohólico).
- b. Se extrajeron 5 ml de sangre en un tubo con tapón gris claro, debidamente codificado, que contenía el anticoagulante oxalato de potasio y el inhibidor glicolítico fluoruro de sodio que evita la fermentación.
- c. Se agitó suavemente la muestra de sangre total recolectada durante 1 minuto.
- d. Se conservó la muestra a temperatura en refrigeración (4°C) hasta el momento del análisis.

2.2.5.2 Procesamiento y análisis de datos. Los datos obtenidos fueron procesados en el software Chemstation (Agilent, USA) y en el programa Excel 2007.

3. RESULTADOS

3.1 Optimización del tratamiento de la muestra. El tratamiento de la muestra para la extracción del etanol de sangre total fue optimizado a partir de la metodología publicada por (Pontes, y otros, 2009). Mediante ciertas modificaciones se optimizó el procedimiento se detalla a continuación:

- Se colocaron 100 μ l de sangre en un tubo de vidrio tapa rosca.
- Se añadió 10 μ l de N-butanol (estándar interno), y se mezcló en un homogeneizador vortex por 30 segundos.
- Se diluyó la muestra a 500 ml, añadiendo 90 μ l de Tween 20 ® y 300 μ l de Acetonitrilo. Esta solución se mezcló en un homogeneizador vortex por 30 segundos.
- La solución se centrifugó a 2000 rpm durante 10 minutos.
- Se extrajo el sobrenadante en otro tubo de vidrio y se adicionaron 500 μ l de agua destilada
- La muestra se conservó a 4°C hasta el momento de inyección en el cromatógrafo.

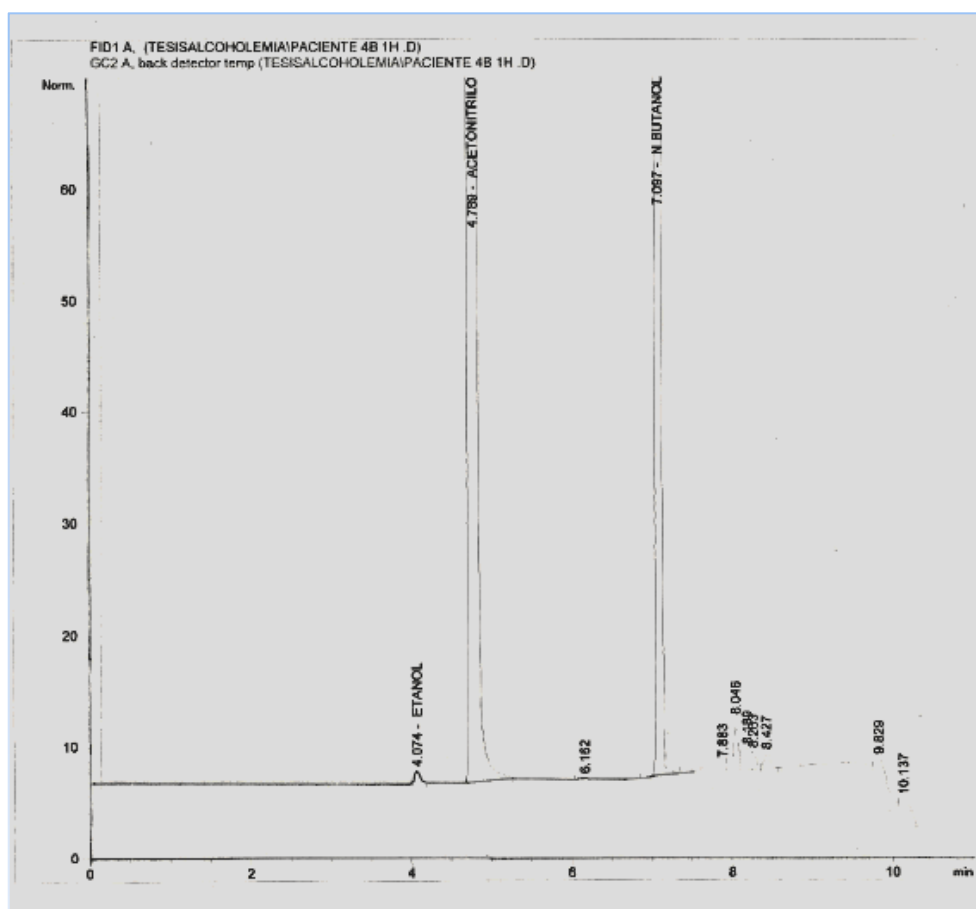
3.2 Optimización de los parámetros cromatográficos

3.2.1 Parámetros cualitativos. El etanol fue detectado a un tiempo de retención promedio en los estándares de la curva de calibración fue de $4,1 \pm 0,01$ min, mientras que el n-butanol (estándar interno) fue detectado a $7.1 \pm 0,003$ min (Tabla 3.3). En el pool de muestras sanguíneas, el tiempo de retención promedio de etanol fue de $4,0 \pm 0,02$ min y del n-butanol fue detectado a $6,9 \pm 0,01$ min (Tabla 3.4).

En cuanto a la selectividad del método analítico, en el cromatograma se registran solo los picos de los analitos de interés por lo tanto hubo ausencia de sustancias interferentes provenientes de las muestras sanguíneas (Figura 3.3).

3.2.2 Parámetros cuantitativos. La linealidad de la curva de calibración de etanol fue establecida en un rango de 0,0158 g/L - 0,5061 g/L con un coeficiente de determinación R^2 de 0.996 (Figura 3.4). Las áreas y concentraciones obtenidas para la curva de calibración se presentan en la tabla 3.

Figura 3. Cromatograma del análisis de etanol en sangre a una concentración de 0,15 g/L de etanol y 8,1 g/L de n-butanol

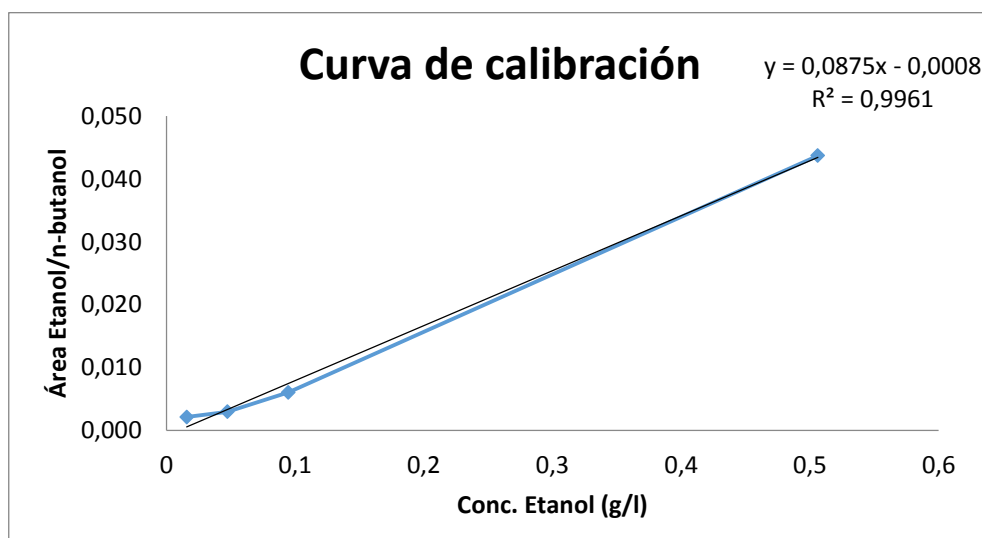


Fuente: Autoras

Tabla 3 Áreas y concentraciones de los estándares en la curva de calibración de etanol con estándar interno.

ETANOL			N-BUTANOL (estándar interno)			
Conc. Etanol (g/l)	Tiempo de retención	Área	Conc. n- butanol (g/l)	Tiempo de retención	Área (pA)	Área Etanol / n-butanol
0,0158	4,086	3,797	8,1	7,097	1802,2	0,002
0,0474	4,077	4,963	8,1	7,096	1678,8	0,003
0,0948	4,104	14,162	8,1	7,102	2351,4	0,006
0,5061	4,074	76,851	8,1	7,097	1758,1	0,044

Figura 4 Curva de calibración para el etanol/n-butanol.



Fuente: Autoras

3.3 Aplicabilidad en pool de muestras sanguíneas

Para evaluar la aplicabilidad del método se investigó un total de 33 muestras sanguíneas provenientes de voluntarios después de haber ingerido 100 ml de una bebida alcohólica (Ron San Miguel). Las muestras fueron clasificadas en tres grupos: alta, media y baja concentración y fueron usadas como puntos de referencia (pool de muestras) (Tabla 4)

Tabla 4 Áreas y concentraciones del pool de muestras de sangre de alta, media y baja concentración de etanol

ID	Pool-Donador	Pool-concentración	ETANOL		N-BUTANOL (estándar interno)		CÁLCULO INTERNO	ETANOL/	ESTÁNDAR
			Tiempo de retención	de Área (pA)	Tiempo de retención	de Área (pA)	Área Etanol/n-butanol	Conc x=(y-b)/m	Conc. Final *
2	1	Alto	4,086	6,642	7,097	1798,9	0,0037	0,033	0,33
5	2	Alto	4,077	7,400	7,096	2002,6	0,0037	0,033	0,33
8	3	Alto	4,104	2,536	7,102	1170,4	0,0022	0,016	0,16
11	4	Alto	4,074	4,101	7,097	1979,1	0,0021	0,015	0,15
14	5	Alto	4,093	3,100	7,108	1226,3	0,0025	0,020	0,20
17	6	Alto	4,131	2,410	7,117	1100,4	0,0022	0,016	0,16
20	7	Alto	4,135	5,800	7,118	1305,0	0,0044	0,042	0,42
23	8	Alto	4,126	6,012	7,112	1644,5	0,0037	0,033	0,33
26	9	Alto	4,13	6,100	7,113	2026,3	0,0030	0,025	0,25
29	10	Alto	4,129	7,637	7,115	1674,3	0,0046	0,043	0,43
32	11	Alto	4,131	2,200	7,113	1383,1	0,0016	0,009	0,09



3	1	Medio	4,084	3,800	7,095	2025,1	0,0019	0,012	0,12
6	2	Medio	4,084	3,800	7,095	2025,1	0,0019	0,012	0,12
9	3	Medio	4,09	7,525	7,099	1482,8	0,0051	0,049	0,49
12	4	Medio	4,079	3,015	7,097	1882,9	0,0016	0,009	0,09
15	5	Medio	4,097	2,100	7,109	1707,9	0,0012	0,005	0,05
18	6	Medio	4,135	1,900	7,119	2062,7	0,0009	0,001	0,01
21	7	Medio	4,137	2,400	7,116	1662,8	0,0014	0,007	0,07
24	8	Medio	4,126	4,016	7,111	1387,3	0,0029	0,024	0,24
27	9	Medio	4,129	4,200	7,114	1900,4	0,0022	0,016	0,16
30	10	Medio	4,133	5,500	7,116	1748,9	0,0031	0,027	0,27
33	11	Medio	4,1	0,600	7,109	1868,0	0,0003	-0,005	-
1	1	Bajo	4,124	0,906	7,101	1724,3	0,0005	-0,003	-
4	2	Bajo	4,082	-	7,091	2227,7	-	-	-
7	3	Bajo	4,082	-	7,1	1494,7	-	-	-
10	4	Bajo	4,082	-	7,099	2044,4	-	-	-
13	5	Bajo	4,082	-	7,107	2124,9	-	-	-



16	6	Bajo	4,131	1,038	7,117	2385,4	0,0004	-0,0042	-
19	7	Bajo	4,131	0,906	7,115	1404,0	0,0006	-0,0018	-
22	8	Bajo	4,132	0,600	7,114	1364,7	0,0004	-0,0041	-
25	9	Bajo	4,124	0,604	7,111	1645,0	0,0004	-0,0049	-
28	10	Bajo	4,082	-	7,114	2321,2	-	-	-
31	11	Bajo	4,082	-	7,115	1607,2	-	-	-

* Concentración final tras corrección con el factor de dilución (1/10)

4. DISCUSIÓN

En la actualidad existen diferentes métodos de evaluación de la ingesta de alcohol, lo cual inicia con pruebas físicas de equilibrio, coordinación y percepción espacial. La subjetividad de estas pruebas demanda que para la utilización de métodos más cuantitativos para la detección de etanol en fluidos corporales, que incluyen la determinación de etanol en el aliento por la técnica alcohol-sensor (Henao & Vaca, 2010); determinación de etanol en sangre total por técnicas enzimáticas por reacción con la enzima alcohol deshidrogenasa, y los métodos de microdifusión por reacción de óxido- reducción. Sin embargo, estas técnicas son consideradas poco confiables a nivel cuantitativo ya que presentan interferencias con otras sustancias volátiles y proporcionan resultados inciertos (Ferrari, 2008). En contraste, la técnica de cromatografía de gases es un método más selectivo, versátil, de excelente precisión y exactitud (Varcancel & Gomez, 1988).

Este trabajo de tesis presenta la primera fase de la optimización de un método para el análisis de alcoholemia por cromatografía de gases con inyección directa y detección de ionización a la llama. Para este método se utilizó cromatografía de gases con inyección directa. A diferencia de la instrumentación usual para esta determinación, en este método no se utilizó el dispositivo para la inyección de espacio de cabeza (head space) que permite eliminar los efectos de la matriz (Monteiro & Colaboradores, 2014) pero su costo es muy elevado (Gerchman, Schnitzer, Gal, Mirsky, & Chinko, 2012)(Pontes, y otros, 2009). Es así, que se optó por método relativamente más económico que incluye un tratamiento previo a las muestras sanguíneas para reducir las interferencias (Jain, 1971).

Para la extracción del etanol se realizó una selección de sustancias extractantes y de patrón interno en los cuales se evaluaron las siguientes características: moderada a baja volatilidad, baja solubilidad en agua, distintos tiempos de retención para permitir una cuantificación fiable de compuestos orgánicos.



Como agente extractante se utilizó acetonitrilo que es un solvente de mediana polaridad y que produjo precipitación en la muestra de sangre, permitiendo una buena desproteinización de una manera más simple y en menor tiempo (Alvarez Guerra, G. Parkes, & D. Bell, 2006). Por su parte, el tensoactivo Tween 20® fue elegido debido a su acción detergente que permitió la lisis celular de los componentes sanguíneos. Esta lisis ocurre a nivel de la membrana celular, en donde los detergentes rompen la barrera lipídica solubilizando las proteínas e interrumpiendo la interacción lípido-lípido, lípido-proteína y proteína-proteína (Jimenez, 2015). Esta lisis permitió la completa extracción del etanol y cuyos residuos fueron finalmente separados por centrifugación. La dilución del extracto permitió una reducción adicional de los interferentes de la muestra.

En la optimización del presente método se evaluaron algunos parámetros cualitativos y cuantitativos. Los tiempos de retención de los estándares y de etanol en muestras sanguíneas fueron comparados y se obtuvo una variación de ± 0.1 , demostrando así la aplicabilidad del método en muestras reales. Se evaluó también la selectividad verificando la ausencia de sustancias interferentes junto a los analitos en los cromatogramas. Además, la linealidad a un rango muy bajo (0,0158 g/l hasta 0,5061 g/l) resultó satisfactoria ($R^2 = 0.996$)

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

En el presente trabajo de tesis se optimizó la primera fase del método para la determinación de alcoholemia mediante cromatografía de gases con inyección directa y detección de ionización a la llama (FID). Particularmente, se optimizó el tratamiento de la muestra, la selectividad, la linealidad a rangos de baja concentración y la aplicabilidad en muestras sanguíneas. La cuantificación de alcoholemia se realizó con estandarización interna (n-butanol) y estandarización externa (curva de calibración a 4 niveles).

Este método, aunque requiere de pruebas adicionales de optimización y su posterior validación, podría representar una alternativa económica y rápida que requiere un volumen de muestra muy pequeño (100 μ l).

5.2 Recomendaciones

Se recomienda continuar con los estudios de optimización y validación, que incluya precisión, exactitud, linealidad a niveles de concentración más altos, límites de detección y cuantificación, entre otros. Además, se podría explorar el uso de columnas cromatográficas alternativas. Por ejemplo, la columna HP-Blood Alcohol de 7.5 metros de longitud x 0.32 mm de diámetro interno y 2.00 μ m de película, que por tener una fase estacionaria más robusta podrían adaptarse mejor a este método y permitir la reducción del tiempo de análisis, aumentar el tiempo de vida de la columna y resistir a la carga de sustancias solubles acompañantes a los analitos en la muestra.

El método de análisis cuantitativo de alcoholemia, una vez optimizado y validado, podría aplicarse no solo para el control de alcoholemias sino también en estudios varios de metabolismo y toxicología.



REFERENCIAS

ABS. Costa Rica (2005, noviembre 30). Prueba rápida de alcohol por saliva. Obtenido de http://www.abs-cr.com/documentos/prueba_rapida_alcohol.pdf

Agilent Technologies (2001, julio 30), Filtros de purificación de gases . Obtenido de <http://www.chem.agilent.com/Library/brochures/5990-8243ES.pdf>

Alvarez Guerra, E. D., G. Parkes, H., & D. Bell, J. (2006). Estudio comparado de dos métodos de desproteinización para la evaluación de sangre total y plasma mediante espectroscopía de resonancia magnética . Redalyc. Bioquímica, 67. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/bioquimia/bq-2006/bq062d.pdf>

Barquero Quirós, M. (2006). Principios y Aplicaciones de la cromatografía de Gases (1 ed). San José: Editorial Universidad de Costa Rica.

Bataller, R. (2004). Toxicología Clínica. (1ra. Ed.). Valencia: Universidad de Valencia.

Beckman Coulter, Inc. (septiembre de 2003). Sistemas SYNCHRON Etanol. Obtenido de <http://www.crbreus.org/pnt/alcohol.pdf>

Buzzo, A., & Soria, M. F. (1960). Toxicología. (5ta. ed). Buenos Aires: Editorial Libreros.



Camean, A., López Artiguez, M., Martínez, D., Menendez, M., Reppeto, G., Reppeto, M., Soriano, M. T. (1995). Toxicología Avanzada. Madrid: Editorial Díaz de Santos S.A.

Chiriboga, V. (20 de Enero de 2003). Reglamento sobre conduccion de vehiculos bajo la influencia de alcohol, drogas o sustancias estupefacientes. Disponible en: <http://www.derechoecuador.com/productos/producto/catalogo/registros-oficiales/2003/enero/code/17742/registro-oficial-20-de-enero-del-2003-suplemento>

Diaz Garnica, A., & Moreno, H. (2000). Alcohol, Embriaguez en lesiones personales culposas, Validez Del Dictamen Pericial. Resolucion Interlocutoria N.- 1-59, (pág. 9). Cali.

Fabre, R. & R. Truhaut. Tratado de Toxicología. Madrid: Editorial Paraninfo.

Fernández, I., & Garcia, E. (2010). Cuantificación de compuestos por cromatografía: Método del Patrón Interno. Universidad Politécnica de Valencia. Recuperado Enero 15, 2015. Disponible en : <http://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/16356/M%C3%A9todo%20Patr%C3%B3n%20Interno.pdf?sequence=2>

Ferrari, L. A. (2008). Análisis Toxicológico del etanol y su interpretación Forense. Ciencia Forense Latinoamericana.

Gerchman Y, Schnitzer A. Gal R, Mirsky N, & Chinko N. (2012, February). A simple rapid gas-chromatography flame-ionization-detector (GC-FID) method for the determination of ethanol from fermentation processes. African Journal of Biotechnology. 11(15).



Harris, D. (2003). Análisis Químico Cuantitativo.(3ª.ed) Barcelona: Editorial Reverté.

Henao, L., & Vaca, E. (2010). Validación de la “Determinación de alcoholemia y metanol por Cromatografía de Gases con automuestreador de volátiles e Identificación de acetaldehído, acetona y 2-propanol”. Universidad Tecnológica de Pereira. Recuperado Septiembre 20, 2014. Disponible en: <http://repositorio.utp.edu.co/dspace/bitstream/11059/1685/1/61595131H493.pdf>

Jain, N. (1971). Direct Blood-Injection Method for Gas Chromatographic Determination of Alcohols and Other Volatile Compounds. Clinical Chemistry,17 (2)

Jimenez, L. (2015) Lisis celular por medio de detergentes. Disponible en: http://www.academia.edu/10194525/Lisis_celular_por_medio_de_detergentes

Jones, A. (1995). Measuring ethanol in saliva with the QED enzymatic test device: comparison of results with blood- and breath-alcohol concentrations. Department of Forensic Toxicology, University Hospital, Linköping, Sweden. 19 (3): 169-74.

Ladrón de Guevara , J., & Moya Pueyo, V. (1995). Toxicología médica clínica y laboral. Madrid: Editorial McGraw-HILL.

Ley Orgánica de Transporte Terrestre Tránsito y Seguridad Vial, Ley 1, 2014 (supl 2008).



Martinis, B. Martins M, Santos M. C. (Agosto 2004). Determination of ethanol in human blood and urine by automated headspace solid-phase microextraction and capillary gas chromatography. Journal elsevier, Analytica Chimica Acta. Recuperado Septiembre 14, 2014 de www.elsevier.com/locate/aca

Monteiro, C., Franco, J. M., Proença, P., Castañera, A., Claro, A., Vieira, D. N., & Corte-Real, F. (2014). Qualitative and quantitative analysis of a group of volatile organic compounds in biological samples by HS-GC/FID: application in practical cases. Forensic science international, 243, 137-143.

Nollet, L. (2006). Chromatographic Analysis of the Environment. En L. M. L. Nollet , Chromatographic Analysis of the Environment (pág. 143). United States: Robert Lee.

Olguín, L., & Rodríguez, H. (2004). Instituto de Biotecnología: Métodos en Biotecnología: Cromatografía de gases.Consultado Enero 16, 2015 desde Universidad Autonoma de México, pag. 16-17. Sitio Web: http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/cromatografia_de_gases.pdf

Parrales, A., Reyes, M., & Pine, W. (2012). Cromatografía del Gas Natural. Obtenido Noviembre 22, 2014 de Escuela Superior Politécnica del Litoral. SitioWeb: http://www.cib.espol.edu.ec/Digipath/D_Tesis_PDF/D-94183.pdf

Pontes, H., De Pinho, P. G., Casal, S., Carmo, H., Santos, A., Magalhães, T., ... & Bastos, M. L. (2009). GC determination of acetone, acetaldehyde, ethanol,



and methanol in biological matrices and cell culture. Journal of chromatographic science, 47(4), 272-278.

Repetto, M. (1995). Toxicología Avanzada. Madrid:Editorial Díaz de Santos, S.A.

Rosero, J. (Marzo 2014). El consumo de alcohol en los adolescentes de lo ilegal a lo socialmente aceptable. Revista PostData. Edición 1. Obtenido de: <http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Revistas/postdata.pdf>.

Serrano, M., & Velez, E. (2011). dspace.ucuenca.edu.ec. Obtenido de <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/2438/1/tq1078.pdf>

Silva , H. (1995). Medicina Legal y Psiquiatría Forense.(1995). Chile: Editorial Jurídica de Chile

Simonin , C., Sánchez Maldonado, G., Sales Vázquez, M., & Hernandez Linares, E. (1962). Medicina Legal Toxicológica. Barcelona. Editorial: Jims.

Skoog A., D., Vest M. , D., & Holler, J. (2001). Fundamentos de Química Analítica. (pág. 694). Barcelona. Editorial Reverté.

Skoog, D., Holler, F., & Nieman, T. (2001). Principios de Análisis instrumental. (pág. 751 - 753). Madrid. Editorial Mc-Graw Hill.



Téllez Rodríguez, N. R. (2002). Medicina Forense: Manual Integrado.(1ª.ed). Bogotá: Editorial Panamericana formas e impresos

Uribe Acevedo, R. (2013). Portal biblioteca Universidad de Antioquia. Alcoholes. Obtenido Noviembre 26,2014 de Universidad de Antioquia. Stio Web:

<http://www.udea.edu.co/portal/page/portal/bibliotecaSedesDependencias/unidadesAcademicas/FacultadMedicina/BibliotecaDiseno/Archivos/Departamentos/Alcoholes-farmacologia-toxicologia-medicina-udea.pdf>

Varcарcel Cases, M., & Gomez Henz, A. (1988). Tecnicas Analiticas de Separacion. Barcelona: Editorial Reverté SA.

Vargas Alvarado, E. (1991).Medicina Forense y Deontología Medica. Distrito Federal–México: Editorial Trillas.