

Torres, Ana María  
Toxicología del alcohol etílico : dosaje en muestras biológicas / Ana María  
Torres ; Francisco José Camargo. - 1a ed. - Ciudad Autónoma de Buenos Aires  
: Elemento, 2017.  
60 p. ; 23 x 15 cm.

ISBN 978-987-1631-62-9

1. Indicadores Biológicos. 2. Alcohol. I. Camargo, Francisco José II. Título  
CDD 614.1

© Torres Ana María, 2016.  
© Ediciones Elemento, 2016.

Ediciones Elemento  
Celina Boena 2178  
(1618) El Talar, Pdo. de Tigre  
Tels.: 54 11 4740 9075 / 11 6214 1781  
editor@edicioneselemento.com.ar  
www.edicioneselemento.com.ar

Diseño de tapa e interior: Nancy Bazzano  
Edición y producción: Adriana Cabrera

Queda hecho el depósito que marca la Ley 11.723.  
Todos los derechos reservados.  
Queda prohibida la reproducción total o parcial de este libro, ya sea a través de  
medios ópticos, mecánicos, electrónicos, químicos, fotográficos o de fotocopia,  
sin la previa autorización escrita del editor.

# **Toxicología del alcohol etílico**

## **Dosaje en muestras biológicas**

*Dr. Francisco J. Camargo*

*Dra. Ana María Torres*



## PRÓLOGO

**E**l dosaje de etanol en muestras biológicas representa siempre un desafío analítico de compleja resolución. En auxilio de esta situación se encuentra el avance de la ciencia y la técnica, sobre todo en lo referente a la moderna instrumentación analítica que se ha convertido en un aliado estratégico en pos de obtener resultados confiables y reproducibles. Esta situación exige profesionales comprometidos con la formación y capacitación permanentes.

Cuando se considera el gran número de variables que pueden influir en el resultado de las determinaciones realizadas se comprende, en su real dimensión, la necesidad de desarrollar una visión sistémica de todas las operaciones involucradas en el proceso. Más aún, si se tiene en cuenta que la realización de los estudios propiamente dichos es tan sólo una parte de la tarea profesional a realizar ya que, no menos importante, resulta la etapa de evaluación post-analítica, interpretación y alcance de los resultados.

Esta obra fue escrita con la intención de constituirse en una guía práctica, ágil y muy amigable, destinada a satisfacer las consultas más comunes que, sobre el particular, pudieran tener estudiantes y profesionales de carreras tales como Bioquímica, Medicina y Derecho; para quienes la familiarización con los conceptos que en ella se desarrollan pueden resultar de valor e interés.



# Capítulo I

## Introducción

El consumo de alcohol es hoy un problema social global, dada su extensión y amplitud respecto a situaciones sociodemográficas, niveles económicos, conformaciones etarias y otros componentes sociales. La determinación de la concentración de etanol en muestras biológicas en la práctica toxicológica de rutina, deriva de una necesidad tanto **clínica, laboral,** como **forense.** La primera se relaciona con los problemas de salud, consecuencia del consumo excesivo (alcoholismo); la segunda puede suponer el incremento de riesgo de accidentes, tanto para el individuo como para sus compañeros de trabajo, además de implicaciones sanitarias de seguridad o transporte; y la tercera, con la modificación del comportamiento que induce el consumo abusivo de bebidas alcohólicas, que se traduce con frecuencia en infracciones de códigos y normas legales y en muchas ocasiones con hechos violentos (accidentes de tránsito, suicidios, homicidios, etc.) que requieren por lo tanto investigación judicial.

El consumo moderado del alcohol, no es perjudicial para la mayoría de las personas sanas, incluso algunos autores expresan que podría tener efectos beneficiosos, actuando como una hormetina. Ahora bien, el consumo excesivo de alcohol, al igual que otras drogas, puede dar lugar a trastornos somáticos, mentales y sociales. El alcohol es fundamentalmente un depresor de la transmisión nerviosa en el SNC, presenta tolerancia cruzada con otros depresores, produce sedación y sueño, aunque el efecto inicial -debido a la inhibición de la actividad cortical- es de aparente estimulación (conducta espontánea, locuacidad), acompañada de disminución de la actividad psicomotora, de la atención, con perturbaciones en el estado de alerta y en la capacidad de respuesta rápida.

En la práctica profesional se observa una estrecha relación entre los hechos violentos que requieren investigación judicial con el consumo de alcohol etílico. Esta situación torna indispensable el establecimiento de un sistema estandarizado de obtención y análisis de muestras, con la finalidad de lograr mediciones confiables y reproducibles para aquellos casos en los que se sospecha el consumo de bebidas alcohólicas como factor coadyuvante o predisponente para la ocurrencia del hecho bajo investigación; de tal manera de poder brindar a la autoridad judicial competente evidencia científica que permita establecer la responsabilidad civil y/o penal que corresponda, según el marco legal vigente.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) el consumo de alcohol provoca el 3,2% de las defunciones anuales a nivel mundial (1,8 millones), lo que equi-

vale al 4% de la carga global de enfermedades y existen relaciones causales entre el consumo de alcohol y más de 60 tipos de enfermedades y lesiones (WHO, 2001).

En el año 2000, el análisis comparativo de la OMS de 26 factores de riesgo distintos y su impacto sobre la carga de morbilidad, demostró que el alcohol era el principal factor de riesgo en América, siendo su consumo per cápita un 50% mayor (8,5 l) que la media mundial (6,2 l). En el año 2002, en términos de carga de morbilidad, el alcohol causó aproximadamente 323.000 muertes, 6,5 millones de años de vida perdidos y 14.6 millones de años de vida ajustados a la discapacidad (AVAD) en la Región (Ministerio de Salud Argentina 2011), 26% de los AVAD masculinos perdidos por homicidio y del 16% de los femeninos a nivel mundial (OMS 2006), en comparación con la cifra global de 4,4%, abarcando resultados de enfermedad crónica y aguda en neonatos y ancianos. Los hombres, tienen mayores niveles de carga de morbilidad atribuible al alcohol en comparación con las mujeres, lo cual podría deberse principalmente a su perfil de consumo, tanto en términos de un mayor volumen total como en patrones más nocivos de ingesta, incluyendo ingesta episódica intensa. Con respecto a la prevalencia del consumo excesivo ocasional en algunos países de la Región, Argentina se encuentra ubicada en tercer lugar luego de Canadá y Perú. Los estudios sugieren que, en ciertos países de América, los niños están empezando a beber alcohol desde los diez años de edad, sin descontar el uso de alcohol como alimento aún para los lactantes, sobre todo en regiones empobrecidas y productoras de algún tipo de alcohol (Ministerio de Salud Argentina 2011).

Son pocos los países que cuantifican de manera sistemática la implicación del alcohol en actos violentos. Carrasco Gómez indica para España: 29% de dependientes alcohólicos entre los homicidas, 12 - 65% en malos tratos a la infancia y 48 - 87% en los malos tratos a cónyuges. En los Estados Unidos, el 35% de los atacantes violentos están relacionados con alcohol, en Inglaterra y Gales el 50%, en la Federación de Rusia las tres cuartas partes de los detenidos por homicidio habían consumido alcohol poco antes del incidente, en Sudáfrica el 44%, en Tianjin (China) un estudio entre reclusos mostró que el 50% de los agresores habían consumido alcohol antes del incidente (OMS 2006). Entre el 20 - 50% de los accidentes de tránsito en América, se encuentran relacionados con el alcohol (OMS 2004). El 50,5% de las muertes atribuibles al alcohol se debieron a lesiones (intencionales y no intencionales).

El consumo de vino en la Argentina por habitante fue de 24,7 l por año (instituto nacional de Vitivinicultura, 2005), y de 9,3 l de alcohol por año en mayores de 15 años (2008-2010 WHO 2014). La Agencia Nacional de Seguridad Vial, en los últimos 15 años, publica que 113.939 personas murieron en Argentina por accidentes viales y alrededor del 50% de los fallecidos en los siniestros presentó altos niveles de alcohol y drogas.

Según datos de la Secretaría de Programación para la Prevención de la Drogadicción y la Lucha contra el Narcotráfico (SEDRONAR), se estima que en la Argentina hay casi 2 millones de alcohólicos y que por año mueren en el país unas 25 mil personas por causas relacionadas al alcoholismo. La SEDRONAR, a través

## Toxicología del alcohol étílico

de su Observatorio Argentino de Drogas (OAD), realizó a mediados del año 2007 la Tercera Encuesta Nacional a Estudiantes de Enseñanza Media, sobre consumo de sustancias psicoactivas y factores de riesgo y protección asociados. El estudio informa sobre la magnitud del consumo de alcohol, tabaco, psicofármacos usados sin prescripción médica (tranquilizantes y estimulantes), solventes o inhalables, marihuana, cocaína (clorhidrato y pasta base), heroína y otras drogas ilegales a partir de un cuestionario auto-aplicado.

Epidemiológicamente sería interesante saber cuándo se considera que la ingesta de alcohol constituye un consumo de riesgo. Es muy difícil consensuar un único criterio, dependerá de que se esté valorando: conducción de vehículos, aparición de diversas patologías orgánicas, etc. En Europa se viene considerando el límite en 40 g/día para el hombre y 24 g/día para la mujer. En Estados Unidos los límites aumentan a 60 g/día (420 g/semana) para hombres y 40 g/día (280 g/semana) para mujeres (Repetto, 2013). Según Rubio (2000), se clasifican en riesgos moderados < 40g/día para los hombres y <24 g/día para mujeres; de riesgo > 40g/día y > 24g/día respectivamente o >80 g en período corto de tiempo (horas), al menos una vez al mes.

Se considera a la población femenina (sobre todo embarazadas) y a los adolescentes en carácter prioritario, dado que sufren una mayor exposición a las conductas de riesgo relacionadas con el uso excesivo de alcohol.

En los últimos años, se ha producido un significativo avance en la tecnología involucrada en el proceso de medición de los niveles de alcohol en sangre, no obstante lo cual la confiabilidad de los resultados que se obtienen, continúan estando subordinadas al adecuado manejo de las muestras hemáticas; como por ejemplo una adecuada selección del sitio anatómico para su obtención (muestras clínicas / muestras tanatológicas), elección del método más conveniente para su obtención, el volumen a obtener, la selección del recipiente contenedor más adecuado, el uso de preservadores, condiciones de almacenamiento, etc. (Alvarado Guevara et al., 2008).

Ferrari (2008) señala que la determinación de alcohol en humores o tejidos humanos es, por lejos, una de las prácticas analíticas más frecuentes en un laboratorio forense con importantísimas consecuencias legales, tanto en individuos vivos (conductores de vehículos bajo los efectos del alcohol, accidentes laborales y lesiones graves) como en casos criminales relacionados con muertes violentas, suicidios, violaciones o abusos deshonestos. En el caso de análisis de sangre para determinación de alcoholemia post mortem, la selección del sitio de extracción a partir de zonas preestablecidas, como así también la correcta preservación, envasado y pronto envío al laboratorio; facilitarán la estabilidad de la muestra, evitando errores de interpretación y contribuirán a la confiabilidad de los valores que se obtengan, una vez realizado el estudio analítico correspondiente.

La falta o ausencia de confiabilidad en las muestras de sangre que se obtienen para la investigación de alcohol post mortem, tiene un origen doble. Por un lado, se debe a la no observancia de normas básicas que rigen el correcto procedimiento para la colección de las mismas; por otro, y no menos importante, se debe a lo que

Lencioni (2003) define como las disfunciones básicas que afectan a todo equipo humano de trabajo: ausencia de confianza, temor al conflicto, falta de compromiso, no asumir responsabilidades y falta de atención a los resultados. Todo ello debe ser entendido como falta de integración sistémica entre los individuos que conforman un equipo forense, para el caso que nos ocupa.

Senge et al. (2006) sostienen que el pensamiento sistémico, en un sentido amplio, abarca una variedad de métodos, herramientas y principios que tienen por finalidad examinar y comprender la interrelación de fuerzas que forman parte de un proceso común, en pos de lograr la integración sistémica. Según esta afirmación, resulta evidente que las acciones individuales de cada uno de los miembros de un equipo tienen consecuencias directas sobre el resto de sus integrantes, como así también sobre el proceso al cual se dedican.

Aún hoy, a pesar de toda la ciencia y la técnica a nuestra disposición, el trabajo en equipo continúa siendo la ventaja competitiva decisiva, precisamente por ser un bien tan escaso como poderoso. En el mismo sentido, Covey (2012) señala que para que un equipo pueda lograr sus más altas aspiraciones y superar sus mayores retos, debe identificar y aplicar el principio o ley natural que gobierna los resultados que busca.

### **Patrones de consumo y riqueza alcohólica de las bebidas**

Vallejo (1998) ofrece una clasificación de las conductas que se relacionan con el consumo de etanol:

- a) Bebedores no problemáticos: son los bebedores ocasionales o moderados.
- b) Bebedores problemáticos: individuos a los que la ingesta produce complicaciones conductuales:
  - bebedores sociales: como medio de integración en reuniones sociales.
  - bebedores fuertes: beben abundante cantidad de alcohol durante el día sin llegar a la embriaguez inadecuada.
  - ebrios ocasionales: bebedores fuertes que se embriagan voluntariamente.
  - bebedores alcohólicos: pierden el control sobre el consumo. Aparece la tolerancia, dependencia fisiológica y síndrome de abstinencia.

Las bebidas alcohólicas se obtienen por fermentación de productos vegetales, acelerada por acción de levaduras. La concentración máxima del producto activo etanol en estos casos es de un 10%, por encima del cual se vuelve letal para las levaduras catalíticas. En el siglo VIII se introdujo el proceso de destilación, que permitió obtener bebidas de elevada graduación alcohólica.

El sabor y aroma de los productos alcohólicos, esenciales para el ritual de consumo, son debidos a muchas otras sustancias presentes en pequeñas cantidades, las cuales en general, no alcanzan concentraciones que vuelvan nociva la bebida. Por ello, se puede decir que los efectos dañinos de las bebidas alcohólicas se deben exclusivamente al contenido en etanol, salvo agregados fraudulentos de

## Toxicología del alcohol etílico

otros componentes.

**La llamada riqueza o graduación alcohólica** es, de acuerdo con el Reglamento del Consejo CE 1493/1999, el porcentaje de etanol (expresado en ml) presente en 100 ml de bebida (% volumen/volumen, que se puede convertir en % peso/volumen multiplicando por la densidad del etanol 0,79074) (Repetto, 2013).

Como ejemplo, indicaremos la graduación de algunas bebidas habituales:

Cerveza (3,5-5%), cervezas especiales (6-10%), vinos (10-16%), licores (39-43%), sidra (5-6%), whisky (45-50%), entre otros (Repetto, 1995).



## Capítulo 2

### Toxicocinética y toxicodinámica del etanol

#### TOXICOCINÉTICA

**Absorción:** el alcohol se ingiere generalmente por vía oral, salvo excepciones de uso actual en adolescentes que buscan una intoxicación rápida, de mayor potencia y sin aliento alcohólico para escapar del control paterno, que utilizan la vía conjuntival, anal o vaginal (eyeballing, tampodka o tampax on the rocks), y por vía respiratoria (oxy-shots) mediante nebulización de bebidas alcohólicas (Burillo Putze et al., 2012).

Tal como explica Repetto (1995), la absorción del alcohol etílico, luego de una ingesta alcohólica, se produce en un 20% en el estómago y el 80% restante en la primera porción del intestino delgado, pasando al torrente sanguíneo y, desde allí, distribuyéndose en los diferentes compartimentos orgánicos, según el contenido acuoso de los mismos (tanto mayor, cuanto mayor el contenido acuoso). El etanol es un compuesto hidrófilo y liposoluble, aunque se disuelve más en agua que en lípidos (coeficiente de reparto octanol/agua= 0,70795), lo que le permite ser absorbido con facilidad por cualquier vía, y distribuirse rápidamente tanto en los compartimientos acuosos como en los lipídicos y penetrar en el sistema nervioso central (SNC).

Si bien es ingerido por la boca, sus vapores pueden absorberse por vía respiratoria (personas que trabajan en destilerías, bodegas, catadores pueden llegar a tener una intoxicación crónica) y también puede absorberse por piel.

La velocidad y el tiempo en que el alcohol tarda en ser absorbido depende de:

- Estado de vaciamiento del estómago: la comida y aún más la grasa disminuye la absorción, primero porque tarda más en metabolizarse el alcohol -lo mismo que los alimentos- y segundo, porque parte es excretado con las heces, sobre todo esto aumenta si las sustancias son grasas ya que impiden la absorción por impermeabilización de la mucosa intestinal.

- Modo de ingestión de la bebida: existe la creencia de que si se mezclan las bebidas el efecto es mayor, pero está comprobado que no es así. Sólo depende de la cantidad de alcohol ingerido independientemente del origen. El gas aumenta la absorción.

- Concentración: el alcohol es absorbido más rápidamente cuando su concentración en la bebida está entre el 10-30%, concentraciones más bajas, disminuyen el gradiente gastrointestinal y su absorción; mayores al 30% irritan la mucosa y el esfínter pilórico, causando secreción de mucus y retardando el vaciado gástrico.

**Distribución:** dada su hidrosolubilidad va disuelto en el plasma sanguíneo, siendo la concentración en plasma o alcoholemia, el factor decisivo para la impregnación tisular. Una vez alcanzada una situación de equilibrio dinámico de distribución, empieza el proceso de eliminación del mismo, regresando al torrente circulatorio para su posterior eliminación.

Para el hombre las proporciones de agua y grasa son 60% y 8-24% respectivamente y en la mujer 55% y 20-36%; por lo que al poseer la mujer menor proporción de agua corporal que el hombre, una misma dosis de alcohol origina mayor concentración en la sangre.

**Metabolismo:** el proceso tiene lugar, principalmente en el hígado (90% aproximadamente). El 10% restante se elimina sin cambios por orina, sudor, saliva y aire espirado, representando esta última vía el 5% del total (Repetto, 1995).

Si bien la biotransformación del alcohol se realiza principalmente en el hígado, se sabe de la existencia de un primer paso en estómago e intestino, existiendo también procesos de biotransformación en hematíes, testículos y cerebro.

La biotransformación se realiza en dos fases (figura 1):

**PRIMERA FASE:** el etanol se oxida a acetaldehído y a diferentes radicales de oxígeno mediante tres vías alternativas

- **Vía mayoritaria:** catalizada por la alcohol deshidrogenasa ADH (EC 1.1.1.1) en mitocondrias (no específica).

- **Vía alternativa** por saturación de la anterior, por una forma inducible del citocromo P-450 (CYP 2E1) en microsoma (no específica).

- **Vía secundaria:** catalizada por catalasas presentes en peroxisomas (no específica).

**SEGUNDA FASE:** se desarrolla por dos vías:

- **Vía principal:** oxidación del acetaldehído mediante las enzimas:

a.1: acetaldehído deshidrogenasa ALDH (EC 1.2.1.3) presente en citoplasma, mitocondrias y microsomas, que lo transforman en acetato que se condensa para formar acetil coenzima A, la cual se integra al ciclo de Krebs hasta CO<sub>2</sub>.

a.2: oxidasas como xantino oxidasa, aldehído hidroxidasa, etc. que forman agua oxigenada e ion acetato.

- **Vía secundaria:** enzimas liasas que condensan el aldehído acético con sustancias como neurotransmisores, originando productos activos sobre el SNC, responsables de efectos secundarios del alcohol.

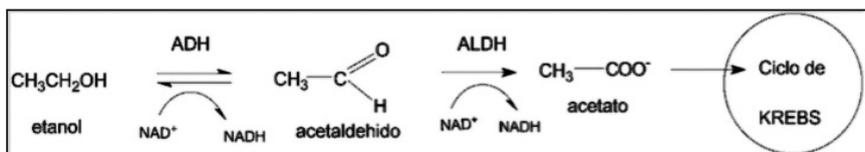


Figura 1: metabolismo hepático por vía principal.

## Toxicología del alcohol étílico

Es interesante conocer que en el metabolismo del etanol se generan especies reactivas como ser:  $\alpha$ -hidroxietilo ( $\text{CH}_3\text{-}\bullet\text{CHOH}$ ) (HE) en un 80%, y los radicales  $\bullet\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{OH}$  y  $\text{CH}_3\bullet\text{CHOH}$ .

A su vez, HE puede reaccionar con oxígeno y formar el radical peroxilo, o con proteínas y agentes antioxidantes como glutatión reducido,  $\alpha$  tocoferol y ácido ascórbico.

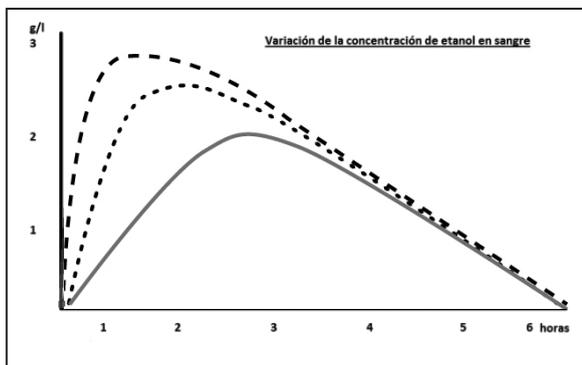
También se pueden originar otros aldehídos citotóxicos como 4-hidroxi-trans-2-nonenal (HNE) y ácido 4-hidroxi-nonanoico (HNA), los cuales pueden reaccionar con glutatión.

La condensación expresada anteriormente en b), puede ocurrir in vitro, in vivo e incluso en el cadáver, con el acetaldehído y los neurotransmisores adrenalina, dopamina, serotonina originando alcaloides como carbolinas.

Se ha comprobado la presencia de condensaciones con 5-HT dando 1-metil-6-hidroxi-1, 2, 3, 4-tetrahidro- $\beta$  carbolina, radicales libres producidos en la oxidación y su conjugado con el glutatión 8-S-glutatínil-1-metil-1, 2, 3, 4-tetrahidro- $\beta$  carbolina-5,6-diona, potente tóxico para roedores. Este metabolito provoca hiperactividad y temblor al unirse al receptor  $\text{GABA}_B$  e induce la liberación de dopamina y opioides endógenos (en regiones del cerebro inervadas por serotonina), lo que puede relacionarse con el inicio de la dependencia al etanol. Además, la formación de especies reactivas de oxígeno reducido, puede contribuir a la degeneración de neuronas de las vías serotoninérgicas. También se ha visto la condensación del acetaldehído con dopamina, con formación de tetrahidropapaverolina en distintas regiones cerebrales (extraído de Repetto, 2013).

El proceso de metabolización hepático, es el responsable de producir en condiciones basales una tasa de decrecimiento promedio de la concentración de etanol en sangre igual a 0,15 g/l por cada hora transcurrida. Este coeficiente que fija el valor de disminución de la concentración de alcohol étílico en sangre en función del tiempo transcurrido, recibe el nombre de coeficiente beta ( $\beta$ ) de etil oxidación, y es el factor de corrección o ajuste que permitirá calcular valores de alcoholemia retrospectivos al momento de ocurrido el hecho bajo investigación.

Este conocimiento se debe a los trabajos realizados por Widmark, quien en 1932, estableció que la rama descendente de la curva que lleva su nombre y que muestra



como varía la concentración de etanol en sangre, decrece a un valor constante de 0,15 g/l/hora (Jickells y Negrusz, 2008) Repetto, 1995; Ferrari, 2008).

Figura 2. Representación esquemática de la variación de alcohol étílico en sangre.

Según puede observarse en la Figura 2, la máxima concentración en sangre luego de una ingesta alcohólica única, se alcanza aproximadamente dos horas después de ocurrida la misma (línea de puntos).

La línea de guiones, superior, representa lo que ocurre cuando la ingesta alcohólica ocurre con el estómago “vacío”; aquí puede observarse que el valor de concentración alcanzado es considerablemente mayor, comparado con el anterior y, por otra parte, el tiempo de absorción para alcanzar la concentración máxima en sangre se alcanza tan pronto como una hora después de producida la ingesta, tiempo que se ha corregido a 15-30 minutos según Repetto (2013). Por el contrario, la línea gris inferior representa la situación que tiene lugar cuando la ingesta alcohólica se produce con el estómago “lleno” con alimentos sólidos y/o grasos. En este último caso, el valor de concentración en sangre alcanzado es considerablemente menor, en comparación con las dos situaciones anteriores; el tiempo necesario para lograr el máximo de concentración en sangre, puede prolongarse hasta cuatro horas después de la libación o 90 minutos según la actualización de Repetto, 2013.

Cuando se ingieren sucesivas dosis, la curva adquiere un trazo en forma de zigzag, formado por varias curvas fraccionarias, pero cuando cesan las libaciones se alcanza un máximo definitivo a partir del cual se desarrolla la fase de eliminación.

La variabilidad de tiempo requerida para alcanzar la máxima concentración sanguínea descrita es la que explica y justifica la necesidad de obtener dos muestras hemáticas, con una hora de diferencia entre ambas, para realizar estudios de etanol en sangre en individuos vivos, sobre todo ante la eventualidad de tener que realizar estudios retrospectivos al momento de ocurrido el hecho bajo investigación.

A su vez, la concentración de etanol en sangre no es un valor medio del etanol en el cuerpo, ya que este no se distribuye de forma homogénea en los tejidos, sino en el volumen aparente de distribución, que se calcula multiplicando el peso corporal en kilogramos por el coeficiente de distribución que es de 0,7 para el hombre y 0,6 para la mujer. De esta manera se puede calcular, conociendo el valor de la alcoholemia en g/l, la impregnación alcohólica, de la siguiente manera:

$$\mathbf{P \text{ de alcohol en g} = P \text{ corporal en kg} \times 0,7 \times \text{alcoholemia en g/l}$$

Tomando como referencia la curva esquematizada en la Figura 2; es importante considerar que la curva de eliminación urinaria estará retrasada con respecto a la de alcoholemia, y no guarda relación alguna con ella, por lo que no es útil a efectos de investigación de la impregnación alcohólica (ver mayores detalles en Repetto, 2005).

El aire alveolar, aire espirado o aliento, que alcanza su máximo de concentración alcohólica a los pocos minutos de ingerido éste, exhibe hacia los 20 minutos una curva que se vuelve paralela a la de alcoholemia, ubicándose por debajo de ella

## Toxicología del alcohol etílico

al llevar menor concentración de alcohol; resultando muy útil a efectos analíticos.

### **TOXICODINÁMICA**

Con respecto a la toxicodinamia del etanol, se acepta que los efectos se deben al aumento del flujo de cloro inducido por la acción del GABA sobre sus receptores GABA<sub>A</sub>, causando hiperpolarización e inhibición en la post sinapsis. Otros receptores involucrados son: inhibición del NMDA (N-metil-D-aspartato), el nicotínico de la acetilcolina, el GMP3-5-monofosfato cíclico de guanosina y prostaglandinas centrales.

También el alcohol produce vasoconstricción cerebral, alteración de la liberación de calcio (inhibe la apertura de canales de Ca voltaje dependientes en neuronas) y de sustancias ansiogénicas endógenas. Afecta órganos del equilibrio produciendo nistagmus alcohólico posicional bifásico; causa vasodilatación cutáneo-mucosa, con aumento de la pérdida de calor y disminución de la temperatura corporal.

Inhibe la hormona antidiurética aumentando la diuresis; aumenta el desorden estructural de las membranas lipídicas con aumento de su fluidez y excitabilidad.

Con el uso se desarrolla tolerancia funcional y metabólica, llevando a la dependencia fisiológica. Posee tolerancia cruzada con otros neurolépticos como las benzodiacepinas, pero si se consumen simultáneamente se produce sinergismo y la depresión es mayor (Vallejo, 1997).

Si tomamos el esquema de los efectos del alcohol sobre las habilidades psicomotoras y cognitivas de Dubowski (1994) (Tabla 1) como referencia, podemos comprender los solapamientos de signos y síntomas que ocurren a distintos niveles de alcoholemia:

<b>ALCOHOLEMIA G/L</b>	<b>INFLUENCIA</b>	<b>SIGNOS Y SÍNTOMAS</b>
0,1-0,5	Subclínico	Sin influencia aparente, comportamiento casi normal.
0,3-1,2	Euforia	Leve euforia, sociabilidad, locuacidad, aumento de confianza. Disminución de las inhibiciones, de la atención, el juicio y el control, del procesamiento de la información, pérdida de eficiencia en pruebas psicomotoras finas.
0,9-2,5	Excitación	Inestabilidad emocional, pérdida de juicio crítico, deterioro de la percepción, la memoria y la comprensión. Disminución de la respuesta sensorial, aumento del tiempo de reacción, reducción de la agudeza visual, visión periférica y recuperación de reflejos, incoordinación sensorial-motora, deterioro del equilibrio, somnolencia.

1,8-3	<b>Confusión</b>	<b>Desorientación, confusión mental y mareos, estados emocionales (miedo, rabia, tristeza, etc.) exagerados, trastornos de la visión (diplopía), y de la percepción, el color, la forma, el movimiento, las dimensiones, aumento del umbral del dolor, falta de coordinación muscular, marcha vacilante, dificultad para hablar, apatía, letargo.</b>
2,5-4	<b>Estupor</b>	<b>Pérdida de la función motora, disminución marcada de la respuesta a estímulos, falta de coordinación muscular, incapacidad para pararse o caminar, vómitos, incontinencia, conciencia y respiración alterada, muerte posible.</b>
3,5-5	<b>Coma</b>	<b>Inconsciencia completa, coma, reflejos deprimidos o abolidos, hipotermia, incontinencia, alteración de la circulación y la respiración; posible muerte por paro respiratorio.</b>
4,5- más	<b>Muerte</b>	

Tabla 1: efectos del alcohol sobre las habilidades psicomotoras y cognitivas (Dubowski, 1994).

Los efectos metabólicos del etanol son producidos en parte por el aumento de la relación NADH/NAD<sup>+</sup>, que produce elevación de glicerol 3- fosfato, aumento de síntesis de ácidos grasos (ocasiona la acumulación de triglicéridos en hígado), hiperuricemia, acidosis metabólica (por el aumento del pasaje de piruvato a lactato), hiperglucemia si hay depósito de glucógeno hepático o hipoglucemia si no lo hay.

A su vez el acetaldehído produce aumento de la peroxidación lipídica, del daño a membranas celulares y mitocondrias.

El alcohol puede provocar intoxicación aguda, que puede dar lugar a casos severos de trastornos metabólicos pudiendo llegar al coma. Se observan alteraciones neurológicas y psiquiátricas, trastornos en la regulación térmica, cardiovasculares, gastrointestinales y metabólicos. El diagnóstico de certeza consiste en la determinación de la alcoholemia.

También el consumo crónico puede provocar síndromes nutricionales, gastrointestinales, hematológicos, musculares, cardiovasculares, metabólicos, pulmonares y trastornos del SNC.

Son importantes cuadros la aparición del síndrome de abstinencia alcohólica y

## Toxicología del alcohol etílico

su forma más grave, el delirium tremens.

### ALCOHOL POST MORTEM

El valor de alcohol en sangre real (alcoholemia) puede sufrir variaciones post mortem:

- *Disminución: por volatilización, oxidación microbiana aerobia y anaerobia*
- *Aumento o ganancia: (alcohol endógeno) por contaminación microbiana*

Valores de alcoholemias de hasta 0,3 g/l pueden encontrarse en la sangre de individuos que no hayan consumido alcohol, correspondiendo al alcohol endógeno, formado por transformación metabólica de los hidratos de carbono ingeridos por fermentación intestinal. También durante la putrefacción cadavérica y en muestras de sangre sin aditivos conservadores, pueden formarse proporciones variables de etanol.

En individuos previamente hospitalizados, es necesario conocer el tratamiento médico recibido, ya que ciertos medicamentos pueden aumentar la formación de alcohol postmortem. Por ejemplo: el manitol (diurético osmótico), el alcohol de 70° usado como desinfectante, etc. En los estudios de toxicología post mortem, se ha determinado que un valor menor a 10 mg/100 ml (0.1 mg/ml) debe ser reportado como negativo (Alvarado Guevara et al., 2008).

En los procesos de destrucción cadavérica se distinguen tres fases: autólisis, fermentación y putrefacción; en la de fermentación por glicólisis de los hidratos de carbono, se originan alcoholes como etílico, metílico, n-propílico, iso-propílico, n-butanol, sec-butanol, etc. (Repetto, 2013)

En la autólisis de tejidos se produce reblandecimiento y licuefacción de tejidos. Las bacterias colónicas (*Escherichia coli*, *Candida sp*, *Clostridium* y *Klebsiella*) invaden tejidos y el sistema vascular, unas pocas horas luego de la muerte (6 horas a temperatura ambiente). Esto depende de factores aceleradores del proceso como temperatura ambiental, lesiones intestinales, enfermedades neoplásicas o gangrenas, infección, posición del cuerpo o la presencia de traumas extensos (Alvarado Guevara et al, 2008).

En los casos de análisis pos mortem es muy importante poder comparar los resultados de alcoholemia con otras muestras como orina o humor vítreo. La presencia de alcohol en todas las muestras sugiere alcohol exógeno, mientras que la presencia de alcohol en sangre en valores bajos, y muestras negativas de humor vítreo y orina, dan idea de alcohol endógeno siempre y cuando la muerte no se haya producido en una primera fase absorbiva.



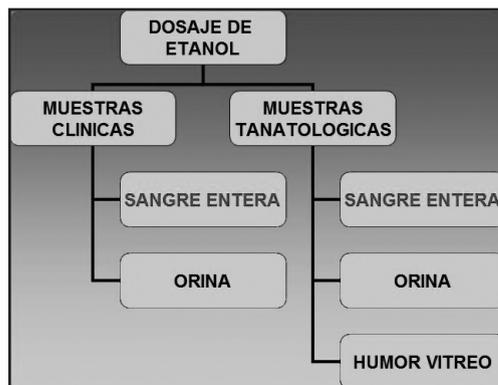
# Capítulo 3

## Obtención de muestras biológicas

El adecuado proceder al momento de coleccionar muestras biológicas para el dosaje de etanol, constituye el primer paso para asegurar la calidad que las mismas requieren para lograr resultados confiables y reproducibles. No importa cuánto esfuerzo se realice, nunca se insistirá lo suficiente sobre la importancia de este tópicico. Esto es así ya que muestras de adecuada calidad permiten obtener resultados confiables y reproducibles, independientemente de la complejidad técnica del laboratorio en el cual se analicen. Por el contrario, muestras carentes de los atributos de valor requeridos para este tipo de estudios no permitirán la obtención de resultados confiables y reproducibles aunque se tenga a disposición la más alta y moderna tecnología analítica.

### 3.1 CLASIFICACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS PARA ESTUDIOS DE ETANOL

En la práctica profesional, las muestras que con mayor frecuencia pueden recibirse en el laboratorio para realizar el dosaje de etanol son las que se resumen en el Gráfico 1.



*Gráfico 1. Muestras biológicas más frecuentes para dosajes de etanol.*

El primer grupo, muestras clínicas, corresponde a aquellas que provienen de individuos que se encuentran cursando una intoxicación activa (aguda o crónica); mientras que el segundo grupo, muestras tanatológicas, corresponde a aquellas que provienen de individuos ya fallecidos, en los cuales se busca establecer si el etanol pudo constituir un factor coadyuvante o predisponente en la causa del deceso.

En individuos vivos, las muestras de sangre deben ser obtenidas por punción venosa, recomendándose la extracción de dos muestras hemáticas con una (1) hora de diferencia entre ambas, considerando la necesidad eventual de tener que

realizar cálculos retrospectivos (Repetto, 1995). Asimismo, resulta altamente recomendable la utilización de EDTA-Fluoruro al 1 – 2 % como anticoagulante / preservante; ya que el mismo retrasará significativamente la aparición de modificaciones en la concentración original de etanol en la matriz biológica a analizar, como consecuencia de factores endógenos. Tener en cuenta que la zona donde se realizará la venopunción no debe ser higienizada con etanol para evitar contaminaciones.

Con relación a la otra muestra representativa de este grupo, orina, se recomienda su obtención por micción espontánea sin el agregado de conservantes o preservantes (Alvarado Guevara et al., 2008; Ferrari, 2008 y Jickells & Negrusz, 2008).

Por otra parte, cuando consideramos las muestras hemáticas de origen tanatológico, existen diferentes alternativas a la hora de obtener muestras idóneas para el estudio de la concentración de alcohol etílico post mortem. En este sentido, y siguiendo las recomendaciones dadas por Repetto (1995) y Alvarado Guevara et al. (2008), la principal muestra a obtener está representada por sangre tomada de la región femoral (Figura 4. A).

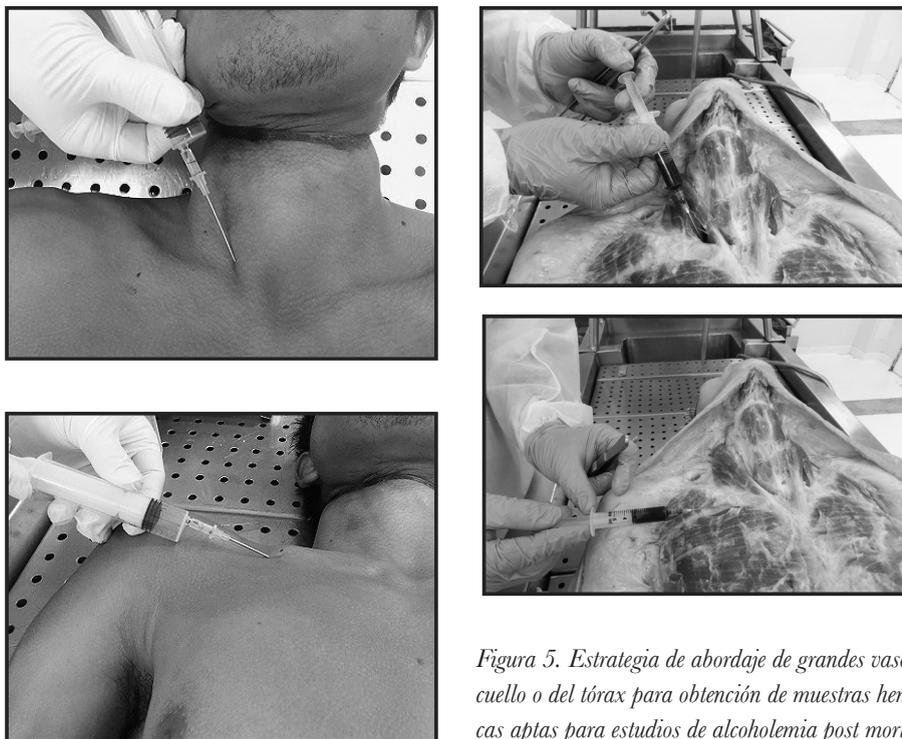


*Figura 4 A: Esquema de abordaje femoral.*

Las muestras de sangre tomadas de la región femoral han demostrado ser las menos susceptibles a sufrir cambios post mortem, principalmente como consecuencia de su lejanía anatómica con el estómago y con el sistema pulmonar, siendo éstas las principales razones para su recomendación como muestra estándar para el dosaje de etanol en individuos fallecidos. En el mismo sentido, Ferrari (2008) y Jickells & Negrusz (2008) recomiendan como la muestra de sangre con mayor idoneidad para la realización de estudios de alcoholemia post mortem a la obtenida de la vena femoral, por los mismos motivos y razones expuestos precedentemente, agregando que existe sobrada evidencia experimental que documenta la contaminación de muestras sanguíneas tomada de sitios anatómicos circundantes al estó-

## Toxicología del alcohol etílico

mago y al aparato broncopulmonar, por fenómenos de difusión pasiva del alcohol que pudiera estar presente en estas localizaciones anatómicas. Estos autores destacan que muestras obtenidas a partir de otras localizaciones anatómicas, tales como grandes vasos del cuello o del tórax (Figura 5) o, en su defecto, cavidades cardíacas (Figura 6), deben ser consideradas sólo como una alternativa ante la imposibilidad de obtener muestras de la región femoral, la cual constituye la muestra de elección preferencial (Villanueva Cañadas, 2004).

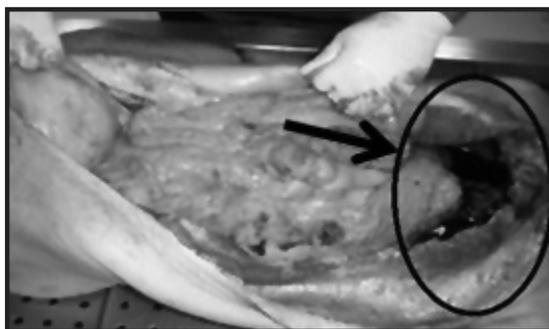


*Figura 5. Estrategia de abordaje de grandes vasos del cuello o del tórax para obtención de muestras hemáticas aptas para estudios de alcoholemia post mortem.*



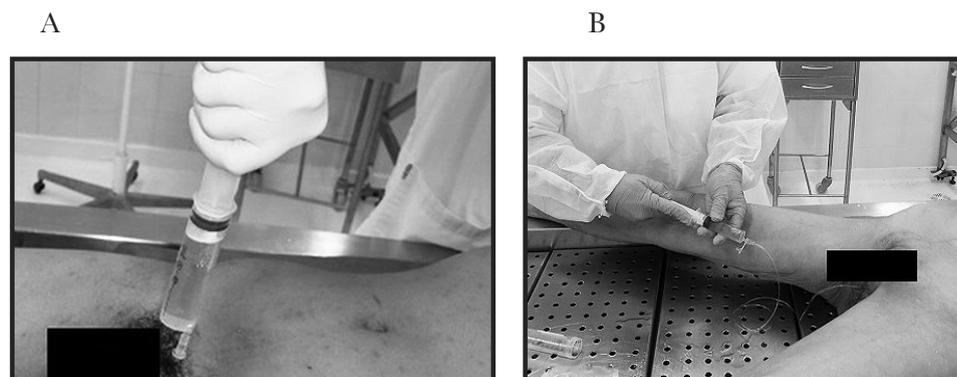
*Figura 6. Obtención de muestras de sangre para estudios de alcoholemia post mortem por punción de cavidades cardíacas.*

Existe amplio consenso entre los autores antes mencionados con relación al hecho que debe desaconsejarse por todos los medios posibles la colección de muestras de sangre a partir de acúmulos hemáticos libres, que pudieran formarse en la cavidad torácica y/o abdominal durante la realización de la autopsia (Figura 7). Ello es así en virtud de que este tipo de muestras se encuentran altamente contaminadas con el alcohol que pudiera estar presente en el estómago o en el aparato bronco pulmonar, como así también poseen una elevada carga microbiana, que puede dar origen a la formación secundaria de alcohol etílico de origen endógeno.



*Figura 7. Colección hemática libre en cavidad torácica.*

En lo referente a la obtención de muestras de orina post mortem, valen las mismas consideraciones hechas para las muestras clínicas; solo que en este tipo de situaciones los mecanismos de obtención de tales muestras son el sondaje vesical o la punción supra-púbica (Figura 8). En todos los casos adquiere particular importancia mantener las muestras de orina refrigeradas a 4°C hasta el momento de ser remitidas al laboratorio para su análisis. Asimismo, se utilizarán recipientes contenedores que aseguren un cierre hermético y que resulten de una capacidad adecuada al volumen de muestra obtenido, de tal manera de evitar la existencia de cámara de aire, o bien, que la misma sea lo más pequeña posible.



*Figura 8. Obtención de muestras de orina por punción supra-púbica y sonda vesical.*

## Toxicología del alcohol etílico



Finalmente, el otro representante válido dentro de este grupo está constituido por las muestras de humor vítreo. Este tipo de muestra resulta particularmente útil para distinguir los casos de intoxicación ante mortem de aquellos en los cuales la generación de etanol es un fenómeno post mortem (asfixia por sumersión y cadáveres en avanzado estado de descomposición, entre los casos más frecuentes). Entre las ventajas más importantes que la convierten en una matriz válida

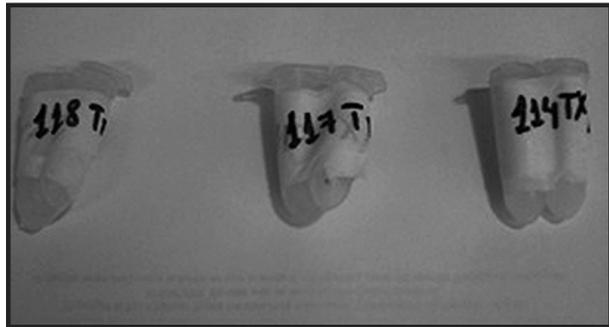
para investigar casos de intoxicación alcohólica, se pueden mencionar su naturaleza acuosa, es una muestra relativamente limpia, su lejanía anatómica de la cavidad abdominal y del tórax (evita fenómenos de contaminación por difusión pasiva), es fácil de obtener, entre otros (Alvarado Guevara et al, 2008). En la práctica, resulta posible obtener volúmenes iguales a 2 a 3 mililitros de muestra por cada globo ocular. El método de obtención es por punción del globo ocular; los recipientes para su almacenamiento y remisión al laboratorio deben permitir un cierre hermético y ser de dimensiones adecuadas al volumen obtenido. Las muestras deben ser mantenidas a 4°C hasta el momento de ser remitidas al laboratorio y, una vez allí, pueden ser freezadas (-18° C) por largos períodos hasta ser analizadas en virtud de las ventajas mencionadas precedentemente (Figura 9 A y B).



A

*Figura 9. Muestras de humor vítreo para estudios de etanol post mortem.*

B



Resulta importante destacar que tanto las muestras de orina como de humor vítreo son consideradas muestras complementarias a las hemáticas. Es decir complementan la información que puede obtenerse respecto de la concentración de

alcohol presente en las muestras de sangre, pero bajo ningún concepto pueden reemplazar a la misma o, peor aún, realizar inferencias respecto de la concentración sanguínea de alcohol etílico a partir de las concentraciones halladas en orina y/o humor vítreo. Su valor e importancia práctica como muestras complementarias será desarrollado con mayor detalle más adelante en este mismo texto.

Por otra parte, resulta oportuno mencionar en este punto lo citado por Alvarado Guevara et al (2008) respecto del análisis de los coágulos subdurales o epidurales, especialmente para aquellos casos en los cuales se ha establecido como posible causa de muerte un trauma encéfalo-craneano. Esto es así como consecuencia de que la colección hemática que constituye el coágulo sanguíneo, no es metabolizada a nivel hepático y por ello la concentración sanguínea de etanol tenderá a mantenerse invariable durante horas y reflejando los valores hemáticos de etanol al momento de ocurrido el hecho violento que le diera origen (accidente de tránsito, traumatismo en ocasión de riña, etc.).

### **3.2. CONTENIDO ACUOSO DE MUESTRAS HEMÁTICAS**

Una vez que el alcohol etílico ingresa al organismo y es absorbido, se distribuye en los diferentes compartimentos orgánicos según el contenido acuoso de los mismos. En líneas generales, se acepta que tanto mayor será la avidéz del etanol por un dado compartimento cuanto mayor sea su contenido acuoso. Siguiendo este principio resulta indispensable destacar que no todas las muestras hemáticas son equivalentes en lo referente a su capacidad de solubilizar etanol. Esta capacidad será tanto mayor cuanto mayor sea el contenido acuoso de la muestra hemática considerada. Así, en igualdad de condiciones (íngestas alcohólicas equivalentes) e incluso para un mismo individuo, la concentración de alcohol será mayor para el suero, en comparación con el plasma sanguíneo y éste, a su vez, mayor que para la sangre entera.

#### **SUERO > PLASMA > SANGRE ENTERA**

Esta observación de carácter práctico tiene su explicación en el hecho que el suero presenta el mayor contenido acuoso relativo dentro de las muestras hemáticas que pueden ser obtenidas (libre de elementos figurados y libre de la mayor parte del contenido proteico); mientras que la sangre entera posee, en comparación, el contenido acuoso más pobre. Por lo expuesto, la muestra hemática estándar para determinar la concentración de etanol la constituye la sangre entera, resultando indispensable aclarar en los informes el tipo de muestra utilizada, en caso de utilizar otra distinta (Repetto, 1995; Alvarado Guevara et al, 2008).

Si el analista recibe muestras de suero o plasma en lugar de sangre total, debe transformar su resultado para que sea bien entendido y representativo; tanto por consideraciones teóricas, teniendo en cuenta la proporción ordinaria de agua en la sangre, como por vía experimental. Se sabe que el valor de alcohol en suero o plasma ha de dividirse por el coeficiente 1.11 para obtener la correspondiente proporción de alcohol en sangre. En medios forenses se dispone a veces, como única muestra, humor vítreo de un cadáver; que por la disposición anatómica y escasa

## Toxicología del alcohol etílico

irrigación sanguínea, queda muy protegido de traumatismos y contaminación; en este caso, el factor a aplicar es de 1.1 (Repetto, 2013).

En nuestra experiencia, esta última consideración debería ser evaluada muy cuidadosamente antes de ser aplicada, en razón que se requiere estar en una situación de equilibrio dinámico respecto de la distribución del etanol en los diferentes compartimentos orgánicos para que pueda ser utilizada con seguridad. Para ello, habría que tomar en consideración, como mínimo, el tiempo transcurrido desde la última ingestión alcohólica y nunca perder de vista que el valor obtenido sólo sera una estimación aproximada de la concentración de etanol que podría haber alcanzado en sangre, en condiciones ideales.

### **3.3. IMPORTANCIA, ALCANCES E INTERPRETACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ETANOL EN MUESTRAS DE ORINA Y HUMOR VÍTREO**

Como ya se expusiera precedentemente en este mismo texto, tanto la orina como el humor vítreo, deben ser consideradas muestras que brindan información complementaria al momento de evaluar la concentración de alcohol etílico en sangre.

La muestra de orina presenta una serie de ventajas como matriz analítica para el dosaje de etanol, entre las que destacan su elevado contenido acuoso, baja posibilidad de contaminación por bacterias u hongos y bajo o nulo contenido de glucosa en individuos sanos. Todo ello la vuelve muy poco susceptible de verse afectada por procesos de generación endógena de etanol.

El máximo de concentración de alcohol etílico en orina se alcanza 30 - 60 minutos después de alcanzado el máximo de concentración en sangre.

El establecimiento de la concentración de etanol en orina se realiza con la finalidad de poder establecer la relación de concentración orina/sangre. El resultado de esta relación permite establecer cuán completa fue la absorción de etanol, especialmente en los casos post mortem.

#### **C ETANOL EN ORINA / C ETANOL SANGRE**

Una relación de concentración orina/sangre menor a uno ( $< 1$ ) indica que la absorción ha sido incompleta, es decir, todavía nos encontraríamos en la fase absorbente de la curva de Widmark. Esto podría deberse a una ingestión reciente de bebida alcohólica, lo cual implicaría que podría existir un remanente de la misma en el contenido gástrico.

Una relación de concentración orina/sangre igual o mayor a 1,25 ( $\geq 1,25$ ) indica absorción completa de etanol, es decir, nos encontramos en la fase post absorbente de la curva de Widmark, con lo cual sería lícito asumir que el etanol se ha distribuido libremente en todos los compartimentos orgánicos, según su nivel de afinidad.

Una situación similar se puede establecer cuando se determina la relación de concentración humor vítreo/sangre.

#### **C ETANOL EN HUMOR VITREO / C ETANOL SANGRE**

El humor vítreo, como matriz analítica para la determinación de alcohol etílico, presenta una serie de ventajas entre las que destacan la de poseer un elevado contenido acuoso (buena difusión del etanol) lo cual hace que no presente mayores diferencias con la concentración de alcohol en sangre una vez alcanzada la situación de equilibrio dinámico, es una muestra limpia, fácil de obtener, presenta lejanía anatómica con el estómago y con el colon (disminuye la posibilidad de contaminación microbiana que genere la producción endógena de alcohol etílico); por ello resulta particularmente útil para investigar la concentración de etanol en cadáveres en avanzado estado de descomposición o con traumas severos, permitiendo corroborar la posible producción endógena de etanol. Su desventaja más importante está dada por el hecho de que puede tener sustratos de glucosa en su composición, lo cual la vuelve más susceptible de sufrir procesos de generación endógena de etanol.

Una relación de concentración humor vítreo/sangre comprendida entre 1,15 – 1,20 indica que la absorción de etanol ha sido completa (fase post absorptiva de la curva de Widmark).

Por el contrario, una relación de concentración humor vítreo/sangre mucho menor a uno ( $\ll 1$ ) sería indicativa de una situación de absorción incompleta de etanol (fase absorptiva de la curva de Widmark) o la generación de etanol de origen endógeno por contaminación microbiana, situación muy común en cadáveres en avanzado estado de descomposición (Repetto, 1995; Alvarado Guevara et al., 2008; Ferrari, 2008 y Jickells & Negrusz, 2008).

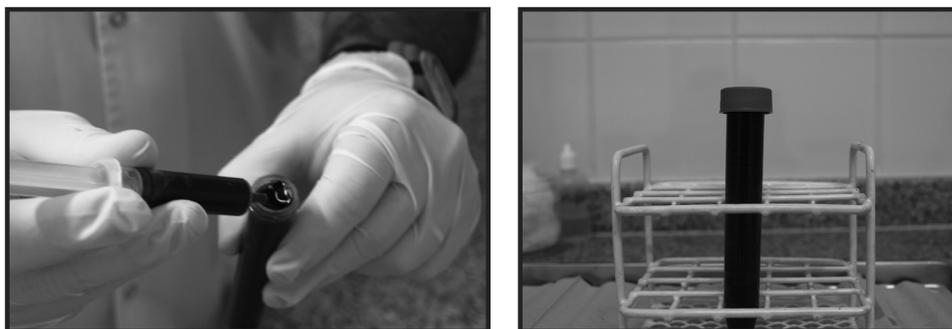
### **3.4. ATRIBUTOS DE VALOR DE MUESTRAS HEMÁTICAS PARA ESTUDIOS DE ALCOHOLEMIA**

Los atributos de valor son criterios de calidad de cumplimiento obligatorio o cuasi-obligatorio que tienen por finalidad asegurar la confiabilidad y representatividad de las muestras obtenidas para ulterior análisis. La confiabilidad y la representatividad, se relaciona con la capacidad de describir fielmente el universo del cual provienen, evitando modificar las características y propiedades que poseían al momento de haber sido obtenidas. Para lograr este objetivo deben tenerse en cuenta una serie de pautas bien definidas que incluyen el uso de preservadores (EDTA-Fluoruro), ausencia de cámara de aire en los recipientes colectores (recipientes llenos al ras), refrigeración y el tiempo de transporte hasta el ingreso al laboratorio que efectivizará el análisis toxicológico específico (Alvarado Guevara et al., 2008; Ferrari, 2008 y Jickells & Negrusz, 2008).

El uso del EDTA-Fluoruro en una concentración no menor al 1% en relación con la muestra de sangre persigue una doble finalidad. Por un lado, la de actuar como un efectivo anticoagulante sanguíneo y, por otro; la de actuar como inhibidor del desarrollo de flora microbiana, particularmente *Candida albicans*, la cual posee la capacidad de generar alcohol en forma endógena como producto metabólico final (Ióvine & Selva, 1993).

## Toxicología del alcohol etílico

Ferrari (2008) insiste en la necesidad de utilizar para la recolección de muestras de sangre para estudios de alcoholemia, recipientes escrupulosamente limpios, que aseguren un cierre hermético y que no contengan cámara de aire (Figura 10 A y B); ello es así en virtud de la naturaleza volátil del analito a pesquisar (alcohol etílico); ya que de no observar estas simples normas podrían ocurrir importantes pérdidas por volatilización, lo cual introduciría una importante causa de error por defecto en las determinaciones analíticas que se realicen a posteriori.



*Figura 10 A y B. Tubos de polipropileno con tapa a rosca para asegurar cierre hermético, llenos al ras, sin cámara de aire.*

Con relación a la refrigeración y tiempo de transporte, Ióvine & Selva (1993) hace un extenso análisis de la influencia de la temperatura en función del tiempo, con relación a las posibles modificaciones que ambos factores podrían introducir en el contenido alcohólico de las muestras, recomendando que las mismas sean analizadas dentro de los quince días de obtenidas, habiendo sido mantenidas en condiciones de refrigeración entre 4 a 8 °C. En contraposición, el trabajo de Brown et al. (1973) demostró que se producen importantes pérdidas por oxidación en el contenido alcohólico de muestras hemáticas, aún en presencia de refrigeración y de EDTA-Fluoruro como anticoagulante (13 mg<sup>0</sup>%, en promedio) luego de cinco días de obtenidas las mismas, razón por la cual no puede soslayarse esta evidencia que indica claramente lo perentorio de los plazos de que se disponen para procesar muestras que permitan obtener resultados confiables y reproducibles.

En base a nuestra experiencia y a condiciones aceptadas universalmente como buenas prácticas al momento de obtener muestras para estudios de alcoholemia, se definieron los principios básicos y fundamentales que se deberían respetar al obtener las mismas. Todo ello con la exclusiva finalidad de construir confianza en todo el proceso de determinación y análisis.

En este sentido, las muestras de sangre que se remitan al laboratorio de toxicología forense para estudios de alcoholemia, especialmente para estudios de alcoholemia post mortem; deberán reunir una serie de cualidades que definirán su idoneidad para la realización del estudio que se requiere.

Estas cualidades constituirán los atributos de valor que deberán reunir las muestras de sangre obtenidas, a los que hicieramos referencia al principio de este apartado.

Para exponer este punto y por ser la situación de mayor complejidad técnica y profesional que se puede enfrentar en la práctica, tomemos como ejemplo lo que ocurre dentro de una sala de autopsias, donde en la obtención de muestras hemáticas interviene un equipo tanatológico integrado por un médico forense, un patólogo, técnico viscerador, técnico radiólogo y auxiliares. La presencia del personal del laboratorio de toxicología que guíe el proceso de obtención y remisión de muestras no siempre es posible, sobre todo como consecuencia de la simultaneidad de casos por atender que tiene lugar en determinadas circunstancias (accidentes con muertes múltiples, autopsias realizadas en distintas localidades alejadas del laboratorio efector, etc.). Estas circunstancias tornan indispensable que todo el personal involucrado en la obtención de muestras se comprometa con el cumplimiento de ciertos criterios de calidad (atributos de valor) que permitan asegurar calidad y representatividad de las muestras obtenidas.

Estos atributos son:

- ***Las muestras de sangre remitidas al laboratorio de toxicología forense deberán poseer una adecuada representatividad.***
- ***Período de transporte no mayor a 72 hs.***
- ***Cantidad (mililitros) suficiente para la realización del estudio requerido, por duplicado.***

Analizando en forma detallada cada uno de los atributos de valor definidos, se debe considerar lo siguiente:

• **Representatividad de las muestras:** una muestra, por definición, es una pequeña porción de materia proveniente de un todo, mucho mayor (su universo). La representatividad de una muestra estará dada por su capacidad de **describir fielmente las características y propiedades** del universo del cual proviene, en el preciso momento en que fue obtenida.

Teniendo presente todas las consideraciones hechas precedentemente, para el caso de muestras hemáticas para estudios de alcoholemia post mortem, la representatividad estará dada por la localización anatómica de la cual proviene dicha muestra. En este sentido, se consideró como valioso y muy oportuno la obtención de muestras de sangre de la región femoral (arteria / vena), antes que las provenientes de cavidades cardíacas o de arteria subclavia; las cuales deben ser consideradas sólo como alternativas ante la imposibilidad de obtener muestras femorales. Esta decisión ha sido tomada en virtud que las muestras femorales minimizan la posibilidad de contaminación por fenómenos de difusión pasiva con alcohol proveniente de otras localizaciones anatómicas contiguas (pulmones, estómago y/o intestinos). Otro consenso establecido en favor de asegurar la representatividad de las muestras, es que las mismas deben ser tomadas con anticoagulante que contenga fluoruro en su composición, para evitar la generación endógena de alcohol por

## Toxicología del alcohol etílico

acción microbiana (anticoagulante / preservante). De presentarse esta situación, la misma constituiría un **fenómeno de alteración** (modificación involuntaria) que introduciría una causa de error por exceso en el resultado que se obtenga.

En el mismo sentido, otro fenómeno de alteración que podría tener lugar como consecuencia de no llenar completamente los recipientes que contienen las muestras (recipientes NO llenos al tope de su capacidad), son las pérdidas de alcohol por volatilización. Esto es así ya que el alcohol es una sustancia volátil, razón por la cual, en caso de quedar cámara de aire en el recipiente que la contiene, constituye una fuente de error por defecto en el resultado que se obtenga. Es por ello que, como parte de los consensos establecidos, se ha acordado que los tubos que contienen las muestras hemáticas deben estar llenos al tope de su capacidad, sin excepción.

Otros cambios que pueden afectar la representatividad de estas muestras son los **fenómenos de adulteración** (modificación voluntaria). Para minimizar esta posibilidad el equipo tanatológico deberá extremar las precauciones y cuidados para que en todo momento se respete la cadena de custodia de los especímenes a analizar.

Por último, para asegurar la representatividad de las muestras a analizar, se deberá asegurar una **correcta identificación** de las mismas. Una correcta identificación de muestras para estudios forenses comprende, en primer lugar, la asignación de un **código de identificación** unívoco. Paralelamente, se deberá completar una **planilla o formulario de remisión de muestras** con todos los datos identificatorios e información complementaria que rodea al caso bajo investigación. Dicha información tiene por finalidad permitir al analista que realice un mejor encuadre e interpretación de los resultados que se obtengan.

• **Período de transporte:** se define así al tiempo transcurrido entre la obtención de la muestra, hasta su llegada al laboratorio toxicológico. Tomando en consideración las posibilidades de modificación en la representatividad de las muestras en función del tiempo transcurrido, la experiencia demuestra que un período de transporte adecuado para el proceso de remisión de muestras al laboratorio toxicológico no debe ser mayor a 72 hs. En nuestra experiencia, hemos constatado que aquellas muestras que son admitidas en el laboratorio dentro de este plazo, no sufren modificaciones que puedan afectar su idoneidad para los estudios que se requieren. Superado este plazo máximo de transporte, pueden tener lugar fenómenos modificativos que afectarían la representatividad de las mismas.

• **Cantidad (mililitros):** El volumen de muestra hemática que se remite al laboratorio toxicológico resulta un parámetro de capital importancia, ya que la cantidad de la misma debe resultar suficiente para la realización de un estudio por duplicado y debe quedar una alícuota para la eventualidad de que se requiera la realización de una contraprueba.

Mucho volumen representa, con el tiempo, un problema físico de almacenamiento. Escaso volumen, representa un problema técnico-analítico imposible de

resolver. En la práctica se considera un volumen adecuado dos muestras de cinco mililitros cada una, tomadas con una hora de diferencia entre ellas, para el caso de individuos vivos (muestras clínicas) y una muestra de quince mililitros (tubo cónico de polipropileno completo) para el caso de individuos fallecidos (muestras tanatológicas).

### **3.4.1. FLUJOGRAMA CORRESPONDIENTE AL PROCESO DE TOMA DE MUESTRAS DE SANGRE PARA ESTUDIOS DE ALCOHOLEMIA POST MORTEM**

Habiendo definido las principales disfunciones que condicionan el desempeño del equipo responsable de obtener las muestras de sangre para estudios de alcoholemia post mortem, resulta de vital importancia establecer detalladamente la secuencia de pasos y operaciones que regirán el proceso de obtención de las mismas.

El proceso se inicia en el mismo momento en que la Autoridad Judicial competente decide que se llevará a cabo una autopsia para establecer, desde un punto de vista técnico-científico, las causas que determinaron el fallecimiento del individuo cuya muerte se investiga.

Es en esta etapa del proceso pericial donde deben tomarse en consideración y ponerse en práctica, con el máximo rigor, todos los criterios para la selección, obtención y preservación de muestras hemáticas desarrolladas en el apartado 3.4.

Cabe destacar que la etapa de mayor criticidad para el proceso considerado la constituye la *selección del sitio anatómico de punción*, a partir del cual se tomará la muestra hemática que será remitida al laboratorio para estudios de alcoholemia post mortem.

Esta decisión no siempre es la resultante de la aplicación simple y directa de criterios técnico-científicos establecidos y aceptados internacionalmente. Muy por el contrario, en muchos casos son las propias circunstancias “de hecho” las que determinan el sitio anatómico a partir del cual será posible realizar la obtención de la muestra sanguínea requerida. El típico caso que grafica la situación descrita, lo constituyen individuos con extensos y profundos politraumatismos, tan frecuentemente asociados a la casuística relacionada con la accidentología vial.

En tales circunstancias resulta indispensable realizar una interconsulta con el laboratorio toxicológico para decidir, en conjunto y con el máximo rigor científico posible, la mejor localización anatómica a partir de la cual se obtendrá la muestra requerida.

Otra etapa crítica dentro de este proceso la constituye todas las operaciones que tienen por finalidad asegurar de modo fehaciente y unívoco *la identidad de la muestra obtenida*; de tal manera que exista una correspondencia perfecta entre la identidad de la muestra a procesar y el individuo del cual proviene.

Esta etapa consta de dos operaciones simultáneas que deben ser realizadas por los integrantes del equipo tanatológico. Por un lado, asignar un código identificatorio al recipiente primario que contiene la muestra y, por otro, completar el for-

## Toxicología del alcohol étílico

mulario o planilla adjunta (en el cual se reproduce dicho código de identificación) con toda la información complementaria disponible; incluyendo las circunstancias que rodearon el deceso del individuo cuya muerte se investiga: causa aparente de muerte, si recibió asistencia médica, si recibió o consumía medicamentos en forma habitual, si padecía enfermedades crónicas, etc. (Figura 11.).

Completar dicho formulario resulta de capital importancia ya que es la única guía de la cual dispone el analista para orientar su investigación y realizar una interpretación de los resultados obtenidos lo más ajustada posible a la verdad real de los hechos bajo investigación.

<b>FORMULARIO PARA DERIVACION DE MUESTRAS PARA ESTUDIOS DE ALCOHOLEMIA POST MORTEM</b>		
<b>DATOS DEL SOLICITANTE</b>		
<b>Institución Derivante</b>	<b>Provincia:</b>	<b>Localidad:</b>
<b>Profesional Solicitante</b>	<b>Apellido y Nombre:</b>	
	<b>Profesión:</b>	<b>Cargo:</b>
<b>DATOS DEL APORTANTE</b>		
<b>Apellido y Nombre</b>		
<b>DNI/LE/LC/CI (Marcar s/corresponda)</b>		<b>N°:</b>
<b>Edad</b>		
<b>Sexo</b>		
<b>Numero de Identificación de Origen</b>		
<b>Historia de abuso de alcohol: SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/></b> <b>Historia de abuso de otras sustancias (especificar):</b> ..... ..... .....		
<b>Consumo de medicamentos (especificar):</b> ..... .....		
<b>Circunstancias Relacionadas con la Muerte:</b> .....		
<b>Existió asistencia médica o internación mayor a 12 hs: SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/></b>		
<b>Principales Hallazgos de Autopsia:</b> ..... .....		
<b>DATOS DE LA MUESTRA</b>		
<b>TIPO DE MUESTRA</b>		<b>CANTIDAD REMITIDA</b>
<b>Sangre. Anticoagulada: SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/></b>		
<b>Punción femoral <input type="checkbox"/></b>		
<b>Punción subclavia <input type="checkbox"/></b>		
<b>Punción cardíaca <input type="checkbox"/></b>		
<b>Otros (especificar): <input type="checkbox"/></b>		
<b>Condiciones de envío: Temperatura Ambiente <input type="checkbox"/> Refrigerada <input type="checkbox"/> Freczada <input type="checkbox"/></b>		
<b>Fecha y hora de extracción:</b> .....		
..... <b>Firma y Sello del Solicitante</b>		

Figura 11. Formulario donde se consigna la información complementaria para la derivación de muestras de sangre para estudios de alcoholemia post mortem.

Mucho menos críticas resultan las etapas de selección del recipiente en el cual será colocada la muestra obtenida, como así también la etapa de preservación por frío ya que, por lo general, las instituciones tienen a su disposición una amplia variedad de recipientes para realizar dicha selección, como así también gran capacidad de guardado de recipientes bajo condiciones de refrigeración.

En la Figura 12 se describe el flujograma correspondiente al proceso de toma de muestras de sangre para estudios de alcoholemia post mortem.

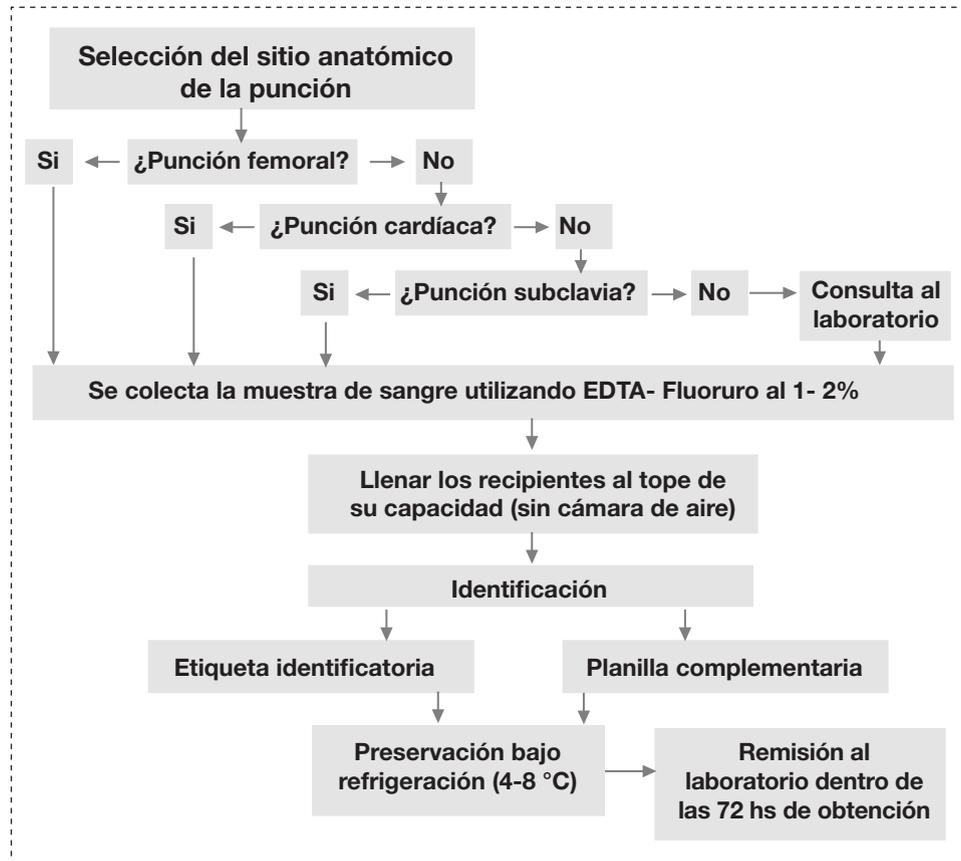


Figura 12 Flujograma del proceso correspondiente a la toma de muestras de sangre para estudios de alcoholemia post mortem.

### 3.4.2 FLUJOGRAMA CORRESPONDIENTE AL PROCESO INGRESO DE MUESTRAS HEMÁTICAS AL LABORATORIO DE TOXICOLOGÍA FORENSE PARA ESTUDIOS DE ALCOHOLEMIA POST MORTEM

Llegadas las muestras al laboratorio de toxicología forense, el personal que recibe las mismas deberá verificar que cumplan con todos los atributos de calidad establecidos para su admisibilidad, asentando en la planilla de registro correspondiente

## Toxicología del alcohol etílico

los incumplimientos observados. Paralelamente, deberá confeccionar y entregar al equipo tanatológico un comprobante de conformidad / no conformidad (Figura 14) respecto de las muestras recibidas; especificando los incumplimientos observados, si los hubiera. Este sistema asegura un “feed-back” de información entre el equipo tanatológico y el personal del laboratorio. En caso de incumplimientos, cualquiera sea este, se deberá realizar con el equipo tanatológico una interconsulta que permita establecer la mejor manera de proceder con dichas muestras, para una adecuada interpretación de los resultados que se obtengan.

En la Figura 13. se describe el flujograma correspondiente al proceso de ingreso de muestras hemáticas al laboratorio de Toxicología Forense para estudios de alcoholemia post mortem.

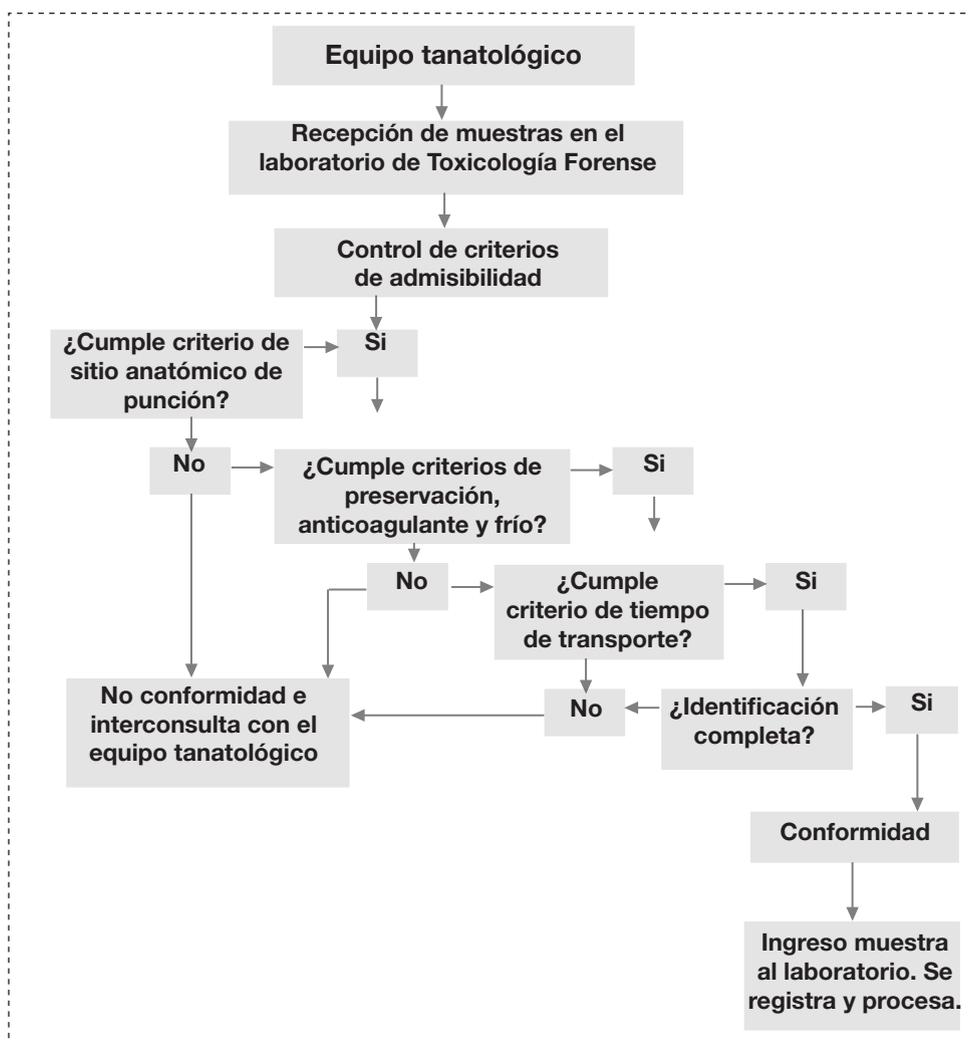


Figura 13. Flujograma correspondiente al proceso de ingreso de muestras hemáticas al laboratorio de Toxicología Forense.

<u>LABORATORIO DE TOXICOLOGIA FORENSE</u>	
<u>COMPROBANTE DE RECEPCIÓN DE MUESTRAS</u>	
<u>FECHA DERIVACIÓN:</u> .....	
<u>DERIVANTE:</u> .....	
<u>CODIGO DE IDENTIFICACIÓN:</u> .....	
<u>RECIBIDO CONFORME</u> SI <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>	
<u>OBSERVACIONES:</u> .....	
.....	
.....	
<u>RECIBIÓ (FIRMA Y SELLO):</u> .....	
<u>FECHA RECEPCIÓN / HORA:</u> .....	

Figura 14.  
Comprobante de  
recepción de  
muestras para  
toxicología forense.

### 3.5 ALGUNOS BIOMARCADORES EN EL CONSUMO CRÓNICO DE ETANOL

Es difícil encontrar parámetros individuales para el diagnóstico del alcoholismo crónico.

- **Enzima gamma-glutamil-transferasa o transpeptidasa (GGT)** en suero es el marcador más empleado en clínica, indica daño hepático, aumenta considerablemente en el alcoholismo crónico (69-90%), pero no es específica del etanol (55-100%). No está elevada en alcohólicos que aún no sufren alteraciones hepáticas. Vida media 14-26 días, tarda casi un mes en normalizarse tras la abstinencia.

- **Volumen corpuscular medio (MCV).** El alcohol es la causa más frecuente de macrocitosis aunque no es específico. El cambio se puede detectar a los 40 días de consumo excesivo.

- **enzima alcohol-deshidrogenasa (ADH),** aumenta en suero con el consumo y desaparecen al interrumpirlo, en menor tiempo del que requiere la GGT.

- **enzima transferrina deficiente en carbohidrato (CDT)** más sensible que la anterior. Biomarcador más específico del alcoholismo (80-95%) y sensible (31-91%). Aprobada por la FDA (Administración norteamericana de alimentos y medicamentos). Vida media 15 días, por lo cual se considera un buen marcador de recaída.

Se considera % CDT = 2,6 en alcohólicos y < 2,6% en sujetos consumidores normales.

Se ha propuesto la utilización de la combinación de los biomarcadores GGT y CDT para aumentar la sensibilidad y diferenciar entre bebedores sociales y alcohólicos.

## Toxicología del alcohol etílico

- apolipoproteínas E y J,  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida y aductos proteína-alcetaldehído.

**-AST y ALT:** son poco sensibles y no específicas, son buenos biomarcadores cuando incrementan en forma desigual  $AST/ALT > 2$  indica que el daño hepático es por causa alcohólica.

**- etil-glucurónico**, metabolito directo del etanol, muy estable, no volátil, soluble en agua. Puede ser detectado en los fluidos corporales después de la completa eliminación del alcohol del cuerpo y permanece en el pelo por tiempo indefinido.

Valores de cut-off en pelo (3 cm de longitud del segmento proximal):

**< 8 pg/mg individuo abstemio**

**8 - 25 pg/mg bebedor social**

**30 pg/g bebedor abusivo**

El EtG en sangre indica ingestión, pero su presencia significativa en pelo se puede tomar como marcador del consumo crónico.

-5-hidroxitriptofol sérico o urinario: metabolito de la serotonina que permanece incrementado 6-15 hs tras la eliminación del etanol. El cociente aumentado 5-hidroxitriptofol/5-hidroxitriptofol-3-ácido acético indica consumo en las últimas 24 hs aunque no se detecte etanol.



# Capítulo 4

## Técnicas de detección y cuantificación

### 4.1 MICRODIFUSIÓN: (MÉTODO DE FELDSTEIN Y KLENSHOJ - CÁPSULA DE CONWAY)

Este método se basa en un proceso de partición por el cual una sustancia volátil pasa a través de la atmósfera generada en un dispositivo cerrado a un solvente puro o a un reactivo, en el cual es considerablemente más soluble que en la muestra que lo contiene. Este proceso de partición puede ser favorecido y/o acelerado por el empleo de un reactivo liberador. En el caso que se emplee un solvente colector, el proceso finaliza cuando se alcanza el equilibrio. En el caso que se opte por el empleo de un reactivo colector, el proceso finaliza cuando se agota el reaccionante.

El dispositivo más comúnmente utilizado para este tipo de procedimientos es la cápsula de Conway (figura 15). La misma consta de dos compartimentos; uno interno, más pequeño y otro externo, más grande. Como norma general, en el compartimento interno se coloca el reactivo o el solvente puro sobre el cual se disolverá el tóxico volátil que se investiga. En el compartimento exterior se coloca la muestra sospechosa de contener el tóxico objeto de nuestro estudio.

Las **ventajas** comparativas que ofrece éste método son:

- Se necesita escasa cantidad de muestra para realizar el ensayo.
- No necesita procesos previos de purificación, directamente se trabaja con la muestra problema.
- Es un método muy sencillo.
- Es un método económico.
- Es un método rápido.

Como **desventaja**, cabe aclarar que se dosan alcoholes totales, pudiendo discriminar el valor correspondiente al metanol realizando un ensayo de microdifusión con la determinación correspondiente con ácido cromotrópico en medio ácido del metanol previamente oxidado.

Las sustancias susceptibles de ser analizadas mediante este procedimiento pueden ser liberadas de la muestra que las contiene por distintos principios físico-químicos:

- Aprovechando la mayor solubilidad del tóxico en el solvente o en el reactivo al que se lo enfrenta.
- Por reducción de la solubilidad del tóxico en la muestra que lo contiene.
- Por ruptura de la molécula que contiene al tóxico en la muestra que se analiza.

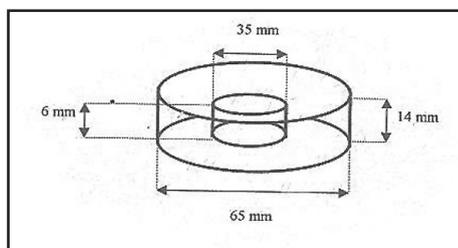


Figura 15: esquema de la cápsula de Conway

### PROCEDIMIENTO

En una cápsula de Conway colocar:

a. En el compartimiento interior: 0,5 ml de solución 0,4 N de  $K_2Cr_2O_7$  en  $H_2SO_4$  10 N.

b. Cubrir la placa con la tapa correspondiente, previa lubricación con grasa de siliconas, hasta las  $\frac{3}{4}$  partes de su superficie. Por el espacio libre se agrega en el compartimiento exterior: 0,5 - 1 ml de sangre más 1 ml de solución saturada de  $K_2CO_3$

c. Se tapa rápidamente la placa y se la agita suavemente sobre una superficie plana, con movimientos circulares, hasta homogeneizar los agregados.

d. Se deja reaccionar: 24 hs. a temperatura ambiente.

10 hs. a 25 °C.

6 hs. a 37 °C

2 hs. a 50 °C.

Una vez cumplido el período de difusión, se retira la tapa y se agrega 0,5 ml de KI 3N en el compartimiento central de la cápsula de Conway. Se mezcla bien con una varilla de vidrio.

Ensayar un testigo negativo (blanco) donde se reemplaza la muestra (sangre) por agua destilada.

Titular el yodo liberado por el dicromato en exceso mediante una solución de tiosulfato de sodio 0,1 N hasta que prácticamente desaparezca el color del yodo.

Agregar una gota de almidón soluble y continuar la titulación hasta que vire el color de AZUL-VIOLETA a VERDE o AZUL-VERDOSO (Figura 16).

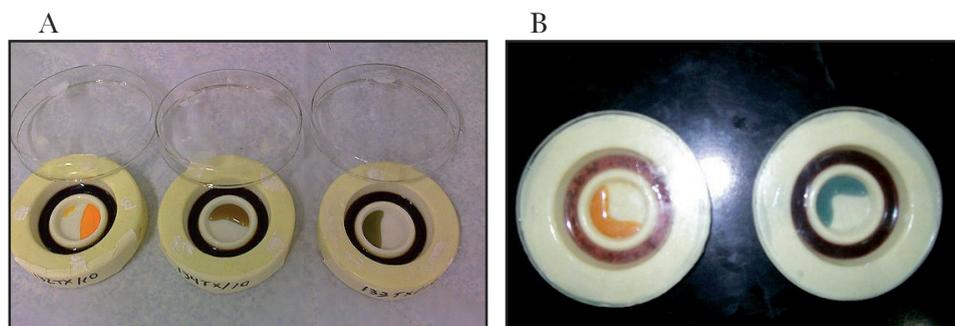


Figura 16: cambios de color en la titulación. A blanco: color naranja, muestras: color verde de la formación del  $Cr^{3+}$ . B Coloración azul del complejo almidón iodo que debe desaparecer en el punto final.

## Toxicología del alcohol etílico

### REACCIONES



### CÁLCULO

**N (VB-VM). 11,5 = g/L**

N: Normalidad del tiosulfato de sodio.

VB: mililitros de la solución de tiosulfato consumidos para titular el blanco.

VM: mililitros de la solución de tiosulfato consumidos para titular la muestra.

11,5: Factor de equivalencia (PM EtOH: 46/4; siendo 4 el número de electrones cedidos en la ecuación redox).

### 4.2 MÉTODO ENZIMÁTICO

Utiliza el mismo principio que el organismo para metabolizar el alcohol. La alcohol deshidrogenasa (ADH) cataliza la transferencia de los átomos de hidrógeno del sustrato (alcohol etílico) al  $\text{NAD}^+$ , transformándose éste en NADH, mientras que el alcohol se oxida a acetaldehído.



La transformación de  $\text{NAD}^+$  en NADH se refleja en la diferente intensidad de absorción de la luz UV ya que el  $\text{NAD}^+$  tiene su máximo de absorción en 260 nm y el NADH tiene su máxima absorción en 340 nm; o sea que la cantidad de alcohol etílico presente se evidencia por el incremento de la absorción de la radiación a 340 nm.

El resultado se calcula entrando con el valor de absorbancia a una gráfica de Absorbancia vs. Concentración, que se ha realizado con soluciones de alcohol etílico de concentración exactamente conocida.

El procedimiento se realiza tratando:

**a.** La muestra de sangre junto con el o los testigos y el blanco con una solución de ácido perclórico, todo ello colocado en sus respectivos tubos de centrífuga. La función del ácido perclórico es desproteinizar las muestras.

**b.** Se mezcla cuidadosamente y se centrifuga 5 minutos a 3000 r.p.m.

**c.** Una alícuota del sobrenadante (generalmente 0,1 ml) se trata con una solu-

ción buffer de pH 8.

- d. Se agrega la solución de NAD<sup>+</sup> 24mM.
- e. Se mezcla y se añade la solución de ADH.
- f. Se incuba 25 minutos a 37 °C.
- g. Se lee la absorbancia a 340 nm

La técnica antes descrita tiene la finalidad de exponer en forma general el método enzimático para la cuantificación del alcohol etílico en sangre. Según el equipo comercial utilizado, convendrá seguir las indicaciones operativas del fabricante.

Su principal ventaja radica en la alta especificidad que presenta para el alcohol etílico, ya que el alcohol metílico (principal interferente en este tipo de determinaciones) no presenta una gran absorción a 340 nm. Tampoco interfieren los productos biológicos provenientes del material en descomposición.

La sensibilidad de este método es comparable con la del método de microdifusión, aunque sin los inconvenientes de interferencia ya expuestos.

### 4.3 CG-FID: TÉCNICA HEADSPACE

#### PREPARACIÓN DE LA ESTÁNDARES Y MUESTRA

Estándares: preparar soluciones de 0,5; 2,0 y 6,0 g/l de alcohol etílico. Dispensarlas y procesarlas de la misma manera indicada para las muestras biológicas. Construir la curva de calibración que se utilizará para las determinaciones cuantitativas.

Muestras: en un vial de headspace colocar 1 ml sangre (humor vítreo u orina) + 0,5 ml solución estándar interno (butanol, terbutanol, etc.) + 0,5 ml K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> como agente liberador. Dejar 15 minutos a 80°C en el horno del equipo (figura 17 A y B)

De esta manera se produce el equilibrio alcohol en la muestra (V<sub>s</sub>), alcohol presente en el espacio de cabeza (V<sub>o</sub>).

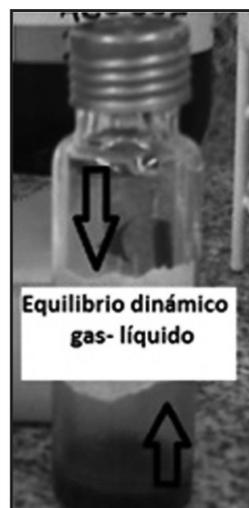
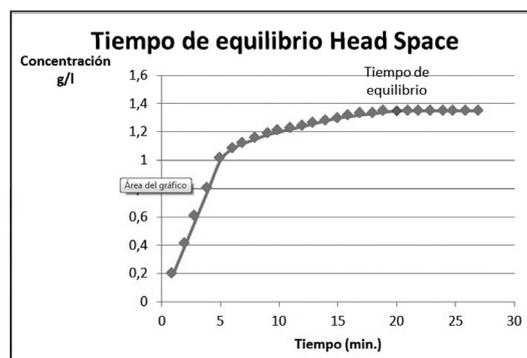


Figura 17 A. Equilibrio headspace.

## Toxicología del alcohol étlico



Figura 17 B. Viales de head-space para dosaje de etanol en muestras biológicas.

### CROMATOGRAFÍA GC-FID

Gas de arrastre: N<sub>2</sub> 14 psi (1,16 ml/min).

Inyector: 150 °C. Split: 5 ml/min.

Columna: Temperatura del horno 80°C .

Columna: wax 20M (polietilenglicol) 20 m- 0,18 ID.

Detector: FID hidrógeno a 45 ml/min. Aire a 450 ml/min. Temperatura 250°C.

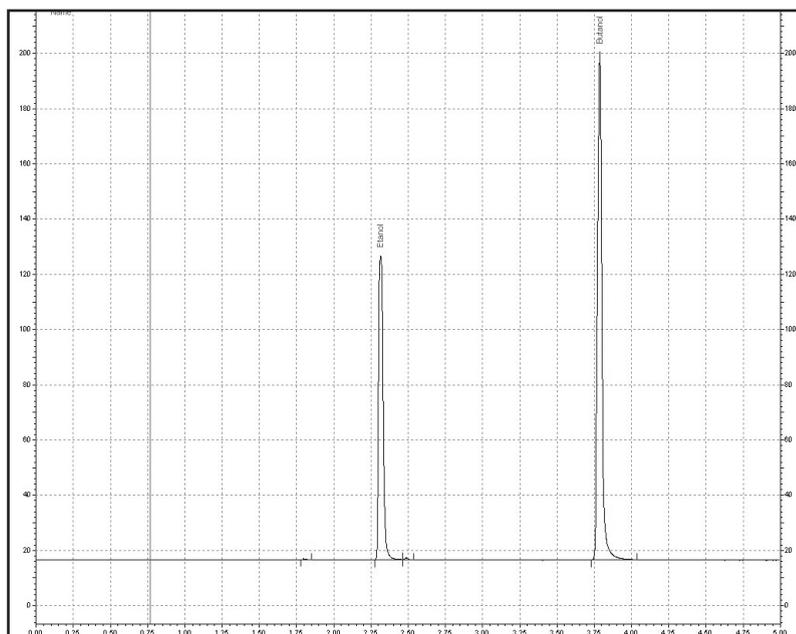
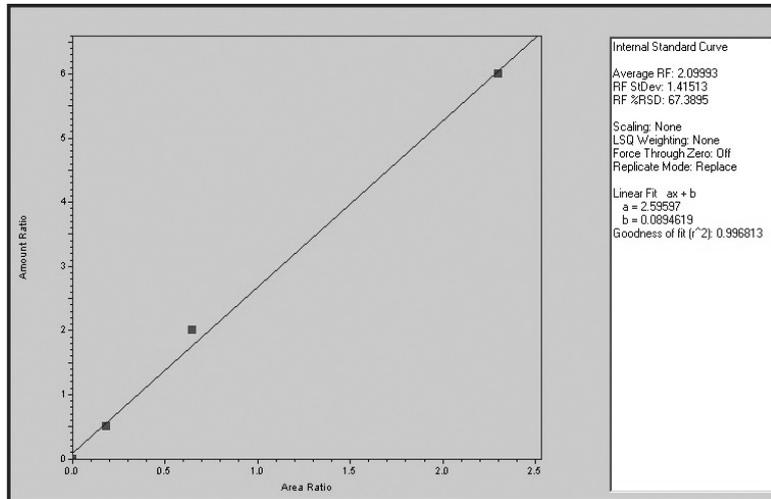


Figura 17 C. Cromatograma obtenido para dosaje de alcohol étlico, donde se utilizó butanol como estándar interno.

El orden de elución generalmente es: metanol, acetaldehído, etanol, isopropanol, acetona, N-propanol.

En la práctica se obtienen cromatogramas y curvas de calibración como los que se ilustran en las figuras 17 C y 17 D, respectivamente.



*Figura 17 D.  
Curva de calibración obtenida por cromatografía gaseosa, detector de ionización de llama (GC-FID).*

## Capítulo 5

### Interpretación de resultados: Resolución de Casos - Alcances

#### 5.1 CÁLCULO DE ALCOHOLEMIA RETROSPECTIVA

$$AR = A + (\beta \times t)$$

A = Alcoholemia correspondiente al momento de la extracción de sangre (ejemplo: 0,45 g/l).

$\beta$  = Coeficiente de etil oxidación (0,15 g/l.h).

t = Tiempo en horas transcurrido a partir del hecho que se investiga (ejemplo: 2 horas).

$$AR = 0,45 \text{ g/l} + (0,15 \times 2) = 0,75 \text{ g/l.}$$

#### 5.2 CÁLCULO DEL TIEMPO NECESARIO PARA ELIMINAR EL ALCOHOL INGERIDO

$$\text{TIEMPO (Horas)} = \frac{\text{Alcoholemia}}{\beta}$$

$\beta$  = Coeficiente de etil oxidación (promedio: 0,15 g/l.h)

Ejemplo: tiempo para eliminar 1 g/l

$$\text{TIEMPO} = \frac{1 \text{ g/l}}{0,15} = 6,67 \text{ horas}$$

#### 5.3 CÁLCULO DEL CONTENIDO TOTAL DE ALCOHOL EN EL ORGANISMO

$$C = P \times VD \times A$$

P = Peso de la persona (Kg).

VD = Volumen Aparente de Distribución 0,7 (hombres). 0,6 (mujeres).

A = Alcoholemia (g/l).

#### 5.4 CÁLCULO DE SU EQUIVALENTE EN BEBIDA ALCOHÓLICA

Ej: Peso: 75 Kg. A: 1,5 g/l. Sexo: Masculino. Tiempo transcurrido: 4 horas.

$$C = P \times 0,7 \times A \text{ Hecho}$$

• Cálculo de la alcoholemia retrospectiva (A en el momento del hecho)

$$A_{\text{Hecho}} = A + (\beta \times t)$$

$$A_{\text{Hecho}} = 1,5 \text{ g/l} + (0,15 \text{ g/l.h} \times 4 \text{ h}) = 2,10 \text{ g/l}$$

• Cálculo de la concentración:

$C = 75 \text{ Kg} \times 0,7 \times 2,10 \text{ g/l} = 110,25 \text{ g etanol}$

• Cálculo del volumen de alcohol:

Densidad del etanol = 0,798 g/ml

$110,25 \text{ g} / 0,798 \text{ g/ml}$ .

Volumen (ml) de etanol = 138,16 ml

• Cálculo del equivalente en bebida

VINO (12 %): 12 ml de etanol-----100 ml de bebida

$138,16 \text{ ml etanol}-----X = 1151,32 \text{ ml bebida (1,5 botella de } 3/4\text{)}$ .

CERVEZA (5 %): 5 ml de etanol-----100 ml de bebida

$138,16 \text{ ml de etanol}---X = 2763,20 \text{ ml bebida (2,83 botellas 975 cc)}$ .

WHISKY (40 %): 40 ml de etanol-----100 ml de bebida

$138,16 \text{ ml etanol}-----X = 345,40 \text{ ml de bebida (1/3 botella de litro)}$ .

## 5.5 ANÁLISIS DE CASOS

Se necesita saber si la ingesta de alcohol pudo haber actuado como factor coadyuvante o predisponente para la ocurrencia de los casos que se detallan a continuación. Discuta cuál sería su propuesta analítica para cada caso. Justifique la misma. Las consideraciones realizadas para cada caso poseen una finalidad orientativa y no agotan la discusión.

---

### CASO N° 1: ACCIDENTE DE TRÁNSITO

Se recibe en el laboratorio un individuo de sexo masculino, de 45 años de edad, 85 Kg de peso corporal. Horario de ocurrido el hecho bajo investigación: 15:00 hs. Horario de llegada al laboratorio para toma de muestra: 19 hs. (Individuo vivo).

Considerar

• Pasaron cuatro (4) horas desde que ocurrió el hecho bajo investigación, razón por la cual no hay necesidad de tomar dos muestras de sangre con una hora de diferencia entre ellas, ya que se habría alcanzado y superado el máximo de concentración en sangre (etapa post absorptiva).

• Tomar una muestra de sangre + una muestra de orina como control (Resultados sangre: 1,00 g/l y orina: 1,80 g/l) Al realizar el cociente entre la concentración de alcohol en orina / sangre se confirma que la absorción ha sido completa.

• Se hace indispensable calcular la alcoholemia retrospectiva al momento del hecho bajo investigación.

• Resultaría muy útil, para una mayor ilustración de la autoridad judicial, informar el resultado de la alcoholemia retrospectiva como su equivalente en bebida alcohólica.

## Toxicología del alcohol etílico

### **CASO N° 2: ACCIDENTE DE TRANSITO**

Se recibe en el laboratorio un individuo de sexo femenino, de 28 años de edad, de 70 Kg de peso corporal. Horario de ocurrido el hecho bajo investigación: 17 hs. Horario de llegada al laboratorio para la toma de muestra: 18 hs. (Individuo vivo).

Considerar

- Se torna indispensable tomar dos muestras hemáticas con una hora de diferencia entre ellas, en virtud de la proximidad entre el horario de ocurrido el hecho bajo investigación y el horario en que llega al laboratorio para obtener las muestras a analizar (una hora de diferencia). No tenemos certeza de si se ha alcanzado y superado el máximo de concentración en sangre.

- Primera muestra de sangre: 0,45 g/l. Se agrega una muestra de orina como control: 0,21 g/l.

- Segunda muestra de sangre: 0,62 g/l. Se agrega una segunda muestra de orina como control: 0,85 g/l.

El análisis de los valores obtenidos indica absorción incompleta de alcohol al momento de ocurrir el hecho bajo investigación. Todavía se encontraba en etapa absorptiva al momento de ocurrir el mismo. No se puede tomar en consideración la segunda muestra de sangre para el cálculo de ningún valor predecible. Se debe informar el valor de concentración correspondiente a la primera muestra de sangre obtenida, con la salvedad que nada puede decirse con respecto al valor de alcohol en sangre al momento de ocurrido el hecho. Sólo podrá inferirse que el mismo era menor a 0,45 g/l (el cual se encuentra dentro del límite legal para conductores de automóviles: 0,50 g/l).

### **CASO N° 3: ACCIDENTE DE TRÁNSITO**

Se recibe en el laboratorio un individuo de sexo masculino, 50 años de edad, 90 Kg de peso corporal. Horario de ocurrido el hecho bajo investigación: 02:00 hs. Horario de llegada al laboratorio para la toma de muestra: 15:00 hs (Individuo vivo).

Considerar

- Transcurrieron trece (13) horas desde la ocurrencia del hecho bajo investigación hasta el momento en que es traído al laboratorio para la toma de muestra.

- Se toma una única muestra de sangre en virtud de las horas transcurridas. No es necesario tomar una segunda muestra.

- Se toma una muestra de orina como control, pensando que por las horas transcurridas probablemente el análisis de la muestra de sangre arroje resultado negativo.

- Resultados: sangre 0,00 g/l y orina 1,85 g/l.

En este caso sólo puede afirmarse que existió consumo de alcohol. Nada puede decirse del valor de concentración en sangre que hubiera podido tener el alcohol al momento de ocurrido el hecho bajo investigación.

### **CASO N° 4: ACCIDENTE DE TRÁNSITO**

Se recibe en el laboratorio las muestras pertenecientes a un individuo de sexo femenino, 36 años de edad, 65 Kg de peso corporal. Se constata un importante

traumatismo de tórax y abdomen. Individuo fallecido en el acto.

Considerar

- Se analiza la muestra de sangre remitida al laboratorio y se obtiene un valor igual a 5,38 g/l de alcohol.

Un valor tan elevado en sangre, junto con la presencia de un importante traumatismo de tórax / abdomen, necesariamente nos debe hacer pensar en que la muestra de sangre obtenida puede estar reflejando una mezcla de las concentraciones de alcohol sanguínea + pulmonar (alveolar) + abdominal (estómago). Máxime si la muestra de sangre remitida para su análisis fuera obtenida de cavidades cardíacas o de la vena subclavia. Por tal motivo, resulta indispensable en estos casos analizar muestras complementarias como el humor vítreo y la orina. Resultados: humor vítreo 0,65 g/l; orina 0,99 g/l.

Con estos valores, nada puede decirse del verdadero valor de alcohol en sangre, sólo que existió consumo.

### **CASO N° 5: POLITRAUMATIZADO SEVERO**

Se reciben en el laboratorio muestras de un individuo de sexo masculino, de 45 años de edad, 95 Kg de peso corporal, en el cual se produce la sección total de los miembros inferiores (se sospecha suicidio arrojándose a las vías del tren). No se pueden obtener muestras de rutina: sangre, orina, humor vítreo (por estallido de ambos globos oculares). El individuo fallece poco tiempo después de ocurrido el hecho, luego de recibir asistencia médica de emergencia.

¿Cuál sería la muestra de preferencia que intentaría obtener para casos como el descrito?

Hematomas subdurales: son colecciones hemáticas que se forman en el mismo momento de ocurrido el hecho bajo investigación o en un período muy cercano al mismo. Por tratarse de sangre que ha salido del torrente circulatorio; el alcohol que pudiera estar presente en esta muestra no sigue sufriendo un proceso de metabolización hepática, razón por la cual su concentración alcohólica reflejará exactamente la alcoholemia de ese individuo al momento de ocurrir el hecho bajo investigación.

### **CASO N° 6: AHORCADO**

Se reciben en el laboratorio muestras pertenecientes a un individuo de sexo masculino, 68 años de edad, 80 Kg de peso.

Resultados:

- Sangre: 0,1 g/l.
- Humor vítreo: 0,00 g/l.
- Orina: 0,00 g/l.
- Contenido gástrico: 3,00 g/l.

Con estos valores solo se puede afirmar que hubo consumo de bebidas alcohólicas, pero el fallecimiento ocurrió antes que pudiera producirse el pasaje al

## Toxicología del alcohol etílico

torrente circulatorio. En este caso el alcohol no puede tomarse como un factor coadyuvante o predisponente que pudiera haber influido en la causa de muerte.

### **CASO N° 7: AHOGADO**

Se reciben en el laboratorio muestras de un cuerpo recuperado de las aguas del río Paraná, luego de 24 horas de su desaparición. Sexo femenino, 30 años de edad, 65 Kg de peso corporal.

Resultados:

- Sangre: 2,55 g/l.
- Orina: 1,78 g/l.
- Humor vítreo: 0,10 g/l.

¿Cuál será el resultado prevalente para este caso? Justifique.

Se considera, fundamentalmente, el resultado obtenido en humor vítreo por ser la muestra menos susceptible de sufrir modificaciones por la generación de alcohol endógeno por proliferación microbiana, por ser el globo ocular un compartimiento relativamente hermético que ofrece mayor resistencia a este tipo de cambios.

En este caso se puede afirmar que no existió consumo de etanol.

### **CASO N° 8: HERIDA DE ARMA DE FUEGO**

Individuo de sexo masculino, 25 años de edad, 87 Kg de peso corporal. Recibe asistencia médica de urgencia que incluye cirugía y recuperación en UTI. Se convoca al equipo forense luego de doce (12) horas de ocurrido el hecho bajo investigación, para tomar las muestras de rigor según el criterio del perito interviniente, con la finalidad de establecer el posible grado de intoxicación alcohólica al momento de ocurrido el hecho bajo investigación.

Horario de ocurrido el hecho bajo investigación: 02:00 hs.

Convocatoria al equipo forense: 14:00 hs.

Considerar

- No tiene sentido tomar muestra de sangre en virtud del tiempo transcurrido. A ello debe sumarse la total modificación de las condiciones originales de la muestra hemática como consecuencia de la manipulación médico-quirúrgica realizada (que pudo haber incluido pasaje de fluidos, transfusión de sangre, entre las más comunes).

- Se toma únicamente una muestra de orina para tratar de establecer si existió consumo de alcohol.

- Resultados: sangre 0,00 g/l; orina 0,40 g/l. Con estos valores sólo puede decirse que existió consumo de etanol. Nada más.



# Capítulo 6

## Control estadístico de resultados: una breve aproximación

El objetivo fundamental que implica la implementación de un sistema de control estadístico para los resultados obtenidos, consiste en verificar que el sistema de medición utilizado para realizar el dosaje de etanol en muestras biológicas y no biológicas se mantenga bajo control en sucesivas determinaciones.

El sistema de verificación más práctico y conveniente para realizar un control como el propuesto, consiste en realizar la comparación de la variabilidad de un grupo de resultados (análisis de un testigo de etanol de concentración perfectamente conocida, por duplicado), *variabilidad intra-determinación*, con respecto a la variabilidad entre grupos de resultados (análisis de un testigo de etanol de concentración conocida durante varios días), *variabilidad entre determinaciones*.

Los valores obtenidos para las determinaciones anteriores son utilizados para la construcción de *gráficos de control* de medias ( $\bar{X}$ ), el cual brindará información detallada respecto de la exactitud asociada al sistema de medición utilizado, mientras que a través de la construcción de *gráficos de control* de rangos ( $R$ ) se obtendrá la información correspondiente a la precisión del sistema de medición. La evaluación de los gráficos que se construyan a partir de los datos obtenidos, nos permitirán evaluar si el sistema de medición se encuentra bajo control o si, por el contrario, requiere la realización de ajustes analíticos y/o instrumentales.

A continuación se describe una guía rápida para la implementación de un sistema de control como el propuesto, que se encuentra al alcance de cualquier laboratorio que realice este tipo de determinaciones.

### DESARROLLO

- Con cada serie de determinaciones se corren dos testigos de concentración perfectamente conocida de etanol (2 g/l). Una al inicio de la corrida y otra al final de la misma. Los valores así obtenidos constituyen un grupo individual de determinaciones.

- Al finalizar el mes (o semanal / quincenalmente, según el criterio de cada laboratorio) se deberán tener tantos pares de valores como series de determinaciones se hayan realizado.

- Los valores obtenidos se cargan en el programa estadístico (cualquiera de los disponibles en el mercado resultan adecuados para tal fin), procediéndose al cálculo de medias, rangos y elaboración de los gráficos X-R correspondientes.

- Los profesionales bioquímicos que integran el staff del Laboratorio de Toxicología, tendrán la responsabilidad de realizar el análisis e interpretación de los

resultados obtenidos y la implementación de medidas preventivas / correctivas que se consideren necesarias para el ajuste del sistema de medición.

- Para este tipo de determinaciones, resulta adecuado considerar como límites aceptables entre los cuales pueden oscilar los valores analíticos obtenidos  $\pm 3$  desviaciones estándar. En un sistema que se encuentra “bajo control”, todos los valores obtenidos deberían encontrarse dentro de los límites establecidos y distribuidos de manera, más o menos simétrica, alrededor de la media. La presencia de valores por fuera de los límites o bien, la presencia de tres (o más) valores que caigan de un mismo lado de la media (tendencia); implicarían desviaciones del sistema de medición que el analista debe evaluar y atender con particular atención (Figura 18 A y B).

- La información obtenida es conveniente asentarla en un informe que constituya el control mensual (semanal y/o quincenal) del sistema de medición, donde consten la medidas preventivas / correctivas implementadas ante desviaciones o tendencias detectadas en el sistema de medición, si fuera este el caso.

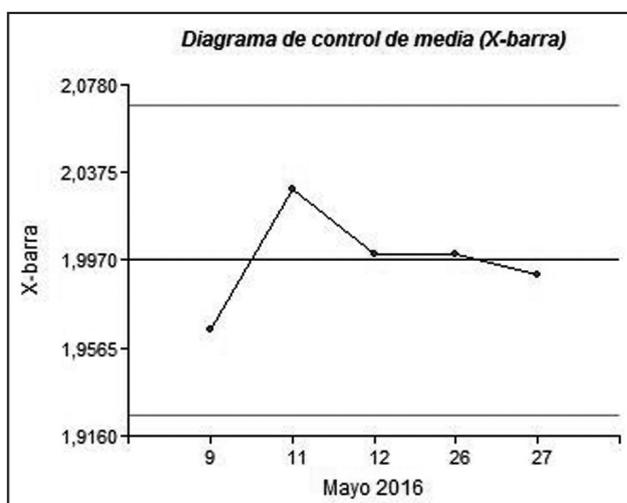


Figura 18 A. Gráfico utilizado para controlar la exactitud de las determinaciones.

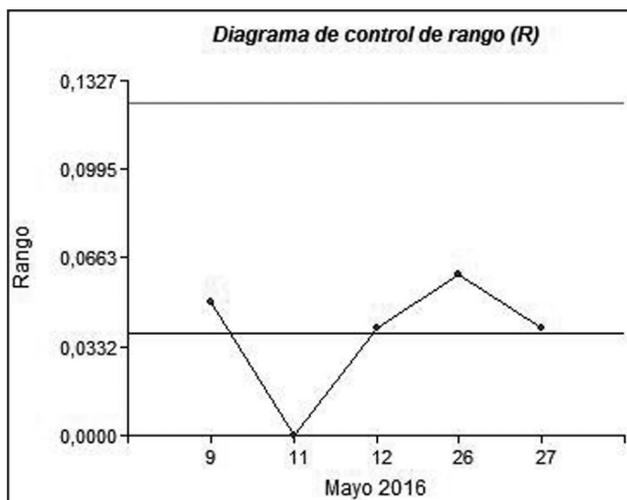


Figura 18 B. Gráfico utilizado para controlar la precisión de las determinaciones.

# Bibliografía

Alvarado Guevara A., Raudales García I., Vega Ramírez J. (2008). Determinación de alcohol post mortem: Aspectos a considerar para una mejor interpretación. Med. Leg. Costa Rica 25 N. 2. Heredia.

Brown G., Neylan D., Reynolds W., Smalldon K. (1973). The stability of ethanol in store-blood. Part. I. Important variables and interpretation of results. Analytica Chimica Acta. 66: 271-283.

Burillo-Putze G., Hernández Sánchez M.J., Climent García B., Pinillos Echeverría M.A. (2012). Nuevas formas de consumo de alcohol. An Pediatr. 77:419-20.

Covey, S. (2012). "Los 7 hábitos de la gente altamente efectiva" Editorial Paidós SAICF. Buenos Aires. 9-14.

Ferrari L. (2008). Análisis toxicológico de etanol y su interpretación forense. Ciencia Forense Latinoamericana 2 (1-2) 20-35.

Gisbert Calabuig J.; Villanueva Cañadas E. (2004). Medicina Legal y Toxicología Masson S. A. Barcelona. Cap. 63; 878 - 895.

Ióvine E., Selva A. (1993). El laboratorio en la clínica. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. 1359-1367.

Jickells S., Negrusz A. (2008). Clarke's Analytical Forensic Toxicology. Pharmaceutical Press. London. 306-319.

Lencioni, P. (2003). "Las cinco disfunciones de un equipo" Ediciones Urano, S. A. Barcelona. 1-98.

Repetto M. (1995). Toxicología Avanzada. Ediciones Díaz de Santos. Madrid. 425-473.

Repetto M, Guija Villa J., Repetto G. (2013). Toxicología del Alcohol Etílico. En: Ampliación de Postgrado en Toxicología -Repetto (ed.). CD-ROM. Ilustre Colegio Oficial de Químicos. Sevilla, 2013

Rubio Valladolid G.; Santo-Domingo Carrasco J. (2000). Guía Práctica de Intervención en el alcoholismo. Agencia Antidroga. Consejería de Sanidad. Comunidad de Madrid. Ilustre Colegio Oficial de Médicos de Madrid. Madrid.

OMS: Sinopsis de políticas. 2006. Violencia interpersonal y alcohol.

Senge, P.; Roberts, C.; Ross, R.; Smith, B.; Kleiner, A. (2006). "La quinta disciplina en la práctica: estrategias y herramientas para construir la organización abierta al aprendizaje". 1ra Ed. Granica. Buenos Aires. 2-3.

WHO. 2014. Country profiles. P138.

Algunos datos sobre el consumo de alcohol en Argentina. 2011. Sistema de Vigilancia Epidemiológica en Salud Mental y Adicciones. 4- Ministerio de Salud. Presidencia de la Nación.



# Índice

<b>Prólogo</b>	5
<b>Capítulo 1</b>	7
Introducción	7
Patrones de consumo y riqueza alcohólica de las bebidas	10
<b>Capítulo 2</b>	13
Toxicocinética y toxicodinámica del etanol	13
Alcohol postmortem	19
<b>Capítulo 3</b>	21
Obtención de muestras biológicas	21
3.1 Clasificación de muestras biológicas para estudios de etanol	21
3.2 Contenido acuoso de muestras hemáticas	26
3.3 Importancia, alcances e interpretación de la concentración de etanol en muestras de orina y humor vítreo	27
3.4 Atributos de valor de muestras hemáticas	28
3.4.1 Flujograma de toma de muestras	32
3.4.2 Flujograma de ingreso	34
3.5 Algunos biomarcadores en el consumo crónico del etanol	36
<b>Capítulo 4</b>	39
Técnicas de detección y cuantificación	39
4.1 microdifusión	39
4.2 método enzimático	41
4.3 GC-FID	42
<b>Capítulo 5</b>	45
Cálculos. Interpretación de resultados.	45
5.1 Cálculo de alcoholemia retrospectiva	45
5.2 Cálculo del tiempo necesario para eliminar el alcohol ingerido	45
5.3 Cálculo del contenido total de alcohol en el organismo	45

5.4 Cálculo de su equivalente en bebida alcohólica	45
5.5 Analisis de casos	46
<b>Capítulo 6</b>	51
Control estadístico de resultados: una breve aproximación	51
<b>Bibliografía</b>	53

