

Análisis toxicológico de etanol y su interpretación forense.

Cálculos retrospectivos, pérdida o generación en tejidos humanos e indicadores biológicos de ingesta. Breve revisión.

Luis Alberto Ferrari

- Cátedra de Toxicología y Química Forense. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad de Morón - Argentina.
- Perito Químico de la Asesoría Pericial de la Suprema Corte de Justicia de Buenos Aires..
- Representante Regional de TIAFT en Argentina

El presente artículo es una revisión del autor del trabajo publicado en la revista
Ciencia Forense Latinoamericana 2 (1-2) 20-35 (2008)

Resumen

La determinación de alcohol etílico en humores o tejidos humanos es una de las prácticas analíticas más frecuente en un laboratorio forense.

Su determinación posee consecuencias legales importantísimas, tanto en individuos vivos (conductores de vehículos bajos los efectos del alcohol, accidentes laborales y lesiones graves) como en casos criminales: muertes violentas, suicidios, violaciones o abusos deshonestos.

En la presente revisión se abordan diversos aspectos relacionados a la toma de las muestras biológicas para análisis, su correcta preservación y los métodos analíticos óptimos, consensuados por la comunidad científica internacional, tal como la cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID). Asimismo, los factores internos y exteriores a las muestras que pueden generar resultados conflictivos a la hora de interpretar los guarismos, tales como pérdidas y generación de alcohol en el organismo humano como también en los recipientes donde son resguardadas las muestras. Se acepta hoy que la presencia de bacterias, ciertos hongos y levaduras pueden generar etanol en determinadas condiciones. Por otro lado, la existencia de cámara de aire relevante o deficiente cierre de los recipientes determinan pérdidas considerables de este compuesto. Se señalan modelos recientes de predicción de pérdidas.

Se describen, también, los principios aplicados en la determinación de la alcoholemia retrospectiva o retrógrada con algunos ejemplos y la aplicación práctica de los coeficientes β y r de Widmark. Por último se discuten la aplicación de parámetros o indicadores de ingesta aguda y/o crónica de alcohol tal como el etilglucurónido (EtG) o Etilsulfato (EtS) y otros más que han sido recientemente estudiados.

Palabras claves: etanol, análisis forense, cálculo retrospectivo, pérdida-generación, indicadores de ingesta.

1. Introducción

Es bien conocido que el etanol puede producir en el hombre formas clínicas del estado de inconciencia o disminución de reflejos, consignándose datos estadísticos que dan cuenta de su relevancia criminógena (1-3). La casuística internacional avala la importante incidencia del alcohol en accidentes de tránsito o en lugares de trabajo. Así Jönsson et al (4) informaron que en Suecia el etanol constituía la primer sustancia encontrada en autopsias, quintuplicando, en el mejor de los casos, el resto de compuestos listados por los investigadores. En los Estados Unidos de América la mitad de los accidentes automovilísticos en la década de los noventa, involucraba personas que conducían bajo los efectos del alcohol (3). En Argentina, Goldaracena et al. ofrecieron una contribución en la que demostraron que el 16% de 926 conductores de distintos tipos de vehículos y sobre una ruta nacional de tránsito fluido, poseían etanol en el aire espirado en tenores de 0,1-0,5 g/L (14,7% de conductores) y mayores a 0,5 g/L (1,6% de conductores) (5).

Cabe señalar que los efectos tóxicos no se limitan a consideraciones meramente forenses. A los ya conocidos efectos clínicos adversos, agudos y crónicos, cabe consignar estudios recientes en los que se sugiere que la bioactivación del etanol, promoviendo la formación de especies químicas reactivas tales como el acetaldehído y los radicales 1 hidroxietilo, podrían inducir al cáncer o bien una acción relevante en la toxicidad reproductiva en el hombre (6,7).

En cuanto a los productos menores de biotransformación, estos se encuentran bajo investigación en la actualidad siendo promisorios, especialmente el etilgucuronido, etilsulfato, metabolitos de serotonina y esteroides de cadena corta formados por reacción entre el alcohol y los ácidos grasos respectivos (8-10).

Las matrices biológicas usadas para el dosaje de etanol constituyen un tema relevante, tanto en las prácticas efectuadas a individuos vivos como también en los casos post-mortem. En estos últimos, la mayor diversidad de matrices analizadas ayuda a una mejor interpretación respecto de la verdadera impregnación de alcohol en un individuo previo al óbito. Sin embargo, en la práctica diaria debe elegirse la matriz más apropiada extraída de sitios o zonas preestablecidas, como veremos luego, para el caso de sangre o algunos órganos. La preservación de las mismas y su correcto envasado y envío al laboratorio facilitarán la estabilidad de la muestra evitando ulteriores errores en la interpretación de los guarismos obtenidos de la metodología analítica (11).

Los métodos analíticos utilizados en nuestro hemisferio dependen del grado de complejidad del laboratorio que realizan la práctica, prevaleciendo los métodos enzimáticos, de microdifusión y los de cromatografía gaseosa con detector de ionización de llama (GC-FID) previo aislamiento por el método del espacio cabeza (head space), este último el más recomendado (12-14).

Asimismo, han sido publicadas investigaciones que dan cuenta de la posible interacción entre el etanol y monóxido de carbono en incendios. Algunos autores han sostenido que no existe correlación entre ambos analitos en estos episodios, aunque otros le han atribuido al etanol un efecto protector contra los efectos tóxicos del monóxido de carbono (15,16)

Finalmente, el cálculo retrospectivo de alcohol en el hombre reviste una importancia forense capital a la hora de evaluar grado de impregnación de alcohol "n" minutos u horas antes de la toma de muestra. Los cálculos y limitaciones de la ecuación de Widmark son analizados con cierta profundidad y en el contexto de un caso que se investiga.

A continuación desarrollaremos con un poco más de extensión los tópicos consignados.

2. Matrices biológicas utilizadas para el estudio de etanol en el hombre. Toma de muestra: sitios de extracción y preservación del espécimen. Usos.

En los últimos decenios el alcohol ha sido investigado en una gran variedad de matrices biológicas, tanto convencionales como no convencionales. Hemos podido confirmar en la literatura internacional su análisis en sangre, orina, contenido estomacal y pared estomacal, humor vítreo, fluido cerebroespinal, saliva, aliento, sudor, músculo, hígado (lóbulo izquierdo y derecho), cerebro, pulmón, corazón, riñón (izquierdo y derecho) bilis, y testículos. Sin embargo, la interpretación de los guarismos hallados permanece aún bajo debate en la mayoría de las muestras mencionadas, cuando debe determinarse si un individuo estuvo bajo los efectos del alcohol previo al óbito.

La toma de muestra es, en nuestra opinión, el factor más importante que se debe considerar, habiéndose comprobado en nuestro medio ser fuente de la mayor parte de los errores que se cometen a la hora de interpretar el dato analítico.

Muchos toxicólogos forenses continúan repitiendo con insistencia el adagio: “el resultado de un análisis solo puede ser tan bueno como el tipo y estado de la muestra recibida” (17).

Probablemente la alcoholemia es la determinación mejor conocida y muchos autores sugieren su determinación inicial. No obstante, en revisiones recientes, algunos expertos opinan que la investigación en otras matrices puede conducir a una mejor interpretación sobre el real grado de impregnación en un individuo, pudiéndose detectar situaciones (especialmente en casos postmortales) que llevarían a una errónea conclusión si solo se dispone de datos de una sola matriz.

a.- Sangre:

Generalmente, se remite al laboratorio sangre entera. Esta debería extraerse de venas externas al tracto gastrointestinal, como la vena femoral. Algunos autores han preconizado la extracción intracardiaca (18). Sin embargo varios expertos han advertido que el etanol puede difundir desde el estómago a la sangre cardiaca por lo que concluyen que la sangre tomada de la cavidad cardiaca o cavidad pleural no resulta adecuada para la estimación de la concentración de alcohol (19,20).

La mayoría de los autores recomiendan no extraer sangre de venas próximas al tracto gastrointestinal en personas fallecidas, debido a la posible difusión del alcohol desde el estomago al medio circundante o bien la migración de bacterias desde el intestino al mesenterio.

Takayasu et al (21) estudiaron la difusión postmortem del alcohol desde el estómago hacia otros tejidos abdominales a dos temperaturas (5°C y 30°C), utilizando ratas a las que se instiló por vía peroral etanol marcado con deuterio (etanol-d6). Los investigadores encontraron que el etanol-d6 difundía gradualmente hacia los órganos vecinos al estomago, especialmente el lóbulo izquierdo hepático, riñón izquierdo y vesícula biliar, alcanzando una concentración de 1-2 g/L aproximadamente a las dos temperaturas ensayadas. En el experimento, notaron también que luego de 24 hs a 30°C existía generación de etanol en los órganos ensayados excepto en la vesícula biliar y con valores de 0.33-0.85 g/L.

La cantidad de sangre necesaria para el análisis cuantitativo dependerá del método elegido. Dado el uso extendido de la cromatografía gaseosa con detector de ionización de llama con el procedimiento denominado espacio-cabeza (head space), puede disponerse de 1 ml de sangre para el estudio por esta metodología. Sin embargo es deseable que sean tomados unos cuantos mililitros más para ulteriores repeticiones y resguardo para posible repericias como contraprueba solicitadas por la judicatura.

La muestra hemática debe depositarse en un frasco rigurosamente limpio y herméticamente cerrado, evitando la existencia de cámara de aire. El preservante de elección es el fluoruro de

sodio (NaF) que se agregará a la muestra en una concentración mínima 1% que puede llegar al 2% (p/v).

Otros preservantes fueron ensayados (vg: azida sódica) sin mayores ventajas que el NaF.

Hemos podido verificar que ante el faltante de recipientes adquiridos para este fin, se han apelado a recipientes de medicamentos ya utilizados y agotados. Esto puede ocasionar dificultades en la etapa del análisis instrumental, ya que el lavado casero de los frascos no remueve totalmente las impurezas. Por tanto debe evitarse el uso de los mismos. En casos forzados deben tratarse dichos recipientes con mezcla sulfocrómica y posterior lavado con agua destilada.

No debe utilizarse solución alcohólica en ninguna parte del procedimiento de extracción. En caso de extracción en individuos vivos, utilizar solución acuosa iodada.

Las muestras deben resguardarse en frío, en lo posible a temperaturas de 2-4°C o menos.

b. Orina

La muestra para casos postmortem se toma punzando la vejiga con una jeringa estéril. En forma similar a la recolección sanguínea, es colocada en recipientes de capacidad adecuada según el volumen del fluido existente. En caso de encontrarse la vejiga vacía intentar obtener 10 ml de orina por punción de la pelvis renal.

Enviar como mínimo 10 ml, pero es conveniente remitir toda la existente en vejiga en casos post-mortem. Rotular y cerrar perfectamente. Colocar día, mes y hora de emisión ó recolección y fecha y hora del presunto ilícito por el que se pide la determinación. (v. g. hora de accidente vehicular). No agregar ninguna sustancia como conservante. Refrigerar a 4 °C.

Inmediatamente después de la recolección en individuos vivos, debe medirse la temperatura (que debe estar entre 32 y 38°C dentro de los cuatro minutos de su recolección) y el pH. Si se sospecha cualquier adulteración se debe notificar al laboratorio. La orina debe chequearse para constatar precipitados, color, si tiene espuma, etc. Se recomienda también la determinación de creatinina (180±80 mg/dl: normal; 10-30mg/dl: probablemente esta diluida; 10mg/dl: diluida) y la determinación de la densidad relativa (1.002-1.020: normal).

c. Humor vítreo:

La muestra se toma resecaando completamente el globo ocular o bien a través de una punción del mismo con aguja y jeringa, aunque cabe acotar que muchas veces se remite humor acuoso y no humor vítreo, ya que la densidad de este último hace dificultosa la extracción. Colocar en viales de capacidad adecuada, sellar, rotular y colocarlo en refrigeración hasta su ingreso al laboratorio.

Esta matriz es apropiada en casos postmortem en los que diversos tejidos entran en etapa de putrefacción relevante. Además, resulta aconsejable en casos de muertes traumáticas (vg: accidentes de tránsito) en los que existe difusión abdominal de sangre procedente de otros compartimentos u órganos o bien cuando la muestra hemática no se encuentra disponible. Por otro lado la correlación con los guarismos en sangre ha sido ampliamente estudiada, destacándose una alta correlación ($r > 0.95$) entre la concentración de alcohol etílico en sangre y en humor vítreo (24). El egregio profesor sueco AW Jones en su reciente revisión refiere la opinión de ciertos autores que recomiendan el factor de 0.81 para computar la concentración de alcohol en sangre total indirectamente, desde la determinación analítica de etanol en humor vítreo.

Por último ha sido también aconsejado su uso como matriz preferencial en casos de cuerpos embalsamados. (24-26)

d. Pelo

Forma de recolección: Cortar en sector occipital (coronilla), bien al ras del cuero cabelludo, en lo posible 1 ó 2 grs. (en la práctica un puñado o mechón es suficiente).-Tomar el extremo cercano al cuero cabelludo, colocarlo sobre el papel ó cartón y abrochar con aplique. Colocar otro papel o cartón encima del anterior y pegar o atar según corresponda. Es aconsejable guardarlo en hojas de aluminio. El envoltorio debe permanecer firme. Indíquese claramente la zona cercana al cuero cabelludo y la distal.

Tomar vello pubiano y axilar, cortado al ras de la piel y colocarlo en sobre de papel.

Si la muestra se toma de un individuo fallecido es aconsejable arrancar el pelo para obtener el bulbo piloso. Esto último se realiza con el objeto de mejorar las posibilidades de determinación cronológica de la ingesta.

Si bien han sido informados algunos pocos estudios de su investigación mediante la detección del EtG, no ha podido establecerse una correlación fehaciente hasta hoy entre su concentración y el correspondiente en sangre entera. (27).

e. Testículo:

Esta matriz puede considerarse no convencional o alternativa. Sin embargo, podría constituir un espécimen valioso en casos de muertes traumáticas (Vg.: accidentes automovilísticos) donde resulte imposible obtener la muestra sanguínea o bien la génesis del trauma provoque la dilución de la sangre con líquidos corporales. Piette et al de la Universidad de Gent mostraron que existe correlación entre el alcohol determinado en sangre y en testículo. Siendo este último un tejido externo al abdomen es dable suponer que la difusión de alcohol desde el estómago no existirá o no será relevante.

En un estudio muy reciente del argentino L. Quintans (7) se investigó los niveles de etanol in vivo en ratas intoxicadas en forma aguda con etanol. Luego de la administración de una dosis única de etanol por vía oral los niveles testiculares siguieron una curva con un máximo a una hora de administración en cantidades comparables al hígado y descendiendo a niveles mínimos hacia las 24 horas. En la Figura I puede observarse la curva de absorción eliminación de etanol en tres tejidos incluido el testículo. Asimismo se observa que las concentraciones alcanzadas en caso de intoxicación aguda en ratas son comparables a la obtenida en casos similares en humanos.

Tabla1: Matrices biológicas susceptibles de análisis alcohólico postmortem, cantidades que se recomiendan remitir al laboratorio y marcadores o indicadores de ingesta

Muestra	cantidad	Analitos investigados
Sangre	5 ml - 10 ml	Etanol, etilglucurónido, metabolitos de serotonina
Humor vítreo	Aprox. 2 ml	Etanol
orina	Mín. 10 ml	Etanol, metabolitos de serotonina,etilglucuronido etilsulfato
Cerebro, hígado	100g sector interno	Etanol
Saliva	1-2 ml	Etanol, etilglucurónido, etilsulfato
pelos	1 - 2g	Etilglucurónido

Investigaciones futuras, podrán aportar mayores datos sobre producción postmortal de etanol en este tejido. Asimismo, su posible aplicación en casos forenses en los que estén involucrados traumas, dada la concentración de alcohol alcanzada a distintos tiempos y el tipo de cinética (similar a la de sangre) y su correlación con los guarismos en el tejido hemático.

Otro aspecto no menos importante que consigna el autor, son los niveles alcanzados de acetaldehído en testículo (0,23-0,42 nmoles/g) durante las primeras nueve horas. Si bien los valores son bajos, las futuras mejoras en el límite de detección de este metabolito con la técnica instrumental, podría aportar nuevos enfoques para una mejor interpretación sobre el grado de impregnación de alcohol.

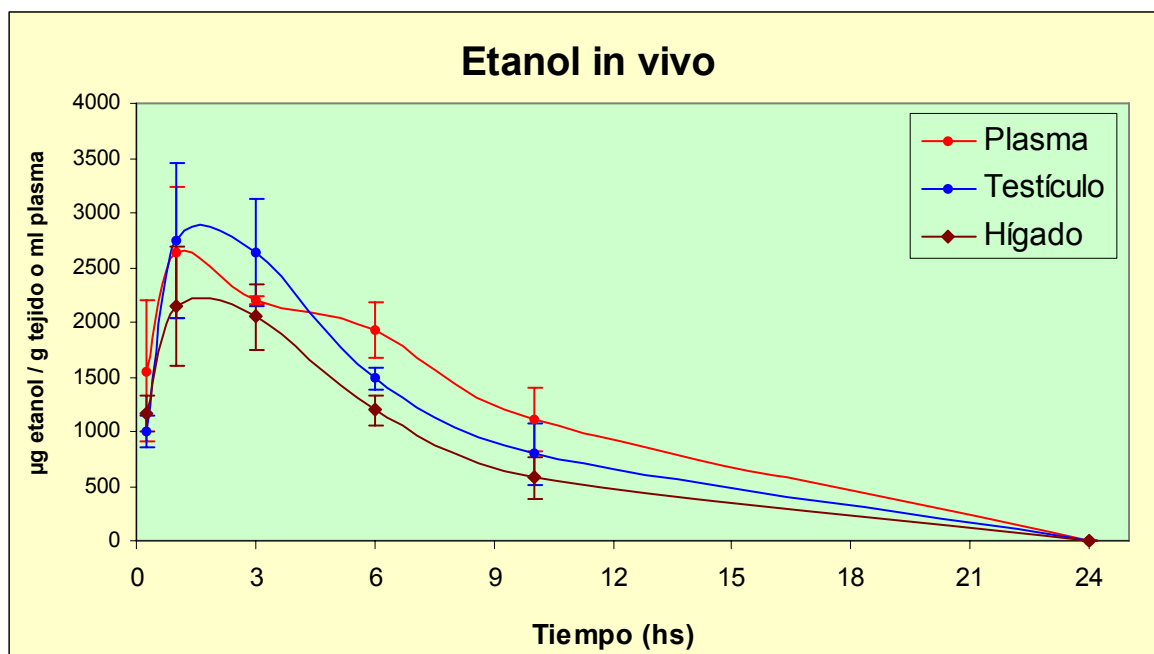


Figura I: Curvas de absorción-eliminación de etanol en plasma, hígado y testículo en ratas in vivo (con autorización de Quintans, L, 2008).

e. vísceras

Los tejidos viscerales constituyen una opción de segunda instancia, especialmente en aquellos casos en los que no se dispone de sangre, orina o humor vítreo.

Los más utilizados por investigadores forenses han sido el hígado, cerebro e inclusive vesícula biliar o la misma bilis. El inconveniente en el uso de órganos dentro del tracto gastrointestinal radica en la posible contaminación de alcohol por difusión desde el estómago a la cavidad abdominal y por ende a los órganos periféricos; o bien la migración de bacterias, especialmente *Escherichia coli*, responsable de la producción postmortem de etanol, en sustratos ricos en azúcares, tal como se encuentran en el tejido hepático.

De hecho, algunos autores consignan que sería conveniente extraer muestras de hígado de sectores profundos o interiores del lóbulo derecho, por estar este último menos expuesto a los productos migrados desde el estómago (19-21).

Respecto del cerebro puede aplicarse el mismo criterio que para el hígado, tomando sectores internos, inclusive el cerebelo. Es recomendable efectuar en forma urgente la autopsia y extraer la muestra colocándola en recipiente perfectamente limpio y hermético e inmediatamente congelado hasta su ulterior análisis.

Una vez recolectada la muestra debe colocarse en recipientes perfectamente limpios, sin el agregado de ningún conservante, enfriándose inmediatamente a temperaturas debajo de los 4°C y enviadas inmediatamente al laboratorio, evitando demoras que podrían atentar contra la indemnidad del espécimen. Esto último no es un detalle menor en nuestro hemisferio, ya

que en muchos casos los laboratorios se encuentran alejados de los sitios donde se efectúan la recolección de muestras y estas llegan varios días después de la toma y en condiciones de preservación inadecuada.

En los casos de exhumaciones se recomienda el uso de músculo esquelético.

3. Métodos analíticos comúnmente utilizados en la investigación de etanol

El análisis cuali-cuantitativo de alcohol etílico en sangre constituye en la actualidad una de las prácticas más utilizadas en el ámbito de laboratorios forenses alrededor del mundo.

Los métodos más antiguos tenían el inconveniente de resultados inciertos en caso de alteración de la muestra hemática sometida a estudio. Entre ellos se mencionan a los que informaban el resultado como “sustancias reductoras expresadas en alcohol etílico” tanto volumétricos como de microdifusión. También fueron utilizados con cierta frecuencia métodos enzimáticos que han sido superados en la actualidad.

La cromatografía gaseosa, con detector de ionización de llama en su variante técnica denominada espacio-cabeza (head space), resulta hoy el método más apropiado para la valoración de etanol en fluidos biológicos, especialmente sangre o plasma. (17,22)

La sangre entera es más proclive a alteraciones con el correr del tiempo que el plasma; más aún si no se agrega preservante (solución de fluoruro de sodio) o se mantiene a temperaturas elevadas. (28-30). Sin embargo, es la matriz más utilizada en laboratorios forenses en nuestro medio

Este método, muy sensible, versátil, de excelente precisión y exactitud, es el más utilizado en el mundo. Esto permite la inter comparación de resultados a través de ejercicios de control de calidad, tal como los desarrollados por el Instituto Nacional de Toxicología de España o bien los que se encuentra en vías de implementación a través del Servicio Médico Legal de Chile (31).

Las aplicaciones más corrientes las constituyen la medición de la alcoholemia en el instante de la toma de muestra o bien la determinación de la alcoholemia retrospectiva, que permite el cálculo del nivel de impregnación de alcohol “n” horas o minutos anteriores a la toma de muestra (3, 32-33).

Por otro lado, su exacta determinación permite inferir procesos en los cuales pueden formarse o perderse alcohol post toma de muestra (34-36).

Si bien en la actualidad, varios grupos de investigadores se encuentran avocados a los estudios de marcadores de ingesta alcohólica, inclusive en otras matrices no tradicionales como el pelo, la muestra hemática sigue siendo de elección a la hora de ofrecer la mejor interpretación del consumo etílico (37-38).

A continuación se describe un método de rutina con ésta técnica, considerando el procedimiento de la mejor curva de calibración y con la estimación de parámetros estadísticos para el cálculo del error.

3 a. Procedimiento

Cada muestra de sangre u otro fluido disponible se preparan, previa agitación para homogeneizar, colocándose en un frasco de vidrio de 10 ml de capacidad perfectamente limpio, agregándose:

1 ml de sangre entera.

1 ml de n-propanol 1 g. ‰, (o preferentemente Pert- butanol para muestras postmortem como estándar interno

1 ml de solución saturada de K_2CO_3 , como agente liberante.

A continuación se precinta el tapón de goma colocado como cierre del recipiente, y sellado herméticamente con precinto de aluminio. Posteriormente se coloca durante 30 minutos en un baño termostático a 50°C y a continuación se deja enfriar a temperatura ambiente.

Se tomaron entonces entre 0.4 a 0.5 ml del aire confinado en el recipiente mediante una jeringa hipodérmica plástica de 1 ml de capacidad inyectadas en el cromatógrafo.

En nuestro caso el equipo utilizado es un Cromatógrafo Gaseoso Shimadzu GC-14 conectado a un integrador CR4A, columna de acero inoxidable (2 m de longitud, 3 mm de diámetro interno) empacada con 0.3% Carbowax 1500-graphapack 60/80 (EMQ-ALL TECH), isotérmica 100°C, detector de ionización de llama (FID) conectado a un integrador Shimadzu C-R4A. Se realiza una curva de calibración, tal como se señala más abajo. Las condiciones de trabajo son las siguientes: Temperatura inicial 35°C, 1 minuto y 10°C/min de gradiente hasta 100°C temperatura final; siendo la temperatura de inyección y detector de 150 °C.

El método permite obtener señales definidas reproducibles a valores bajos de t_r (tiempos de retención) cercanos a los 2 min. en las condiciones de ensayo señaladas, con buena separación del estándar interno.

Los valores de área obtenidos en la inyección de los distintos estándares, se utilizan para la calibración y el ajuste de la curva, para el cálculo de concentraciones mediante el método de los cuadrados mínimos.

Para el fin señalado se fija el siguiente esquema de trabajo:

- 1) Se preparan 10 réplicas de 5 concentraciones distintas de etanol: 1, 2, 3, 4 y 5 g %0 (50 muestras totales). Cada patrón se preparó en un frasco hermético conteniendo:

1 ml de etanol patrón correspondiente.
1 ml de n-propanol (o tert-butanol) 1 g. %0.
1 ml de solución saturada de K_2CO_3

Se corren los cromatogramas correspondientes usando una calibración preexistente.

- 2) Se calcula el promedio de los 10 replicados de cada concentración de etanol utilizada.

Para llevar a cabo el promedio de los replicados de cada concentración se descartan aquellos valores que se consideraron “sospechosos”, utilizando un ensayo t:

n = número de replicados sin contar el dato sospechoso.

\bar{X} = promedio de replicados sin el dato sospechoso.

σ = varianza calculada sin el dato sospechoso.

Φ , grados de libertad = $n-1$.

$$\sigma_x = \sigma/n$$

Entonces,

$$t_{exp} = (X_{sosp} - \bar{X})/\sigma_x$$

Se compara el t_{exp} con la **t de student**, obtenido de la tabla, para los grados de libertad y el nivel de confianza deseado.

En ese caso se descartan los valores sospechados que dieran un $t_{exp} > t_{95\% \text{ confianza}}$. De modo que los puntos considerados para obtener el promedio son aquellos que, con un 95% de confianza corresponderían a la concentración considerada.

En la adecuación del método se pone énfasis en:

1. La Selección de la mejor curva de calibración entre distintas obtenidas a partir de diferentes cromatogramas. La selección se realiza teniendo en cuenta la ecuación de

una recta, Ψ que expresa los parámetros F_1 y F_2 en función de las áreas del patrón y el estándar interno. Además, la elección de la mejor curva de calibración se basa en la comparación de las gráficas obtenidas y de los coeficientes de regresión (r^2).

2. El Cálculo de error estándar en la estima de la concentración de etanol de una muestra problema.

Se describe la ecuación de F_2 en función de las áreas y las concentraciones del patrón y del standard interno. Se obtiene entonces, la ecuación de una recta que tiene a F_1 y F_2 como pendiente y ordenada al origen.

$$F_2 = \frac{C_{\text{patrón}}}{C_{\text{stand int}}} - \frac{F_1 A_{\text{patrón}}}{A_{\text{stand int}}} \quad (\text{ecuación } \Psi)$$

De esta ecuación se deduce:

$$\frac{A_{\text{patrón}}}{A_{\text{stand int}}} = \frac{1}{F_1} \frac{C_{\text{patrón}}}{C_{\text{stand int}}} - \frac{F_1}{F_2}$$

De modo que en una gráfica de $A_{\text{patrón}}/A_{\text{stand int}}$. Vs. $C_{\text{patrón}}/C_{\text{stand int}}$ obtenemos:

$$\begin{array}{ll} F_1/F_2 & \text{ordenada de origen} \\ 1/F_1 & \text{pendiente} \end{array}$$

En base a las áreas obtenidas en los cromatogramas utilizados en cada calibración, a través de una computadora utilizando un programa (Vg. QuatroPro), se calculan y comparan diferentes regresiones.

4. Curvas de absorción-eliminación de etanol en sangre y Cálculos de Alcoholemia Retrospectiva.

En el primer tercio del siglo pasado, se había observado que el metabolismo del alcohol transcurría orgánicamente a una velocidad constante, lentamente e independientemente de la concentración. Widmark había calculado que la velocidad de metabolización era de 0.15 gramos de alcohol por litro de sangre y hora. La ecuación generada a partir de sus estudios es, ampliamente utilizada con fines forenses. Principalmente se aplica para: 1) Estimar la cantidad de bebida alcohólica ingerida a partir del conocimiento de la concentración etílica en sangre. 2) Conocer el tenor de alcohol en sangre en un tiempo "t" anterior a la toma de muestra (Cálculo retrospectivo o retrógrado) y 3) Efectuar proyecciones sobre el guarismo en sangre según las cantidades de Etanol ingeridas.

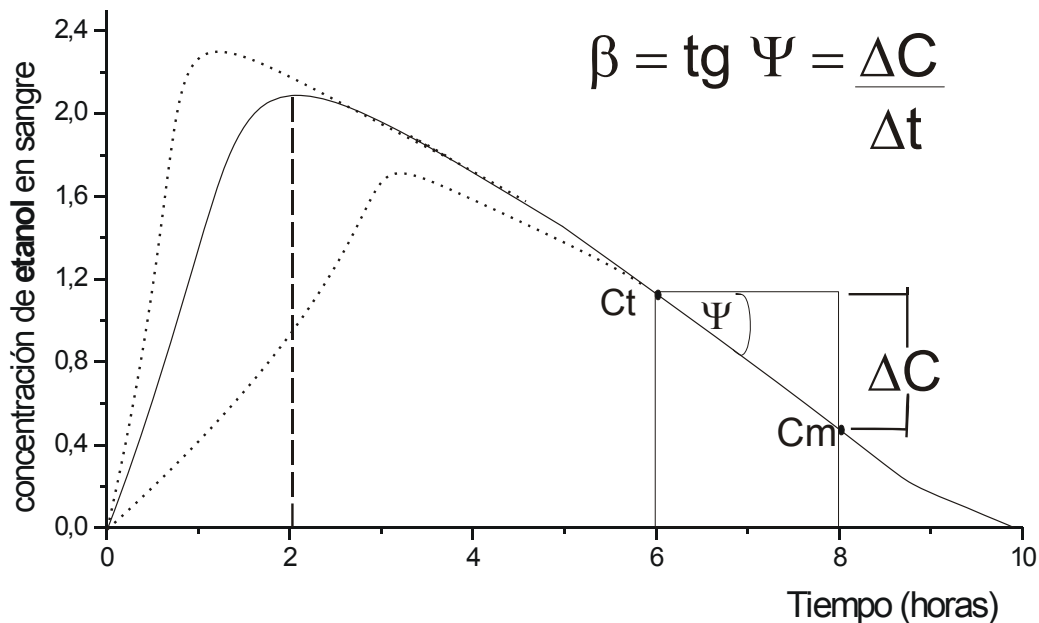
A continuación describimos brevemente aspectos cinéticos que nos ayudarán a interpretar la curva de absorción - eliminación

El alcohol contenido en las bebidas alcohólicas se absorbe preferentemente por el yeyuno ileon, alcanzando en breve el torrente sanguíneo dada su fácil difusión por las membranas biológicas.

La ingestión anterior o simultánea de alimentos sólidos hace más lenta la absorción y el ayuno la acelera.

La desintoxicación bioquímica es progresiva, dura aproximadamente entre 8 a 10 horas (algunos autores han informado 6-7 horas y otros hasta 14 horas (13,41). El ritmo de eliminación depende del coeficiente de etiloxidación, que expresa la cantidad de alcohol eliminado por minuto y por kilogramo de peso en un sujeto dado, cualquiera sea su concentración. Este coeficiente es llamado “constante β de Widmark”.

El siguiente gráfico ilustra una curva típica de absorción - eliminación, mediante las determinaciones de etanol en sangre (alcoholemia), y el tiempo transcurrido desde el acto de ingesta.



La primer parte indica una alcoholemia ascendente, que se manifiesta en la etapa de absorción de alcohol desde el tracto gastrointestinal a la sangre y dura entre 90 a 120 minutos aproximadamente. Si la absorción es rápida (como sucede con las bebidas de alta graduación alcohólica o libación en estado de ayunas) la curva de absorción semejará más una vertical (línea trazos cortados a la izquierda). Caso contrario, por ejemplo cuando se encuentran alimentos en el estómago al momento de la libación, poseerá menor pendiente (línea de trazos a la derecha). La zona de meseta indica un equilibrio entre el ingreso por difusión y eliminación oxidativa.

Lo antedicho ha sido confirmado con las experiencias del investigador sueco AW Jones (41) quien refiere una experiencia publicada en el año 1984 en la que estudió 48 voluntarios sanos a los que se administró 0,68 g/KG de etanol mediante libación de whisky. En esta contribución el autor ilustra con 48 gráficos el comportamiento de la curva absorción-eliminación. En algunos casos se observa la rápida absorción del etanol en pocos minutos y en otros en cambio se observan una línea ascendente con meseta próxima a los 120 minutos.

Prolongando hacia atrás la línea correspondiente a la eliminación, hasta cortar el eje de ordenadas, obtendremos el valor C_0 , correspondiente a la alcoholemia máxima teórica, suponiendo absorción inmediata y total de todo el Alcohol. Este valor debería ser igual a la dosis de alcohol tomada por Kg de peso del individuo. Pero, experimentalmente se comprobó que esto no sucede, sino que la relación D/C_0 es aproximadamente 0.7 para hombres y 0.6 para mujer, debido a la desigual distribución del etanol en los diferentes tejidos corporales. Esta relación D/C_0 suele definirse como Volumen de Distribución.

El coeficiente β (en el gráfico) puede obtenerse mediante la relación: $\Delta C / \Delta t$, es decir:

$$\beta = \Delta C / \Delta t.$$

La importancia del coeficiente β radica en que permite efectuar cálculos retrógrados de alcoholemia y determinar el alcohol ingerido por un individuo. El egregio Profesor español Manuel Repetto considera que para aplicar los cálculos de alcoholemia retrospectiva, conforme al espíritu del Derecho y no perjudicar al acusado, puede tomarse el valor mínimo de $\beta = 0.1$ gr por mil, si esta expresado en horas (11); o bien 0.002, si esta expresado en minutos.

En un principio se creyó que β era constante, pero con el tiempo, los estudios experimentales arrojaron nueva luz, en relación a la verdadera cinética que presenta el alcohol etílico. Hoy se admite que ciertos hábitos o patologías, pueden variar el valor de la constante β .

Es importante tener en cuenta que los cálculos en que involucramos β , sólo tienen validez en la etapa de eliminación, es decir, en la rama descendente de la curva absorción - eliminación.

Existe discrepancia entre los autores sobre la exactitud de los cálculos retrospectivos. Algunos (39,40) indican que los numerosos factores que influyen en β , no proporcionan datos fidedignos para aplicarlos matemáticamente con exactitud. En cambio otros (41) apoyan la validez del cálculo pero advierten la necesidad de efectuar dos determinaciones de alcoholemia, sucesivas, para asegurar que se está en la etapa neta de eliminación. Gullberg & Jones (42), ofrecieron una contribución interesante donde reevalúan la ecuación de Widmark. Sobre la base de una medición simple de etanol en sangre entera, los autores estimaron la cantidad de alcohol ingerida con un error de +/-20%, utilizando un método basado en la propagación del error que baja el rango de incertidumbre respecto del método original de Widmark. Otro aporte que parece oportuno consignar en este trabajo es que los cálculos de las constantes beta y r, deducido del estudio en 108 bebedores con cantidades conocidas de alcohol etílico, arrojaron resultados promedio similares a los que son utilizados en nuestro medio para el análisis retrospectivo, es decir, r: 0.68 +/- 0.061 y β : 13.3 +/- 2 mg/dl/h (o como es usado en nuestro laboratorio : 0.0022 +/- 0.0003 g/L/min.), poniendo énfasis en la necesidad de reportar el grado de incertidumbre (error) en el cálculo para propósitos legales.

La eliminación no sigue completamente una cinética lineal de orden "0" sino solo para concentraciones de etanol en sangre superior a 0.5 g/L aproximadamente. En el rango indicado, es decir, para alcoholemias bajas, la cinética es un proceso exponencial o cinética de Michaelis- Menten (33,41).

En los últimos diez años se han incrementado en forma alarmante los casos denominados homicidios culposos, principalmente por accidentes con vehículos de transporte, en los que la víctima o imputado poseen guarismos significativos de etanol. En otros delitos penales, como el homicidio simple o agravado, las cuestiones concernientes a la impregnación etílica son también relevantes. El cálculo de alcoholemia retrospectiva al momento del hecho es con frecuencia, requerido por la judicatura. Con mucha frecuencia, el delincuente es detenido varias horas después del hecho delictivo por lo que las muestras sanguíneas, tomadas tras su aprensión no reflejarán el tenor real de alcohol al momento del hecho.

Si la alcoholemia supera el valor de 0.7 g por mil, bien puede simplificarse el cálculo aplicando la ecuación correspondiente a una eliminación de orden "0", es decir, lineal.

Si observamos la curva de eliminación podemos aplicar el concepto geométrico de la tangente del ángulo ψ (cateto opuesto / cateto adyacente) es decir:

$$\frac{C_t - C_m}{t_2 - t_1} = \text{tg } \psi = \beta$$

Despejando:

$$C_t = C_m + \beta \cdot t$$

Siendo:

C_t : alcoholemia en el momento del hecho.

C_m : alcoholemia en el momento de la toma de muestra.

t: tiempo transcurrido desde el momento del hecho al de la toma de muestra ($t_2 - t_1$).

Respecto de la cantidad de alcohol "A" en el organismo al momento del hecho:

$$A = C_t \cdot p \cdot r$$

Siendo:

p: peso del individuo.

r: constante de Widmark, que relaciona la concentración de etanol en el cuerpo / concentración en sangre.

Sustituyendo en la ecuación la expresión correspondiente a C_t , hallada más arriba:

$$A = (C_m + \beta \cdot t) \cdot p \cdot r$$

A continuación, mediante un ejemplo, procederemos a calcular la alcoholemia retrospectiva y la cantidad de alcohol en el cuerpo, que nos permitirá inferir cuanta bebida alcohólica de una graduación determinada pudo haber tenido el imputado en el momento del hecho delictivo.

Supongamos que se trata de un homicidio culposo por accidente vehicular en el que el conductor es detenido y la muestra sanguínea extraída seis horas después del hecho. El informe de Laboratorio arroja el siguiente valor: 0.8 gramos de alcohol etílico por 1000 ml de sangre. Aplicando la fórmula para obtener la alcoholemia en un tiempo t de seis horas:

$$C_t = C_m + \beta \cdot t$$

C_m : en g. por 1000 ml.

β : 0.0025 en g / min / Kg

t: tiempo en minutos.

$$C_t = 0.8 + 0.0025 \cdot 360$$

$$C_t = 0.8 + 0.90$$

$$C_t = 1.70 \text{ g por } 1000 \text{ gr de sangre} = 1.70 \text{ g/L}$$

Este valor de 1.70 g/L será la alcoholemia teórica en el momento del hecho, si fehacientemente estamos en la etapa de eliminación. Para asegurarse que un individuo se encuentra en la etapa de eliminación al momento de la primera toma de muestra, debería realizarse una segunda extracción sanguínea luego de una hora aproximadamente.

A veces esto no es posible y debemos deducirlo del testimonio.

Si ahora aplicamos la ecuación para A (cantidad de alcohol), sabiendo que el imputado pesa 70 Kg y posee una constitución atlética ($r = 0.67$).

$$A_t = 0.8 \cdot 70 \cdot 0.67$$

$A_t = 37.52$ gramos de alcohol etílico absoluto o 46.9 ml (pasando a unidad de volumen, ml, por medio del dato de la densidad de etanol = 0.8 aprox.)

Este último dato es interesante cuando queremos referir la cantidad de bebida que supuestamente habría ingerido. Si se tratara de vino (considerando una graduación de 10 grados) implica que debió haber ingerido 469 ml, es decir casi medio litro de vino común.

Debe recordarse que el modelo es aproximado, y como se ha señalado, el error con que se trabaja en la práctica es de +/-20%. No obstante si la alcoholemia inicial es superior a 1.5 g/L, a los efectos de la interpretación, el guarismo no estará sujeto a tanta controversia. En cambio valores cercanos a los 0.5 g/L deberán ser cuidadosamente examinados y trabajar con datos y constantes más precisas para bajar el error del cálculo.

5. Factores involucrados en la pérdida y generación de etanol en fluidos biológicos.

En todas las estimaciones y cálculos de alcoholemia, hay que considerar las pérdidas de etanol que pueden operarse por la indebida preservación de la sangre (43-48)

Hemos podido comprobar, que las mayores pérdidas se deben a la existencia de importante cámara de aire entre la muestra contenida en el recipiente y la capacidad de éste. Es decir, matrices hemáticas escasas en recipientes de gran volumen, pierden etanol por evaporación;

La misma apreciación tienen Anderson & Prouty (44) y Parsons (47). Por tanto, debe tenerse muy en cuenta este hecho a la hora de evaluar guarismos de alcohol emanados del análisis químico.

Los trabajos sobre pérdidas por fenómenos putrefactivos son controvertidos. Algunos autores, entre otros, el célebre toxicólogo estadounidense Charles Winek (24), opinan que dichos fenómenos no influyen tanto como se creía algunos años atrás. Sin embargo en nuestro medio Coloccia y Argeri (13) publicaron una experiencia donde observaban pérdidas de alcohol a una tasa diaria del 6%, es decir con pérdidas totales a los quince o veinte días post toma de muestra. En la actualidad, un respetable número de publicaciones indican que las pérdidas de etanol con el transcurrir de días, incluso semanas, no son relevantes, si las muestras son convenientemente extraídas y colocadas en recipientes adecuados y bien sellados.

Esto último es advertido especialmente por Sreerama & Hardin (48), quienes evidenciaron una disminución del 30% en los guarismos de alcohol, en 345 muestras de orina conservadas en recipientes sellados con espuma de estireno, notando que el cambio de recipiente utilizado por uno más hermético evitaba la señalada pérdida.

El uso de sustancias como preservantes (v.g: fluoruro de sodio) en sangre de individuos vivos no mejora mucho los resultados, más aún si la muestra fue tomada con jeringa estéril y mantenida a bajas temperaturas. En estas condiciones las sangres de personas vivas pueden analizarse aún después de dos semanas sin variaciones apreciables respecto de la alcoholemia que se hubiera obtenido en el primer día (49).

Winek (28) efectuó estudios en muestras de sangre entera y suero, que habían sido mantenidas por varias semanas a temperaturas bajas y altas, notando que las muestras resguardadas a temperatura más alta, mostraban pérdidas significativas a partir de treinta días y particularmente en las de sangre entera, no observando pérdida considerable en muestras de suero.

Esto coincide con lo observado en nuestro laboratorio. Hemos notado en innumerables muestras de sangre, mantenidas tanto a temperatura ambiente como en refrigeración, que las pérdidas operadas al menos en tres semanas son insignificantes si los recipientes son tapados herméticamente y sin contener cámara de aire. Si en cambio poseen espacio de aire considerable, las pérdidas también lo son.

Respecto a la producción de alcohol etílico post-mortem, O'Neal & Poklis (15) notan que existen unas 58 especies de bacterias que son capaces de producir alcohol in vivo e in vitro. Si bien es cierto que la preservación de las muestras a temperaturas inferiores a los 4°C y la incorporación de Fluoruro de Sodio inhiben la producción de etanol de la mayoría de las bacterias no sucede así con la *Candida albicans*, levadura que ha demostrado ser una importante especie productora de alcohol (50)

Han sido informados muchos productos volátiles producidos por fenómenos postmortales (isopropanol, butanol, feniletanol, etc), por lo que se deberá poner especial atención en el estándar interno utilizado en los métodos de valoración por cromatografía gaseosa. Sería deseable la utilización de tert-butanol, por ser un compuesto no generado en dichos procesos postmortales.

Algunos autores opinan que no debería informarse alcoholemias postmortem inferiores a 0.3 g/L con el objeto de evitar conclusiones sujetas a discusiones controvertidas sobre el origen del etanol hallado.

En éste sentido Levine et al (51) sugieren que en ausencia de información adicional, concentraciones de alcohol etílico en sangre entera de 0.4 g/L o más, probablemente provenga de un consumo de alcohol.

Recientemente Leikin & Watson (30), señalaron que la producción de etanol a través de la fermentación, puede ocurrir sustancialmente en cuerpos descompuestos resultando niveles sanguíneos en el orden de 0.5 g/L. Por otro lado, Garriot (52) consigna que los procesos putrefactivos que generan etanol, luego de un deceso, llevan entre 3 y 10 días en desarrollarse.

Nuestra opinión en éste punto es que cuando los valores hallados son superiores a 1 g/L y se mantienen las muestras en condiciones apropiadas de resguardo, puede confiarse que el alcohol detectado tenga su origen en una ingesta.

Como fuera mencionado en otro párrafo de esta contribución, el humor vítreo continúa hoy usándose como matriz complementaria o bien suplementaria, cuando no se dispone de sangre o esta posee un alto grado de putrefacción.

En nuestro medio, García Fernández et al (25), efectuaron un estudio con 30 muestras de humor vítreo. En doce de ellas, con screening cualitativo positivo, se determinó conjuntamente la alcoholemia, obteniéndose correlación entre la concentración de etanol en ambos fluidos. La relación entre ambos especímenes osciló entre 0.7 - 0.95. La concentración mayor se encontró en humor vítreo y mostró ser poco susceptible de contaminaciones bacterianas o transformaciones post-mortem complejas.

Investigaciones más recientes (24), advierten que la relación antes señalada puede invertirse; es decir, la concentración de etanol en sangre entera sería superior a la concentración en humor vítreo. Esto se da en circunstancias en que el óbito se produzca antes que el etanol ingresado al cuerpo alcance el equilibrio o se compruebe que la formación de alcohol se debió a fenómenos microbiológicos o bien el espécimen fue contaminado durante el muestreo. Además, los autores informan que concentraciones de etanol superiores a 1 g/L, generalmente poseen una relación estable para humor vítreo/ sangre entera (1.16-1.19), mientras que para concentraciones menores la relación adolece de mayor variación. No obstante los autores advierten la prudencia en aplicar estos coeficientes en cada caso particular, aconsejando poner énfasis en el conocimiento de las circunstancias ante y postmortem que rodean el caso. (26).

En cuanto a los parámetros de aseguramiento de calidad de las técnicas analíticas aplicadas, es aconsejable efectuar controles de calidad internos y externos como manera de validar los resultados emitidos. En éste sentido, el ejercicio de intercomparación de etanol que realizamos periódicamente en el Instituto Nacional de Toxicología de España, nos ha resultado útil para evaluar la calidad de trabajo en nuestro centro. Se tiene conocimiento que a partir de 2006 el Servicio Médico Legal de Chile se encuentra desarrollando un programa de control de calidad de alcoholemias, que podría extenderse a otros países de la región (31).

Marcadores de ingesta aguda y crónica de etanol

Recientemente han sido publicados nuevos aportes de la comunidad científica internacional relacionados a sustancias producidas en baja concentración y que podrían ser utilizadas, eventualmente como biomarcadores de ingesta aguda o crónica.

Se ha verificado que una pequeña fracción del etanol consumido (<0.1%) sufre reacciones de conjugación de Fase II, mediante el ácido glucurónico activado, catalizadas por UDP-glucuroniltransferasa unida a la membrana mitocondrial, para producir etilglucuronido (EtG), hallados en niveles similares al acetaldehído en orina y sangre de pacientes alcoholizados (37,52-54).

El EtG es producido en un 0.02-0.06% aproximadamente de la dosis ingerida. Este compuesto es estable, soluble en agua, pudiendo ser detectado en orina hasta tres días posteriores al consumo de bebida alcohólica, con la importante consecuencia que ello adquiere en el ámbito jurídico. Recordemos que el alcohol etílico solo puede ser detectado en sangre entre 8 y 10 horas posteriores a la última libación.

Asimismo el EtG podría ser utilizado, como marcador para monitoreo de abstinencia en pacientes que efectúan programas de rehabilitación alcohólica.

Respecto de su investigación analítica, las técnicas publicadas no consignan pretratamientos extractivos en orina, estableciéndose un valor de cut-off de 0.1 µg/ml.

Una publicación reciente informó sobre el hallazgo de etilsulfato (EtS), propuesto como nuevo biomarcador para ingestas agudas de etanol (53).

Aproximadamente pasada una hora desde la ingesta se detecta el EtS, obteniéndose un máximo a las 4 hs, permaneciendo detectable hasta las 29 horas. Resulta entonces un buen marcador en casos donde se desea confirmar consumos recientes, como en los controles de conductores de vehículos con sospecha de encontrarse bajo los efectos del alcohol y en los lugares de trabajo, para aquellos operarios que conducen vehículos o maquinarias o bien para determinar si el alcohol etílico analizado en etapa postmortem provino de una incorporación activa o fue producido por microorganismos, posterior a la toma de muestra.

Dado que el consumo de alcohol puede alterar el metabolismo de la serotonina, el 5 hidroxitriptofol (5-HTOL) ha sido considerado un marcador de consumo reciente de alcohol. Como el 5-HTOL aumenta y el 5 hidroxindolacético (5-HIAA) disminuye, la relación 5-HTOL/5-HIAA ha sido utilizada como marcador más sensible. Esta relación se incrementa 15 veces en bebedores sociales y permanece elevada por 6 a 15 horas. Para Voltaire et al (17) una relación mayor a 20 micromoles/ mmoles es indicador de consumo reciente de etanol.

Se han estudiado otros biomarcadores tales como esteroides formados entre el etanol y ácidos grasos de cadena corta, que aún hoy son objeto de evaluación y comparación respecto de las ventajas sobre otros marcadores (55).

Con el objeto de ilustrar la utilidad forense de estos biomarcadores, consignamos la contribución de Schmitt et al (18) donde se estudió un individuo que conducía un vehículo y sufrió un severo accidente produciendo la muerte de uno de los ocupantes. Tres horas y media posteriores al hecho se le extrajo sangre y se determinó una alcoholemia de 1.44 por mil, dejando este guarismo la convicción de que el conductor del vehículo público se hallaba bajo los efectos del alcohol con la consecuente negligencia imputada. Sin embargo, el análisis de EtG arrojó resultados negativos. Los autores cuestionaron entonces el *modus operandi* de la toma de muestra poniendo en entredicho la posibilidad de una contaminación con un desinfectante conteniendo alcohol etílico, utilizado en el proceso de extracción de la muestra hemática.

Posteriores estudios en la misma persona demostraron que a concentraciones de etanol en sangre menores al valor indicado, se formaba EtG en su organismo. Asimismo pudo demostrarse que el resguardo de la muestra sanguínea durante un largo período (más de un año) permitía la detección del EtG, de lo que se dedujo que el EtG en suero, es bastante estable resguardado en freezer.

Atento lo expresado precedentemente podemos percibir que la pérdida y generación de alcohol posteriores al óbito y a la toma de muestra pueden inducir a conclusiones erróneas en los casos forenses analizados.

Luis Alberto Ferrari

Análisis toxicológico de etanol y su interpretación forense.

Cálculos retrospectivos, pérdida o generación en tejidos humanos e indicadores biológicos de ingesta. Breve revisión.

BIBLIOGRAFIA

1. Wamba Z., Ferrari L.A, Nieto RR, Arado MG, Colangelo CH, Nardo C, Sredcoff N and Stoichevich S. Incidence of drugs of abuse and alcohol in suicides occurred in the province of Buenos Aires in 1994, 1995 and 1996. *Proceedings of 35th TIAFT Meeting*. University of Padova. Pp.638-641 (1997).
2. Folino J, Arado MG, Ferrari LA y Marengo CM. Prevención de recidiva delictual en abusadores de sustancias. *Rev. Médica* 38 (3) 20-24 (2004).
3. Ferrari L.A. Alcohol etílico: Aspectos toxicológicos forenses, cálculos retrospectivos y modificaciones postmortem. *Bol. Asoc. Toxicol. Argent.* 63, 9-15 (2004).
4. Jönson A, Homlgrem P & Alhner J. Fatal intoxications in a Swedish forensic autopsy material during 1992-2002. *Forensic Sci. Int.* 143, 53-59 (2004)
5. Goldaracena CA, Piaggio OL, Raffo A, Gasparovic AM y Taus MR. Estudio estadístico sobre alcoholemia en conductores que circulan por una ruta nacional de elevado tránsito. *Acta Toxicol. Argent* 9 (1), 46 (2001).
6. Castro G.D, Delgado de Layño A.M.A, Costantini, M.H and Castro J.A. Cytosolic Xanthine oxidase mediated bioactivation of ethanol to acetaldehyde and free radical in rat breast tissue. Its potential role in alcohol promoted mammary cancer. *Toxicology* 160, 11-18 (2001).
7. Quintans, LN. Bioactivación del etanol en el testículo de rata y su rol en la toxicidad reproductiva en el alcoholismo. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de San Martín (2008)
8. Refaai MA, Nguyen PN, Steffensen RJ, Evans JE, Cluette Brown JE & Laposata M. Liver and adipose tissue fatty acid ethyl esters obtained at autopsy are post-mortem markers for premortem ethanol intake. *Clin. Chem.* 48, 77-83 (2002)
9. Schmitt G, Aderjan T, Keller M & Wo M. Ethyl glucuronide: an unusual ethanol metabolite in humans. Synthesis, analytical data and determination in serum and urine. *J. Anal. Toxicol.* 19, 91-94 (1995).
10. Allen JP, Sillanaukee P, Strid N & Litten RZ. Biomarkers of Heavy Drinking. *Assessing Alcohol Problems: A Guide for clinicians and Researchers*. Pp 37-53 (2002).
11. Ferrari LA en Laguens RM. La evidencia médico Legal en delitos contra las personas y muerte violenta. Ed. SCJBA, La Plata, Argentina. pp. 47-52 (2000)
12. Anthony RM, Sutheimer CA and Sunshine I. Methods for determination of alcohol by gas chromatography and flame ionization detector. *J Anal Toxicol* 4, 43-46 (1980).
13. Coloccia E y Argeri, N. Alcoholemia: Interpretación Legal y su determinación por el método de microdifusión. *Acta Bioquim. Clín. Latinoam.* 3: 96-110 (1969).
14. Baselt R.C. Disposition of toxic drugs and chemicals in man. Chemical Toxicology Institution, Foster City, sixth edition, (2002).
15. Levine B, Moore KA & Fowler D Interaction between carbon monoxide and ethanol in fire fatalities. *J Forensic Sci.* 124, 115-116 (2001)

16. Ferrari LA, Arado MG, Nardo CA, Mirson DJ, Garrote IV & Nieto RR. Carbon monoxide and ethanol in five victims of a fire fatality. *Justice & Health*, proceeding TIAFT Meeting, Washington DC, (2004)
17. Kugelberg FC and Jones AW. Interpreting result of ethanol analysis in post-mortem specimens: a review of the literature. *Forensic Sci. Int.* 165, 10-29 (2007)
18. Winek T., Winek C.L., Wahba W. The effect of storage at various temperatures on blood alcohol concentration. *Forensic Sci. Int.* 78: 179-185 (1996).
19. Gifford H and Turkel HW. Diffusion of alcohol through stomach wall after death. *J. Am Med Assoc.* 161, 866-868 (1956)
20. Plueckhahn VD, Path MC and Ballard B. Diffusion of stomach alcohol and hearth alcohol concentration at autopsy. *J. Forensic Sci.* 12, 463-470 (1967).
21. Takayasu T, Ohshima T, Tanaka N, Maeda H, Kondo T, Nishigami J, Ohtsuji M and Nagano T. Experimental studies on postmortem diffusion of ethanol-d6 using rats. *Forensic Sci. Int.* 76, 179-188 (1995).
22. Drummer OH. Toxicology: Methods in analysis postmortem. In Encyclopedia of Forensic Science. San Diego, CA, Academic press; pp 1404-1409 (2000).
23. Maes RAA. Current choice analytical methods in Toxicology. In Klinisch-toxicologische analytische Gegenwärtiger stand und forderungen für die zukunft. VCH Verlagsgesellschaft. pp. 17-26 (1987).
24. Honey D., Caylor C., Luthi R., and Kerriga S. Interpretation of postmortem alcohol concentration. Presentation as resume of complete paper in poster presentation at 42nd TIAFT Meeting at Washington DC, (2004).
25. García Fernández J. C., Patiño C.M.; Vázquez Fanego H., García M.R., Manes Marzano B. y Guinle A.E. Consideración acerca del empleo del humor vítreo para la determinación post mortem de alcohol etílico y drogas de uso ilícito. *Medicina Forense Argentina* 33: 2-7 (1994).
26. Jones AW and Holmgren P. Uncertainty in estimating blood alcohol by analysis of vitreous humor. *J. Clin. Pathol.* 54: 699-702 (2001).
27. Jurado C, Soriano T, Gimenez M & Menendez M. Diagnosis of chronic alcohol consumption. Hair analysis of ethylglucuronide. *Forensic Sci. Int.* 145, 283-285 (2004)
28. Winek CL, Winek T and Wahba, WW. The effect of storage at various temperatures on blood alcohol concentration. *Forensic Sci. Int.* 78: 179-185 (1996).
29. Drummer OH and Gerostamoulos J. Postmortem drug analysis: Analytical and Toxicological aspects. *Ther. Drug Monit.* 24: 199-209 (2002).
30. Leikin JB. and Watson WA. Postmortem toxicology: What the dead can and cannot tell us. *J. Toxicol. Clin. Toxicol* 41: 47-56 (2003).
31. Lobos Galvez, C Aseguramiento de calidad en los análisis toxicológicos. Comunicación. III TIAFT Regional Meeting, Santiago de Chile, (2006)
32. Montgomery MR and Reasor MJ. Retrograde extrapolation of blood alcohol data. *J. of Toxicol. and Envir. Health* 36: 281-192 (1992).
33. Repetto M. Toxicología Avanzada. Editorial Díaz de Santos, España (1995).
34. Roine R.P. Effect of concentration of ingested ethanol on blood alcohol levels. *Alcoholism* 15 (4) 734-739 (1991).
35. O'Neal C and Poklis A. Postmortem production of Ethanol and factors that influence interpretation. A critical review. *The Am. Journ.For. Med and Pathol.* 17: 8-20 (1996).
36. Mayes R.W. The postmortem production of ethanol and other volatiles. In G.R. Jones y PP Singer (eds.): Proceedings of the 24 International TIAFT Meeting, Edmonton, Alberta Society of clinical and forensic toxicologists, pp. 94-100 (1988).

37. Feldman M., Van Horne K.C, Liu Z., Bennett P and Kuntz D.J. Ethylglucuronide analysis in urine by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Justice & Health*, Sep, p.149 (2004).
38. Schmitt G., Droenner P., Skoop G., Aderjan R.. Blood sample containing 1.44 per mille ethanol doesn't contain ethylglucuronide: case report. *Blutalkohol* 34: 371-378 (1997).
39. Dubowski K M. Absorption, distribution and elimination of alcohol: Highway safety aspects. *S. Stud. Alcohol. suppl.* 10: 98-108 (1985).
40. Simpson G. Medico legal alcohol determination: Implication and consequences of irregularities in blood alcohol concentration VS time curves. *J. Anal. Toxicol.* 16: 270-271 (1992).
41. Jones AW. Forensic science aspect of ethanol metabolism. In Forensic Science Progress. Vol 5. Springer Verlag Edit. pp. 30-90 (1991).
42. Gullberg RG & Jones AW. Guidelines for estimating the amount of alcohol consumed from a single measurement of blood alcohol concentration: re-evaluation of Widmark's equation. *Forensic Sci. Int.* 69, 119-130 (1994).
43. Ferrari LA, Triszcz JM & Giannuzzi L. Kinetics of ethanol degradation in forensic blood samples. *Forensic Sci. Int.* 161, 144-150 (2006).
44. Jones GR. Postmortem Toxicology. In Moffat A.C., Osselton M.D., Widdop B.: *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons 2004*. Edited by Pharmaceutical Press, London, Tome I pp 94-107 (2004).
45. Madea B and Mushoff F. Postmortem Toxicology. *Forensic Sci. Int.* 142: 71-73 (2004).
46. Müller R.K. Toxicological Analysis. Ed. By Verlag Molina Press, Leipzig, (1995).
47. Parsons B. Blood Alcohol question. *The TIAFT Mailing list* (2002).
48. Sreerama L and Hardin GG. Improper sealing caused by the Styrofoam integrity seals in leak proof plastic bottle sealed to significant loss of ethanol in frozen evidentiary urine samples. *J. Forensic Sci.* 48 (3) 672-676 (2003).
49. Winek C.L. In: A.W Jones, Human metabolism of alcohol. Vol I. CRC Press, (1989).
50. Blume P and Lakatua, D.J The effect of microbial contamination of the blood sample on the determination of ethanol levels in serum. *Am J.Clin. Pathol.* 60: 700-702 (1973).
51. Levine B, Smith ML, Smialek JE and Kaplan YH. Interpretation of low postmortem concentrations of ethanol. *J. Forensic Sci.* 38, 663-667 (1993).
52. Schmitt G., Droenner P., Skoop G., Aderjan R. Ethyl glucuronide concentration in serum of human volunteers, teetotallers and suspected drinking drivers. *J. Forensic Sci.* 42: 1099-1102 (1997).
53. Helander A. and Beck O. Mass spectrometric identification of ethyl sulphate in humans. A new ethanol metabolite and a biomarker of acute alcohol intake. *Justice & Health*, Sept. pp. 150 (2004).
54. Schloegl H, Dresen K, Spackzynski M, Stoertzel FM Wurst W & Weinmann W. Stability of Ethyl glucuronide in urine, post-mortem tissue and blood samples. *Int. J. Legal Med.* 120, 83-88 (2006).
55. Kulig C, Beresford TP, & Everson GT. Rapid accurate and sensitive fatty acid ethyl ester determination by gas chromatography mass spectrometry. *J. Lab. Clin. Med.* 147, 133-138 (2006).