

**ETIL SULFATO Y ETIL GLUCORONIDO COMO MARCADORES DE  
DESCARTE DE CONSUMO RECIENTE DE ALCOHOL O ALCOHOL  
ENDÓGENO EN MUESTRAS POST MORTEM EN EL INSTITUTO NACIONAL  
DE MEDICINA LEGAL (INML).**

**German Andrés Velásquez Parra**

**Universidad ICESI**

**Facultad de Ciencias Naturales, Departamento de ciencias Farmacéuticas**

**Programa de Química Farmacéutica**

**2018**

**ETIL SULFATO Y ETIL GLUCORONIDO COMO MARCADORES DE  
DESCARTE DE CONSUMO RECIENTE DE ALCOHOL O ALCOHOL  
ENDÓGENO EN MUESTRAS POST MORTEM EN EL INSTITUTO NACIONAL  
DE MEDICINA LEGAL (INML).**

**German Andrés Velásquez Parra**

**Trabajo de Grado para optar por el título de Químico Farmacéutico**

**Tutor: Franky Javier Urbano Cerón (Magister en Ciencias biomédicas/  
Especialista en ciencias Forenses)**

**Cotutor: Giovanni Rojas Jiménez (PhD Química/ Magister en ciencias-  
química)**

**Universidad ICESI**

**Facultad de Ciencias Naturales, Departamento de ciencias Farmacéuticas**

**Programa de Química Farmacéutica**

**2018**

## **AGRADECIMIENTOS.**

*Agradezco a mi mamá, a mi abuela y a mi tía por ser los pilares en mi vida y porque gracias a ellas tengo los valores y los principios que rigen mis actos.*

*Agradezco a mi tutor el profesor Frankly Urbano por el acompañamiento, la enseñanza, el tiempo y la confianza que me brindó durante la investigación.*

*Agradezco al Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses Regional Suroccidente por darme la oportunidad de explorar nuevos conocimientos y*

*Agradezco a la Universidad Icesi por permitirme vivir las mejores experiencias.*

*Agradezco a los profesionales forenses del laboratorio de toxicología por acogerme y permitirme aprender de sus conocimientos y habilidades.*

*Agradezco a los médicos forenses y sus asistentes por ayudarme en el proceso de recolección de muestras*

*Agradezco a mi Cotutor el profesor Giovanni Rojas por su tiempo y el conocimiento que me ofreció a lo largo de la investigación.*

*Agradezco a mi novia Ana María por su apoyo incondicional además por siempre motivarme a convertirme en una mejor persona y a alcanzar mis metas.*

*Agradezco a Daniela por ser una amiga excepcional que estuvo presente en cada uno de mis logros y crecimiento profesional.*

*Agradezco a Alberto, José y Kevin por todas las experiencias compartidas donde cada una de ellas me enseñó a apreciar la grandeza de ellos.*

*Agradezco a Juliana, Laura, Andrea, Camila, Jordy, Giovanny y Julián por el tiempo y el conocimiento compartido lo cual me ayudó a crecer profesional y personalmente.*



**APROBADO POR:**

(Julián Arbey González Ospina)  
**Evaluador**

(Frankly Javier Urbano Cerón)  
**Tutor del Proyecto.**

(Giovanni Rojas Jiménez)  
**Co-Tutor del Proyecto.**

## Contenido

|          |   |    |
|----------|---|----|
| 1.       | INTRODUCCION.....   | 12 |
| 2.       | DESCRIPCION DEL PROYECTO.....   | 14 |
| 2.1.     | Planteamiento de la pregunta o problema de investigación y su justificación en términos de necesidades y pertinencia..... | 14 |
| 2.2.     | MARCO TEORICO Y ESTADO DEL ARTE.....  | 15 |
| 2.2.1.   | ESTADO DEL ARTE.....  | 15 |
| 2.2.2.   | MARCO TEORICO.....  | 16 |
| 2.2.2.1. | Marcadores bioquímicos de alcohol exógeno y metabolismo.....  | 16 |
| 2.2.2.2. | Marcadores bioquímicos de alcohol endógeno.....   | 18 |
| 2.2.2.3. | Métodos analíticos en la investigación de alcohol y sus metabolitos secundarios.....                                      | 18 |
| 2.2.2.4. | Efecto depresor sobre el sistema nervioso central.....  | 26 |
| 2.3.     | OBJETIVOS.....  | 27 |
| 2.3.1.   | OBJETIVO GENERAL.....   | 27 |
| 2.3.2.   | OBJETIVOS ESPECIFICOS.....  | 27 |
| 2.4.     | METODOLOGIA.....  | 27 |
| 2.4.1.   | RECOLECCIÓN DE MUESTRAS.....  | 28 |
| 2.4.2.   | DETERMINACION DE ALCOHOLEMIA.....   | 29 |
| 3.       | RESULTADOS.....   | 38 |
| 4.       | DISCUSION.....  | 45 |
| 5.       | CONCLUSIONES.....   | 52 |
| 5.1.     | RECOMENDACIONES.....  | 52 |
| 6.       | Bibliografía.....   | 54 |

## LISTADO TABLAS.

|          |  |    |
|----------|--|----|
| Tabla 1  | Parámetros analíticos del cromatografo de gases con un detector de ionización de llama acoplado a un automuestreador de volátiles o Headspace .... | 30 |
| Tabla 2  | Relación de la señal cromatográfica y la concentración de etanol con la respectiva señal de estándar interno .....                                 | 33 |
| Tabla 3  | Parámetros para el cromatografo liquido .....  | 35 |
| Tabla 4  | Parámetros para el espectrómetro de masas en tandem .....  | 36 |
| Tabla 5  | Concentraciones de calibración cualitativa de etilglucoronido y etilsulfato  | 37 |
| Tabla 6  | Casos positivos analizados distribuidos según etiología de muerte .....  | 38 |
| Tabla 7  | Casos positivos analizados distribuidos según tiempo de toma de muestra .....  | 38 |
| Tabla 8  | Casos positivos analizados distribuidos según el sexo de los sujetos .....   | 39 |
| Tabla 9  | Casos positivos analizados distribuidos según la edad de los sujetos .....   | 39 |
| Tabla 10 | alcoholemia en muestras de sangre analizadas por medio de cromatografía de gases acoplada a un detector de Ionización de llama. ....               | 41 |
| Tabla 11 | correlación de la alcoholemia con el consumo de etanol según antecedentes .....  | 42 |

## **LISTADO DE GRAFICOS.**

|  |    |
|--|----|
| Grafico 1 Diagrama de pastel para etiología de muerte.....                 | 39 |
| Grafico 2 Diagrama de pastel para Tiempo de toma de muestra.....           | 40 |
| Grafico 3 Diagrama de pastel para distribución de sexo de los sujetos..... | 40 |
| Grafico 4 Diagrama de pastel para Edad.....                                | 41 |

## LISTADO DE FIGURAS.

|   |    |
|---|----|
| Figura 1 Esquema general de un detector FID .....                     | 20 |
| Figura 2 Componentes de un espectrómetro de masas. ....               | 21 |
| Figura 3 Componentes de LC acoplada a un espectrómetro de masas. .... | 22 |
| Figura 4 Esquema de un sistema ESI.....                               | 23 |
| Figura 5 Esquema de un sistema APCI .....                             | 24 |
| Figura 6 Esquema analizador de IT. ....                               | 24 |
| Figura 7 Esquema de espectrómetros MS/MS .....                        | 25 |
| Figura 8 Espectro de MS/MS .....                                      | 26 |



## LISTADO DE IMÁGENES.

|   |    |
|---|----|
| Imagen 1 Estructura química de etilglucoronido. ....                          | 17 |
| Imagen 2 Estructura química de etilsulfato .....                              | 18 |
| Imagen 3 Cromatograma de Resultado positivo para alcoholemia en el caso 1 ... | 44 |
| Imagen 4 Cromatograma de Resultado negativo para alcoholemia en el caso 2. .  | 44 |
| Imagen 5 Espectro de masas del Etilglucoronido evaluado en modo MRM. ....     | 49 |
| Imagen 1 Espectro de masas del Etilsulfato evaluado en modo MRM.....          | 48 |

## RESUMEN.

Desde una perspectiva de salud pública se ha evidenciado que el consumo de alcohol toma un papel protagónico en la causalidad de accidentes de tránsito y ocupacionales, discapacidad, enfermedades hepáticas (cáncer), problemas intrafamiliares, trastornos psicológicos y psiquiátricos y la muerte. Diferentes estudios epidemiológicos y forenses a nivel nacional y global han arrojado valores desalentadores acerca de los índices de muerte que se generan por el consumo de alcohol anualmente. Debido a la persistencia de esta problemática se ha buscado generar estrategias que permitan analizar e identificar de forma correcta el consumo de alcohol por una persona con el fin de generar un dictamen forense veraz y exacto el cual no dé oportunidad a la presentación de falsos positivos o falsos negativos. De esta manera se estudia el potencial de dos marcadores toxicológicos (etilglucoronido y etilsulfato) como indicadores de consumo reciente de alcohol considerando sus propiedades químicas y biológicas.

Por lo anterior este proyecto tuvo como objetivo central determinar la presencia de etilsulfato y etilglucoronido, en muestras post-mortem de sangre y orina de humanos como marcadores toxicológicos de consumo de alcohol, los cuales pueden ser generados por el metabolismo hepático específicamente por las reacciones de fase 2 después de consumir una determinada cantidad de alcohol.

Para ello se realizó una recolección de muestras que se clasificaron en 3 grupos: grupo control (alcoholemia negativa y no tiene relación con alcohol), grupo 2 (presenta relación con alcohol) y grupo 3 (alcoholemia positiva no se tiene documentada relación con alcohol). Dichas muestras fueron tratadas y la determinación de estos metabolitos se llevó a cabo por medio de cromatografía líquida de alta resolución con detector selectivo de masas en tándem con ionización química por presión atmosférica (MS/MS-APCI- LC) en el laboratorio de toxicología del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses regional Suroccidente. Posteriormente se buscó determinar la relación que existe entre la presencia de etilglucoronido y etilsulfato con el consumo reciente de alcohol.

Se obtuvieron 26 muestras con resultado positivo para alcoholemia de 52 muestras analizadas, no se logró determinar la viabilidad del uso de la ionización química por presión atmosférica para el análisis de etilglucoronido y etilsulfato, además no se logró establecer la presencia de estos metabolitos en las muestras analizadas por lo que fue imposible establecer la relación entre estos y el resultado obtenido para alcoholemia.

**Palabras Clave:** Etilglucoronido, Etilsulfato, Ionización química a presión atmosférica, espectrometría de masas, cromatografía líquida.

## **ABSTRACT.**

From a public health perspective it has been shown that alcohol consumption plays a leading role in the causation of traffic accidents and occupational accidents, disability, liver diseases (cancer), intrafamilial problems, psychological and psychiatric disorders and death. Different epidemiological and forensic studies, both nationally and globally, have shown discouraging values about death rates that are generated by alcohol consumption annually. Due to the identification of this problem, authorities have sought to generate strategies that allow us to analyze and correctly identify the consumption of alcohol by a person in order to generate a truthful and accurate forensic report in which the presentation of false positive or false negative. In this way, the potential of two toxicological markers (ethylglucuronide and ethyl sulfate) as indicators of recent alcohol consumption considering their chemical and biological properties is studied.

Therefore, the main objective of this project was to determine the presence of ethylsulfate and ethylglucuronide, in post-mortem samples of blood and urine of humans as toxicological markers of alcohol consumption, which can be generated by human hepatic metabolism specifically by the reactions of phase 2 after consuming a certain amount of alcohol.

To this end, a collection of samples was carried out, which were classified into 3 groups: control group (negative alcohol level and not related to alcohol), group 2 (presents a relationship with alcohol) and group 3 (positive alcohol level does not have a documented relationship with alcohol). The samples were treated and the determination of these metabolites was carried out by means of high resolution liquid chromatography with tandem mass selective detector with chemical ionization by atmospheric pressure (MS / MS-APCI-LC) in the toxicology laboratory of the National institute of legal medicine and forensic sciences regional Suroccidente. Subsequently, sought to determine the relationship between the presence of ethylglucuronide and ethyl sulfate with recent consumption of alcohol.

26 samples were obtained with a positive result for alcohol from 52 analyzed samples. The viability of the use of chemical ionization by atmospheric pressure for the analysis of ethylglucuronide and ethylsulfate could not be determined, and the presence of these metabolites in the samples was not established. Analyzed by what was impossible to establish the relationship between these and the result obtained for the evaluation of ethanol in blood and urine.

**KEYWORDS:** Ehtylglucoronide, Ethylsulphate, Atmospheric Preassure Chemical Ionization, Mass Spectrometry, Liquid Chromatography.

## 1. INTRODUCCION.

El alcohol ha sido desde tiempos inmemorables la bebida por excelencia más utilizada para acompañar los grandes acuerdos que han enmarcado el destino de la humanidad. El consumo de este compuesto a lo largo de los años se ha convertido en un hecho habitual, con distintas implicaciones y generando diferentes impactos en el ser humano. Ha tenido diferentes usos: en los medicamentos como vehículo de fármacos, en los alimentos como aditivo y hasta en rituales religiosos de diferentes culturas con una connotación de bebida mágica. Con el pasar de los siglos se ha hecho necesario hacer un control del consumo de alcohol por los humanos para lo cual se han desarrollado métodos y técnicas que permiten identificar en la sangre este compuesto y determinar si su consumo es agudo o crónico. La ingesta de bebidas embriagantes en la actualidad se ha convertido en una problemática que genera riesgos en el ámbito social, familiar, clínico, vial y de trabajo. El alcohol es una de las principales bebidas consumidas en los grupos sociales y al tener el visto bueno de las entidades legales se ha convertido en un enemigo silencioso del orden social.

Según estudios realizados por la OPS en conjunto con la OMS, el porcentaje de bebedores hombres en las américas subió de un 18% a casi un 30% entre los años 2005 y 2010, y aumento del 4,6 al 13% en el caso de las mujeres. Estos estudios toman relevancia cuando se publican indicadores acerca de esta sustancia los cuales dicen que ella al ser usada excesivamente ha contribuido con la muerte de cerca de 300000 personas en el año 2012 en diferentes partes del mundo. Es importante tener en cuenta que el alcohol contribuye con alrededor de 200 enfermedades y lesiones en las que se pueden incluir la cirrosis hepática además de algunos tipos de cáncer, y es, además uno de los principales factores de muerte en adolescentes (Oliel & Everwine, 2015).

Se debe tener en cuenta que todas las acciones realizadas bajo los efectos del alcohol tienen graves implicaciones en el ámbito legal y forense porque a partir de estas se pueden generar respuestas jurídicas como la imputabilidad de cargos, indemnizaciones, la capacidad civil, el uso de armas, entre otros. En Colombia por ejemplo, bajo las nuevas reformas que el gobierno ha realizado sobre el código de policía y de tránsito actual se contemplan todos estos ámbitos y se promulgan las acciones que se deben realizar en situaciones en las que el alcoholismo sea el protagonista. Además Cuando un individuo consume alcohol de forma crónica se generan cambios fisiológicos inminentes que pueden terminar en la generación de patologías psicóticas como la dependencia, la cual puede llegar a tener una trascendencia marcada en el marco legal involucrando además al ambiente y la sociedad que rodea un individuo (social, 2013).

En el presente los especialistas forenses realizan análisis de alcoholemia en diferentes matrices biológicas con el fin de determinar las pistas que permiten conocer las circunstancias que rodearon la muerte de una persona. En ciertas ocasiones resultados postmortem positivos pueden generar dudas respecto al origen del etanol, puesto que los antecedentes que originaron el deceso de la persona, sugieren que no hubo consumo de alcohol; o en caso contrario, que hubo consumo de esta sustancia y los resultados de alcoholemia pueden indicar no detectado; por ello el patólogo que desarrolla el caso forense debe considerar la posibilidad de la generación de etanol endógeno a causa de procesos de fermentación u otro proceso metabólico, adulteración o que el etanol se eliminó por metabolismo.

Por lo anterior diversas investigaciones han postulado nuevas metodologías donde se evalúan moléculas que son metabolitos secundarios del etanol y se generan por diferentes reacciones que por su naturaleza pueden ser útiles como marcadores que permitan solucionar dudas cuando se presenten posibles falsos positivos o falsos negativos. Dos de estas moléculas son etilsulfato y etilglucoronido, se producen por reacciones no oxidativas en el hígado una vez una persona consume alguna bebida embriagante y pueden ser analizadas por técnicas analíticas como la cromatografía líquida de alta resolución con detector selectivo de masas en tándem con ionización por electro-spray (MS/MS-ESI- LC).

Basados en esto este proyecto busca establecer la presencia o ausencia de estos metabolitos, posteriormente se pretende establecer las condiciones cromatográficas y del detector de masas que permitan realizar una detección cualitativa pertinente en sangre y orina de estas dos importantes moléculas.

## **2. DESCRIPCION DEL PROYECTO**

### **2.1. Planteamiento de la pregunta o problema de investigación y su justificación en términos de necesidades y pertinencia.**

En el marco de la legalidad y la justicia todos los procesos penales deben tener un control exhaustivo y riguroso en el manejo de las pruebas que inculpan o hacen inocente a un sujeto. Unos de los parámetros de gran relevancia y protagonismo en la toxicología forense es la alcoholemia, que mide la cantidad de alcohol (en gramos) por cada litro de sangre o en aire espirado (DGT, 2012). En la actualidad, Colombia presenta un índice elevado de muertes causadas por accidentes de tránsito sin dejar a un lado los accidentes laborales y por supuesto los asuntos criminales como las violaciones o abusos de tipo sexual. Se ha visto que en resultados postmortem se generan dudas debido a la posible presencia de falsos positivos para alcoholemia. Siendo las principales causas la generación de etanol endógeno por procesos de fermentación, adulteración de las muestras en estudio o la eliminación del etanol por el metabolismo. Por lo anterior se hace necesario y de gran interés estudiar marcadores toxicológicos diferentes al etanol que permitan esclarecer los casos en los cuales se presente algún tipo de confusión con respecto al consumo de alcohol permitiendo de esta forma aplicar justicia de una forma correcta.

En diferentes zonas del mundo se han realizado diferentes estudios que han descrito el papel del etil glucurónido y el etil sulfato y su importancia como marcadores de descarte (Martin, 2005). Sin embargo, cabe destacar que en nuestro país aún no se han adelantado investigaciones que involucren estos metabolitos por lo que en el presente solo se maneja la alcoholimetría como prueba judicial en los dictámenes forenses.

El metabolismo del etanol comprende reacciones de fase 1 y 2 en el hígado, las primeras se relacionan con la funcionalización de los compuestos, es decir, se introducen en las estructuras de las moléculas exógenas grupos funcionales reactivos lo que les confiere a estas una mayor actividad química y las segundas tienen como finalidad inactivar la molécula exógena. Las reacciones de fase 2 son de gran importancia ya que se ha observado que el etanol exógeno en esta etapa del metabolismo puede reaccionar con ácido glucurónico y sulfato obteniendo sustancias como el etil glucurónido y el etil sulfato respectivamente (Cederbaum A. I., 2000). Estos metabolitos pueden permanecer y ser detectados en el organismo en diferentes muestras biológicas como: uñas, pelo, sangre y orina mucho tiempo después de que el etanol ha sido eliminado completamente debido a que la vida media de estos compuestos es mucho más elevada que la del etanol.

## 2.2. MARCO TEORICO Y ESTADO DEL ARTE.

### 2.2.1. ESTADO DEL ARTE.

Este proyecto de investigación se realiza en el marco de la determinación forense de alcohol en humanos y la optimización de las metodologías y las técnicas que en el presente se desarrollan para la cuantificación de este compuesto en diferentes matrices biológicas. Desde los años 90s hasta la actualidad se ha observado que el número de investigaciones en esta temática han aumentado lo que ha permitido aplicar los metabolitos en estudio no solo en el área forense sino también en la parte clínica. Dichas sustancias se han utilizado para determinar las causas de malformaciones y muertes de neonatos en los que se presume que sus madres consumieron alcohol en el embarazo. Otras aplicaciones de estos marcadores han estado relaciones con la determinación de las causas de accidentes de tránsito, laborales, determinación forense de las causas de muerte a partir de muestras de fósiles y la caracterización de trastornos psiquiátricos en una persona. Cabe resaltar que, aunque en estos estudios las matrices biológicas estudiadas sean variadas y las metodologías no sean las mismas se han establecido algunos parámetros generales para la determinación de los marcadores estudiados. Con respecto a lo anterior se ha reportado que se pueden evaluar matrices biológicas tales como: pelo, orina, sangre, humor vítreo, testículo y vísceras. Basados en lo anterior para el planteamiento de este proyecto de investigación se realizó una búsqueda en la literatura y se tuvieron en cuenta algunos trabajos previos en esta área tales como: "*Detección times for Urinary EthylGlucoronide and Ethyl Sulfate in Heavy Drinkers during Alcohol Detoxification* (Anders Helander, 2009), *interpretación de la presencia de alcohol en autopsias con especial mención a los lactantes* (Fernandez, 2015), *Ethyl glucuronide and ethyl sulfate in autopsy samples 27 years after death* (Lucia Polit, 2008), *Distribution of ethyl glucuronide in rib bone marrow, other tissues and body liquids as proof of alcohol consumption before death* (Haiko Schloegl, 2006), *Ethyl glucuronide: a marker of recent alcohol consumption with clinical and forensic implications* (Friedrich Martin wurst, 2000)".

## **2.2.2. MARCO TEORICO.**

Las medidas directas de consumo de alcohol incluyen pruebas de alcohol en sangre, alcoholímetros y nuevos biomarcadores que presentan una opción potencial para optimizar los resultados arrojados por estas pruebas. Tanto el alcohol en la sangre como el alcoholímetro poseen ventanas mínimas de detección de 10 hasta 12 horas. En la actualidad existen nuevos marcadores que permiten obtener resultados más certeros y que ofrecen ventajas clínicas cuando se realiza una evaluación completa, en la detección de los trastornos por el consumo de alcohol (S.C. Turfus, 2013).

En el presente se han analizado nuevas estrategias que comprenden el estudio de nuevos marcadores toxicológicos como el etil glucurónido (ETG) y el etil sulfato (ETS) que poseen un tiempo mayor de residencia en nuestro organismo lo que permite su detección en un mayor tiempo a través de muestras de orina (Morini, 2011). Investigaciones realizadas han servido como una herramienta para estudiar los procesos oxidativos que sufre el etanol al entrar premortem en nuestro metabolismo hepático, dichos estudios han dado por sentado que unos de los principales metabolitos secundarios generados son el ETG y ETS (Jurado, 2009). Por lo que se podría perfilar estos dos compuestos como una referencia de alta sensibilidad y especificidad en la determinación de la ingesta de alcohol en un individuo.

Diferentes grupos de investigación a nivel mundial han intentado identificar ETG y ETS en diferentes matrices biológicas a lo largo de los años. Uno de estos estudios se realizó en el instituto noruego de salud pública, División de Ciencias Forenses. Dicho estudio mostro que en un gran número de casos forenses en los cuales se detectó alcoholemia positiva en sangre no se había presentado consumo de alcohol antes de la hora de la muerte. Por lo tanto, se analizaron las muestras que habían arrojado resultados positivos donde se procuraba determinar la presencia de ETG y ETS por medio de espectrometría de masas en tándem y cromatografía líquida de Ultra Performance (UPLC-MS/MS). Los resultados obtenidos en dicha investigación determinaron la ausencia de los marcadores en el 50 % de las muestras con lo que se pudo decir que para estos casos no había presencia de una ingesta de alcohol premortem (Helander A, 2007).

### **2.2.2.1. Marcadores bioquímicos de alcohol exógeno y metabolismo.**

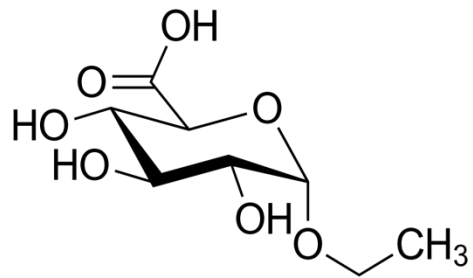
El metabolismo del etanol comprende reacciones de fase 1 y 2 en el hígado, las primeras se relacionan con la funcionalización de los compuestos, es decir, se introducen en las estructuras de las moléculas exógenas grupos funcionales reactivos lo que les confiere a estas una mayor actividad química y las segundas tienen como finalidad inactivar la molécula exógena. Las reacciones de fase 2 son



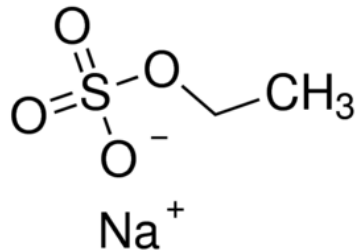
de gran importancia ya que se ha observado que el etanol exógeno en esta etapa del metabolismo puede reaccionar con ácido glucurónico y sulfato obteniendo sustancias como el etil glucurónico (imagen 1) y el etil sulfato (imagen 2) respectivamente (Cederbaum A. I., 2000). Estos metabolitos pueden permanecer y ser detectados en el organismo en diferentes muestras biológicas como: uñas, pelo, sangre y orina mucho tiempo después de que el etanol ha sido eliminado completamente debido a que la vida media de estos compuestos es mucho más elevada que la del etanol.

Una vez una persona consume una determinada cantidad de alcohol la absorción de este se da en mayor medida en el intestino delgado, pero el vaciamiento gástrico y el ritmo de absorción intestinal dependen de varios factores. El ritmo de absorción se acelera proporcionalmente con la concentración de alcohol ingerido, hasta lograr un máximo de 40%. En este punto se enlentece la absorción debido al aumento en el tiempo del vaciamiento gástrico, dicho efecto también se puede observar en la ingestión de alcohol con alimentos (Martin, 2014). El metabolismo del etanol comprende procesos oxidativos y no oxidativos, los primeros se llevan a cabo en un 90-95% principalmente en el hígado a través del sistema etanol-oxidante microsomal alcohol deshidrogenasa y catalasa. Por otro lado, la vía no oxidativa se da principalmente en hígado y páncreas, esta catalizada por ácidos grasos de éster etílico lo que genera compuesto etílico de ácidos grasos tales como etilglucoronido y etilsulfato que se mantienen en el organismo por largos periodos de tiempo (Arrieta, 2000).

**Imagen 2 Estructura química de etilglucoronido.**



**Imagen 3 Estructura química de etilsulfato**



#### **2.2.2.2. Marcadores bioquímicos de alcohol endógeno.**

El etanol endógeno es un tipo de alcohol que se genera en nuestro cuerpo en condiciones postmortem por diferentes razones que se relacionan con la flora bacteriana y diferentes reacciones bioquímicas que se presentan a nivel hepático (Amparo Arroyo, 2015). Estudios realizados demuestran que la concentración en sangre se puede encontrar en un rango que va desde 0 a 0,0003 g/L (Amparo Arroyo, 2015). Dicho rango puede variar según el método de medición un ejemplo de esto son la espectrofotometría de masas y la cromatografía de gases donde la concentración de etanol en se puede encontrar entre 0,00075 y 0,0016 g/L (Piazza, 2015).

En el intestino también se puede dar la producción de etanol debido a la fermentación bacteriana de carbohidratos y peptina. En determinados casos se puede presentar un sobrecrecimiento de bacterias coliformes y levaduras como *Cándida albicans* dichos microorganismos tienen la capacidad de producir una mayor concentración de etanol en la sangre (S, 2002). En las infecciones bacterianas la producción de alcohol puede aumentar exponencialmente conforme las bacterias se reproducen. Microorganismos como el *lactococcus garvieae* tienen la facultad de producir alcohol como derivado de sus rutas metabólicas. Estudios experimentales realizados por *Bivin* tomaron como materia de análisis cuatro especies de hongos: *candida albicans*, *candida tropicalis*, *torulopsis glabrata* y *Saccharomyces cerevisiae* los cuales fueron puestos en medios con sustratos ricos en azúcar. Los resultados expuestos indican que los niveles de alcohol en los medios incrementaron debido a la fermentación de la glucosa por las diferentes especies de hongos (Fernandez, 2015).

#### **2.2.2.3. Métodos analíticos en la investigación de alcohol y sus metabolitos secundarios.**

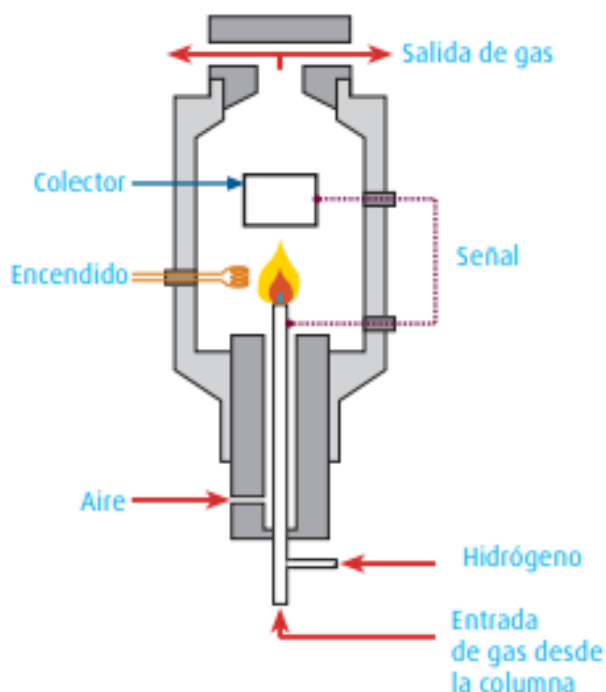
A lo largo del tiempo múltiples metodologías se han utilizado para cuali-cuantificar el alcohol que es consumido por el ser humano. Estas técnicas comprenden el uso

de diferentes matrices biológicas que constituye un tratamiento diferente a las muestras analizadas, se puede hablar del pelo, la saliva, la orina, la sangre, los testículos, la placenta y el aire expirado por los pulmones.

En la actualidad la técnica más utilizada es la cromatografía gaseosa con detector de ionización de llama acoplada a espaciado de cabeza o automuestreador de volátiles Head-Space (HS-GCFID), que realiza la separación basándose en la volatilidad de los componentes que se estudian, posee una jeringa de inyección que entrega una alícuota de vapor en el espacio de cabeza donde por medio de una fase móvil inerte gaseosa (nitrógeno o Helio) se da la separación de todos los componentes volátiles. Dicha separación permite transportar la muestra volatilizada hacia el detector donde posteriormente se dará la generación de un cromatograma. El muestreo que se hace por medio de HS es de gran importancia ya que evita que los residuos no volátiles de la muestra entren en el cromatografo de gases manteniendo estos en el vial que los contiene (Restek Corp, 2000). Por otro lado se debe tener en cuenta que generalmente la fase estacionaria puede estar hecha o constituida por metil polisiloxano o derivados de este mismo. Este es el método más apropiado y pertinente para la valoración de etanol en fluidos biológicos específicamente el plasma o la sangre ya que permite la separación de compuestos en función de su grado de volatilidad y es allí donde un compuesto como el etanol toma protagonismo (Miranda & Martin, 2014). Esta metodología es muy sensible y específica, permite obtener señales definidas y reproducibles a valores bajos de tiempos de retención cercanos a los 2 minutos presentando una buena separación del estándar y una aceptable resolución de las señales. (Ferrari, 2008) Además, también se podría realizar el análisis haciendo uso de cromatografía con inyección directa, pero se prefiere hacer uso de la HS-GC ya que esta tiene como ventaja el aprovechamiento de la volatilidad del alcohol por lo que no sería necesario realizar un procedimiento de extracción. Asimismo, este equipo posee un sistema de inyección de gas el cual tiene la capacidad de proteger la columna cromatográfica de componentes no volátiles en la matriz problema que se presenta cuando se hace inyección directa (Hao-Jung Chun, 2016).

La cromatografía de gases utiliza varios tipos de detectores, uno de ellos es el de ionización de llama, el cual usa diferentes gases como aire e hidrogeno con el fin de generar una llama que permite oxidar una gama variada de moléculas para generar partículas altamente cargadas (iones) que se recogen y se obtiene como resultado una señal eléctrica medible. El detector de ionización de llama tiene la capacidad de responder al número de átomos de carbono (en moléculas orgánicas) que entran en el detector por unidad de tiempo por ello se le puede considerar como sensible a la masa más que a la concentración (Linde, 2012).

**Figura 1 Esquema general de un detector FID**



### **Espectrometría de masas.**

El estudio de biomarcadores ha tomado un papel protagónico con el pasar de los años. Múltiples patologías han podido ser estudiadas y modeladas a partir del análisis de diferentes moléculas biológicas, además en el ámbito forense múltiples metabolitos son producidos a partir de diferentes drogas cuando estas son metabolizadas en nuestro organismo por lo que el estudio de estas moléculas secundarias se ha convertido en un método de verificación de diferentes resultados de carácter legal. Por lo anterior se necesitan técnicas analíticas de alta eficacia que permitan realizar una detección adecuada y precisa de estos biomarcadores, y es la espectrometría de masas la técnica que actualmente se emplea en la mayoría de los casos para realizar este tipo de análisis (Gomez & Gonzalez, S.F.).

La espectrometría de masas es una técnica analítica en la que los átomos o moléculas de una determinada muestra son ionizados para posteriormente ser separados por su relación masa/carga ( $m/z$ ) y por último ser detectado y registrados por un software determinado. Esta técnica presenta ciertas ventajas que permiten un análisis efectivo:

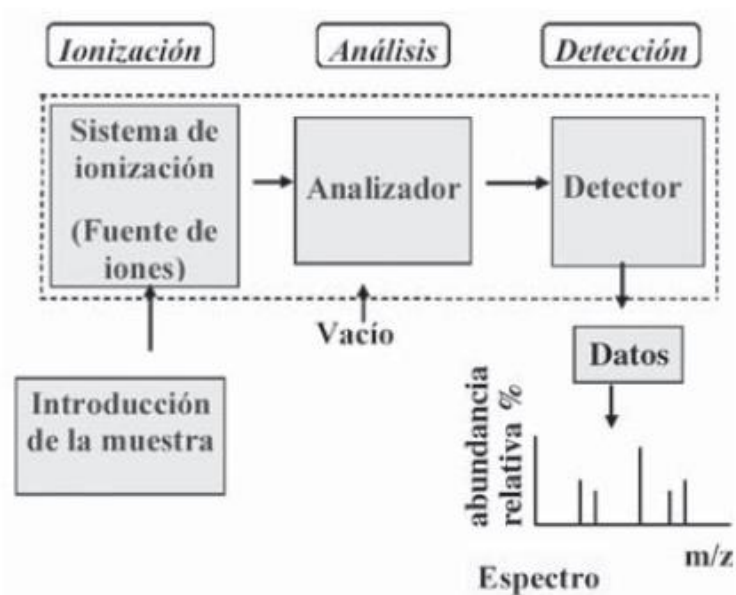
- Especificidad en la determinación del peso molecular

- Sensibilidad y exactitud ya que en teoría permite identificar una única molécula.
- Aplicabilidad a todo tipo de moléculas: volátiles, no volátiles, polares y apolares, sólidos, líquidos y gases.
- Permite la combinación adecuada con técnicas de separación que permiten el análisis de muestras complejas.

Los espectrómetros de masas poseen en su estructura elementos como:

- Sistema de introducción de la muestra
- Sistema de Ionización
- Analizador de masas
- Detector
- Sistema de adquisición y tratamiento de datos.

**Figura 2 Componentes de un espectrómetro de masas.**



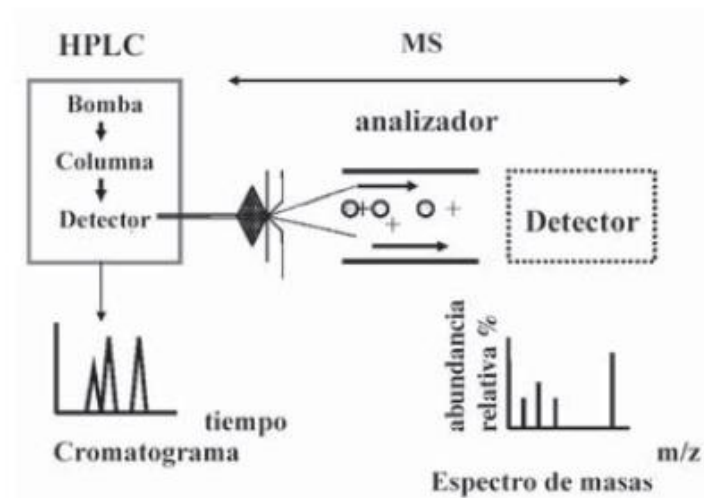
Como se observa en la figura 2, el resultado es un gráfico que representa la abundancia relativa en función de los iones producidos luego de la ionización y respecto de su relación masa/carga ( $m/z$ ). El ion molecular ( $M^+$ ) constituye la información más importante en el espectro de masas, ya que a partir de este se indican las fronteras dentro de las que se deben buscar los fragmentos de una molécula específica y que se detectan en su respectivo espectro de masas (Gomez & Gonzalez, S.F.).

A continuación se presentan los componentes mayormente utilizados en el análisis forense de metabolitos secundarios.

### Acoplamiento de la espectrometría de masas con técnicas de separación.

Existen mezclas complejas en las que técnicas de separación como la cromatografía de gases (GC) y la cromatografía líquida (HPLC) toman un papel protagónico en su respectivo análisis. Ahora por otro lado como se ha visto la espectrometría de masas proporciona análisis precisos y exactos cuando de muestras complejas se trata por lo tanto la combinación de estas dos técnicas puede conllevar a la optimización de un análisis determinado. Cuando se da la hibridación de estas dos técnicas se presentan ventajas ya que se consigue una metodología analítica en dos dimensiones, que permite realizar de una forma simultánea la separación y respectiva identificación (Gomez & Gonzalez, S.F.).

**Figura 3 Componentes de LC acoplada a un espectrómetro de masas.**

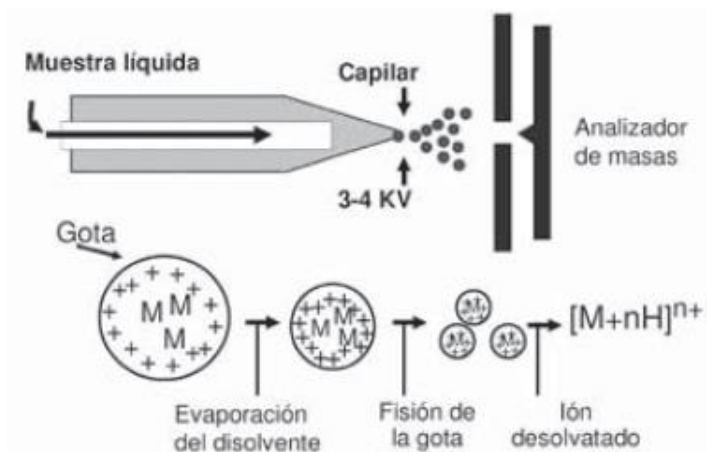


Es conocido que la cromatografía líquida trabaja con altas presiones, con temperatura ambiente generalmente y con caudales de fase móvil altos, en contraste el análisis de masas se realiza con alto vacío y temperaturas elevadas. Por lo anterior se ha hecho muy difícil el acople entre estas dos técnicas y se ha resuelto con el uso de fuentes de ionización en las que no se elimina de forma definitiva la fase móvil. Uno de estos sistemas de ionización es el electrospray en el que se pueden analizar diferentes compuestos no volátiles y termosensibles donde la ionización se realiza a temperatura ambiente y en contraste a este podemos encontrar la ionización química por presión atmosférica en la que se manejan temperaturas altas con el fin de generar fragmentos ionizados para el análisis de masas (Gomez & Gonzalez, S.F.).

### **ESI: Ionización por electrospray.**

Es un tipo de sistema de ionización en el que la ionización se realiza a presión atmosférica, en este caso la muestra se disuelve en un solvente que posteriormente se hace pasar a través de un capilar metálico por el cual se aplica constantemente un potencial de 3 a 4 KV. Como resultado se da la generación de una niebla de gotas con elevada carga, que al evaporarse el solvente que las transporta aumenta la densidad de las mismas produciéndose de esta forma la desorción en fase gaseosa (VILLA, 2003).

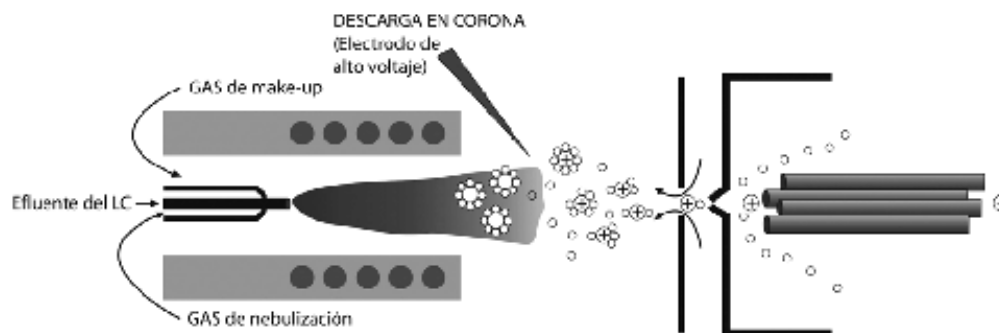
**Figura 4 Esquema de un sistema ESI.**



### **APCI: Ionización química por presión atmosférica.**

Esta es uno de los tipos de ionización que más uso tiene en la cromatografía líquida cuando esta se acopla a un detector de masas. Se debe destacar que en este caso la ionización realizada requiere de la capacidad del analito por volatilizarse cuando este se encuentra en el solvente el cual se encuentra en forma de spray. Se aplica una fuerte descarga eléctrica sobre el disolvente con lo que este se ioniza y posteriormente dichos iones formados tienen la capacidad de ionizar las moléculas del analito volatilizado (VILLA, 2003).

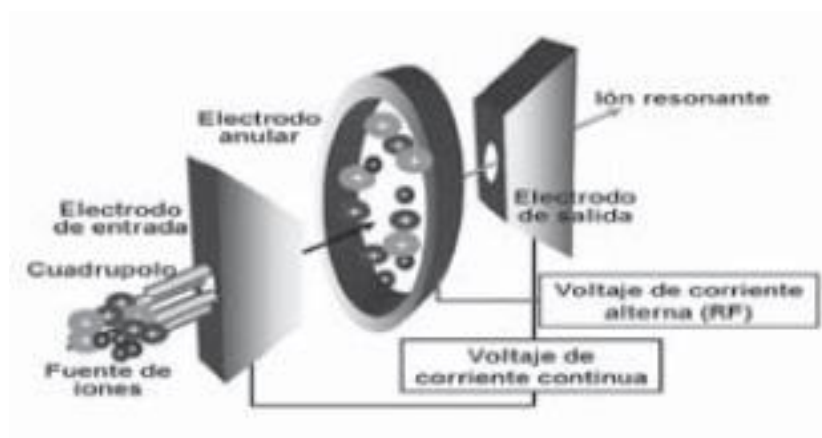
**Figura 5 Esquema de un sistema APCI**



**ATI: Analizador de trampa de iones.**

Este componente consta de un electrodo constituido por un anillo central y dos electrodos colectores. En este caso la separación de los iones analizados se da a través del almacenamiento de estos en el espacio central y manipulando su movimiento en el tiempo. Es importante destacar que el campo magnético se crea a partir de la aplicación de una serie de radiofrecuencias al anillo central y así los iones procedentes de la fuente de ionización atraviesan una rejilla que posee el electrodo colector. Posteriormente a partir de su relación  $m/z$  y el campo generado estos iones circulan hasta llegar al detector (VILLA, 2003).

**Figura 6 Esquema analizador de IT.**

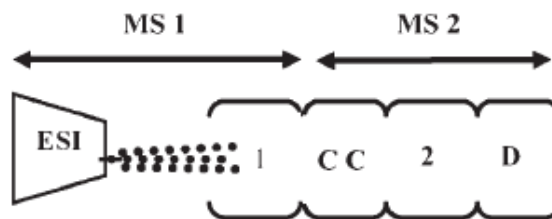




### ***MS/MS: Espectrometría de masas en tandem.***

Esta es una modalidad operacional de la espectrometría de masas muy utilizada en el análisis de mezclas complejas donde en muchas ocasiones no es posible identificar estructura haciendo uso solo de un espectrómetro. En este caso lo que ocurre es el acoplamiento de dos espectrómetros que generalmente están unidos mediante una cámara en la cual se da la fragmentación continua de las moléculas analizadas (Gomez & Gonzalez, S.F.).

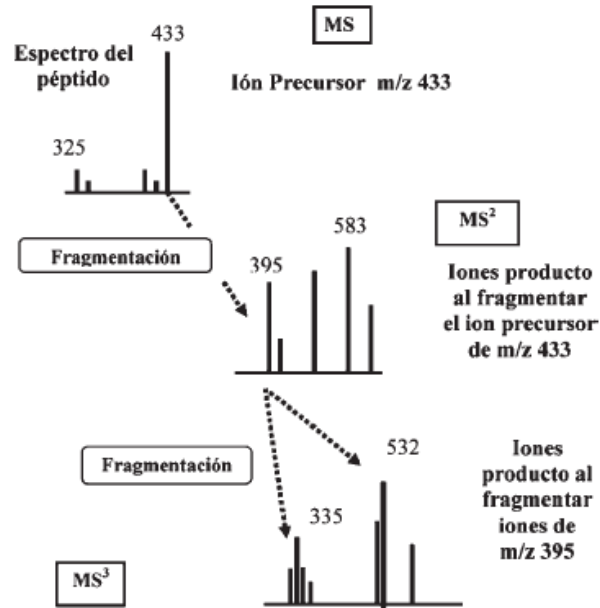
**Figura 7 Esquema de espectrómetros MS/MS**



Los análisis que se realizan mediante esta modalidad siguen generalmente la siguiente secuencia:

- a. El primer espectrómetro funciona como seleccionador de un ion específico entre los iones que se producen en el sistema de ionización. Se da la generación de un espectro de masas referente a la sustancia analizada, es allí donde se selecciona un ion correspondiente a una  $m/z$  que se conoce como ion precursor (Gomez & Gonzalez, S.F.).
- b. El ion precursor es introducido en una cámara de colisión, que contiene un gas que colisiona con los iones generados a partir de la generación de un potencial eléctrico que eleva la energía cinética de los iones. Al chocar con las moléculas de gas estos iones transforman parte de su energía cinética en energía interna con lo que se provoca la fragmentación de estos mismos generando nuevos iones que entran en el segundo espectrómetro de masas donde son analizados para generar un nuevo espectro de masas (Gomez & Gonzalez, S.F.).

**Figura 8 Espectro de MS/MS**



#### **2.2.2.4. Efecto depresor sobre el sistema nervioso central.**

El alcohol afecta el sistema nervioso a través de diferentes neurotransmisores, los mecanismos por los cuales se da el efecto fisiológico cuando este ingresa al organismo comprenden tanto sistemas excitatorios como inhibitorios. Las concentraciones en sangre de este compuesto pueden dar información acerca de la tasa de ingesta, el grado de intolerancia y los efectos clínicos que se pueden observar en un sujeto, donde la intoxicación extrema se presenta cuando se tiene una concentración de 300mg/ 100 mL causando somnolencia, coma, disminución de los reflejos tendinosos, hipotensión, hipotermia, respiración lenta llegando a la muerte si se presentan concentraciones de alcohol en sangre equivalentes a 400 mg/mL (C McIntosh, 2004).

El alcohol es un compuesto de carácter lipófilo capaz de disolverse en membranas, tiene la capacidad de inhibir el transporte activo de sodio, potasio, aminoácidos y catecolaminas. Este es un inhibidor no selectivo del sistema nervioso central cuya acción se da potenciando el efecto del ácido gamma aminobutírico (GABA) además de inhibir el receptor NMDA de aspartato-glutamato reduciendo de esta forma la actividad glutamatergica ocasionando un efecto depresor general del sistema nervioso central. Los efectos fisiológicos visibles generados a raíz de lo dicho anteriormente están relacionados con: disminución del autocontrol y autocrítica, reducción de la visión, disminución de la coordinación

motora, alteración de los reflejos, disminución de la sensación de fatiga hasta la disminución del umbral convulsivo que se ve potenciado con el uso de fármacos depresores centrales que se caracterizan por tener un efecto hipnótico y relajante que pueden conllevar al estado de coma o a una depresión respiratoria severa (Martin, 2014).

## **2.3. OBJETIVOS.**

### **2.3.1. OBJETIVO GENERAL.**

Determinar la presencia de etilsulfato y etilglucurónido, en muestras post-mortem de sangre y orina de humanos como marcadores toxicológicos de consumo de alcohol.

### **2.3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS.**

1. Evaluar la ionización química a presión Atmosférica (APCI) como una alternativa potencial a la ionización por electrospray (ESI) en el laboratorio de toxicología de la regional Suroccidente.
2. Estandarizar el análisis de etilsulfato y etilglucurónido por cromatografía líquida con detector selectivo de masas en tándem en el laboratorio de toxicología de la regional Suroccidente.
3. Determinar la relación entre la presencia de etilglucoronido y etilsulfato con el consumo reciente de alcohol para la optimización de la prueba de alcoholemia.

## **2.4. METODOLOGIA.**

**Unidad de observación:** Muestras de sangre total y orina de cadáveres.

**Tipo o diseño de estudio:** Descriptivo y prospectivo

**Universo:** Casos forenses post mortem donde se obtienen resultados positivos de alcoholemia y aquellos que se sospecha no hubo consumo de alcohol pero dan resultado de alcoholemia positivo.

**Definición y medición de variables Independientes:** Tiempo de recogida de muestra, etiología de muerte, edad, género.

**Definición y medición de variables Dependientes:** Consumo de alcohol premortem, resultado de alcoholemia, presencia o ausencia de los marcadores de estudio.

**Definición y medición de variables Independientes:** Tiempo de muerte, modo y manera de muerte, edad, género, etnia, patologías previas

**Muestra:** Para la selección de las muestras se tendrán en cuenta los casos forenses a saber:

- **Grupo 1. (Control):** Casos forenses en los que se documenta la ausencia de bebidas embriagantes o el consumo de sustancias que contengan alcohol.
- **Grupo 2:** Casos forenses donde se documenta el consumo de bebidas embriagantes u otros productos que contengan etanol.
- **Grupo 3:** Casos forenses donde el resultado de alcoholemia sea positivo pero no se tenga documentado el consumo de alcohol o se sospeche de que no se haya consumido alcohol.

El desarrollo experimental de esta propuesta de proyecto comprendió 3 etapas principales; la primera consistió en la recolección de muestras en la morgue del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses en la ciudad de Cali. La segunda consistió en determinar la presencia de etanol en las muestras por medio de cromatografía gaseosa con detector de ionización de llama acoplada a Head-Space o automuestreador de volátiles (HS-GCFID), y por ultimo una tercera etapa que comprendió la determinación de las condiciones específicas que permiten establecer la presencia o ausencia de los metabolitos en las muestras de sangre y orina usando un equipo cromatografía liquida acoplada a un espectrómetro de masas con analizador de trampa de iones (IT-MS/LC). Es importante resaltar que el tratamiento de las muestras se realizó de acuerdo con los lineamientos establecidos en el PROCEDIMIENTO ESTANDARIZADO DE TRABAJO (PET 111): *Identificación y confirmación de sustancias de interés forense en muestras biológicas y no biológicas por GC-MS o LC-MS/MS* empleando un equipo de cromatografía de gases con detector de ionización de llama (HS-GCFID) y uno de cromatografía liquida acoplada a un espectrómetro de masas con analizador de trampa de iones (IT-MS/LC).

#### **2.4.1. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS.**

El estudio experimental conto con la aprobación del comité de ética del Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses de la Ciudad de Cali, además

también se contó con la aprobación del comité científico de la universidad Icesi, cumpliéndose con todas las disposiciones y la normativa vigente referente al manejo de muestras de cadáveres judiciales. Por otro lado se otorgó un código a cada muestra con el fin de mantener la confidencialidad y el anonimato de los occisos.

Se analizaron las recomendaciones realizadas por los médicos forenses del instituto con las cuales se determinaron los criterios de inclusión y exclusión de las muestras en el estudio experimental, se presentan a continuación:

**Criterios de inclusión:**

- ✓ Casos donde se documente o se sospeche consumo de alcohol, se corrobore con alcoholemia positiva y el tiempo de muerte sea menor a 12 horas.
- ✓ Casos con alcoholemia positiva pero sin consumo de alcohol documentado o que las circunstancias indiquen ausencia de alcohol con tiempo de muerte superior a 12 horas.
- ✓ Casos sin consumo de alcohol y alcoholemia negativa con tiempo de muerte inferior a 12 horas.

**Criterios de exclusión:**

- ✓ Cadáveres en alto estado de descomposición.
- ✓ Cadáveres que hayan recibido tratamiento clínico pre mortem.

Se recolectaron 52 muestras de sangre, las cuales fueron guardadas en tubos vacutainer tapa gris que contenían preservante y anticoagulante solución CPD (citrato, fosfato y dextrosa). Por otro lado también se recolectaron 52 muestras de orina en recipientes estériles de 50 mL. Después de realizarse la recolección las muestras fueron rotuladas con un código y se almacenaron bajo congelación hasta su respectivo procesamiento. Todo esto fue realizado bajo la dirección y supervisión del médico forense y sus asistentes.

**2.4.2. DETERMINACION DE ALCOHOLEMIA.**

La determinación de la presencia de etanol se realizó en las 52 muestras de sangre recogidas y almacenadas. Cada una de estas muestras fue servida y montada en el equipo por duplicado para su respectivo análisis. Cabe resaltar que para dicho análisis se hizo uso de una curva de calibración para la alcoholemia

preparada previamente por los analistas del laboratorio de medicina legal cali y cuyos parámetros se presentan a continuación.

### **Protocolo analítico.**

Para realizar la detección cualitativa de etanol en sangre se hizo uso del siguiente protocolo analítico:

### **Instrumento analítico.**

Durante el desarrollo del proyecto se utilizó un cromatografo de gases con un detector de ionización de llama y acoplado a un auto-muestreador de espacio en cabeza (HS – GC – FID), este equipo tiene las siguientes características:

- ✓ Cromatógrafo de gases con un con un detector de ionización de llama HP 6890 series GC/FID.
- ✓ Auto-muestreador de espacio en cabeza thermo triplus
- ✓ Columna cromatográfica HP Blood Alcohol Analisis Column 7.5 meter x 0,320 mm ID (HP part number 19091 S-510)
- ✓ Aire con 20,9% de O2 de Carburos Metálicos© como comburente para el detector.
- ✓ Hidrógeno al 99,9992% de pureza de Carburos Metálicos© como combustible para el detector.
- ✓ Nitrógeno al 99,9992% de pureza de Carburos Metálicos© como gas portador o fase móvil.

Para realizar el análisis de cada muestra de sangre se determinaron las condiciones adecuadas y el método a utilizar. A continuación se detallan:

**Tabla 1 Parámetros analíticos del cromatografo de gases con un detector de ionización de llama acoplado a un automuestreador de volátiles o Headspace**

| <b>HS-GC-FID</b>       |                  |
|------------------------|------------------|
| <b>Entrada Trasera</b> |                  |
| Modo:                  | Dividido (Split) |
| Temperatura Inicial    | 150 °C           |
| Presión                | 0,50 psi         |
| Proporción de División | 5:1              |
| Flujo Dividido         | 1,1 mL/min       |

|                        |                             |
|------------------------|-----------------------------|
| Flujo Total            | 2,6 mL/min                  |
| Tipo de Gas            | 1,20 min                    |
| <b>Columna 2</b>       |                             |
| Modelo Numero          | AGILENT 19091s-510 HP-B ALC |
| Temperatura Máxima     | 270 °C                      |
| Longitud               | 7,5 m                       |
| Diámetro               | 320,00 um                   |
| Espesor de la película | 20,00 um                    |
| Modo:                  | Flujo constante             |
| Flujo Inicial          | 0,2 mL/min                  |
| Presión Inicial        | 0,50 psi                    |
| Velocidad Promedio     | 6 cm/s                      |
| Entrada                | Back Inlet                  |
| Salida                 | Back detector               |
| Presión Salida         | Ambiente                    |
| <b>Detector FID</b>    |                             |
| Temperatura            | 150 °C                      |
| Flujo de Hidrogeno     | 40,0 mL/min                 |
| Flujo Aire             | 450,0 mL/min                |
| Modo                   | Flujo constante             |
| Flujo de ajuste        | 45,0 mL/min                 |
| Tipo de gas            | Nitrógeno                   |
| Llama                  | Apagado                     |

|                                |             |
|--------------------------------|-------------|
| Electrómetro                   | Apagado     |
| Flujo de ajuste                | 45,0 mL/min |
| <b>Automuestreador Triplus</b> |             |
| Temperatura Incubación         | 60 °C       |
| Tiempo de Incubación           | 10 min      |
| Temperatura de la Jeringa      | 90 °C       |

Es importante destacar que el método utilizado se encuentra validado y certificado por la norma ISO/IEC 17025 de 2015 que habla del estándar de calidad mundial para los laboratorios de ensayo y calibraciones.

#### **Preparación de soluciones estándares.**

Antes de realizar el respectivo análisis de las muestras se prepararon diferentes soluciones, que se utilizaron como muestras controles. Dichas muestras fueron preparadas a partir de estándares que posteriormente fueron utilizadas para realizar una curva de calibración. Las disoluciones estándares usadas fueron:

- ✓ Etanol Restek Lote: 075932
- ✓ N-propanol Restek Lote: 089032

#### ***Solución stock de Etanol.***

Se pesaron 10 g de etanol R.A. y se aforo con 100 mL de agua destilada, se homogenizo y se rotulo respectivamente (10.000 mg/100mL).

#### ***Solución de estándar interno.***

Se pesó una cantidad de 8 g de n-propanol R.A., y se llevó a un volumen de 8 litros de agua destilada, posteriormente se homogenizo la solución.

#### ***Muestras Control.***

A partir de las soluciones stock se preparan los controles bajo, medio y alto para etanol de acuerdo al protocolo PREPARACION DE SOLUCIONES STOCK PARA LOS CONTROLES Y PREPARACION DE CONTROLES PET 02. Se prepararon 4 controles bajo los siguientes parámetros:

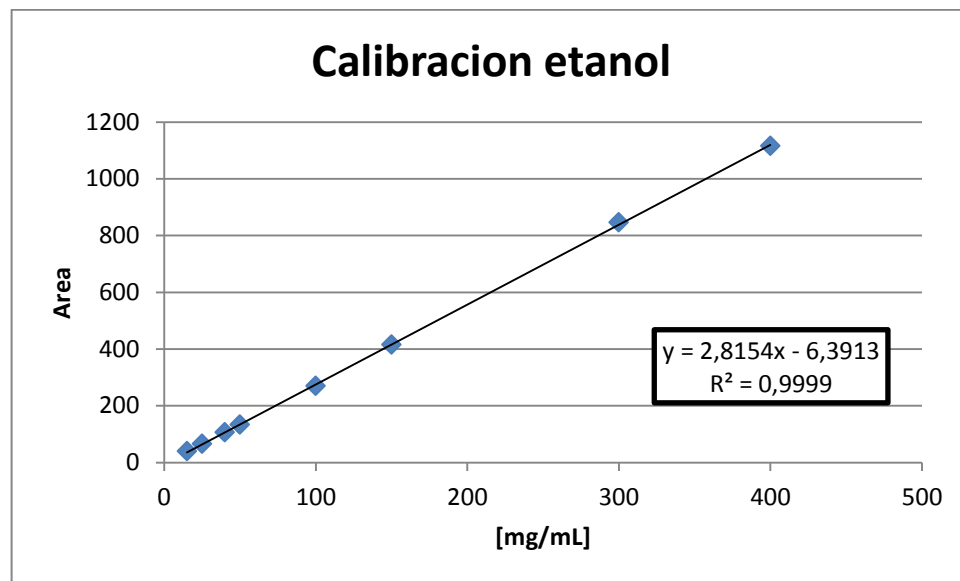


- ✓ **Control 1:** 40 mg/100 mL etanol. Se tomaron 0,4 mL de la solución stock de etanol y se aforo a 100 mL con agua destilada, posteriormente se homogenizo.
- ✓ **Control 2:** 100 mg/100 mL etanol. Se tomaron 1 mL de la solución stock de etanol y se aforo a 100 mL con agua destilada, posteriormente se homogenizo.
- ✓ **Control 3:** 150 mg/100 mL etanol. Se tomaron 1,5 mL de la solución stock de etanol y se aforo a 100 mL con agua destilada, posteriormente se homogenizo.
- ✓ **Control 4:** 300 mg/100 mL etanol. Se tomaron 3,0 mL de la solución stock de etanol y se aforo a 100 mL con agua destilada, posteriormente se homogenizo.

Para la curva de calibración se utilizaron estándares certificados donde se tomó el volumen necesario de la solución madre de etanol para preparar soluciones de concentración [15 mg/100mL], [25 mg/100mL], [40 mg/100mL], [50 mg/100mL], [100 mg/100mL], [150mg/100mL], [300mg/100mL], [400 mg/100mL]. A continuación los datos referentes a la curva de calibración.

**Tabla 2 Relación de la señal cromatográfica y la concentración de etanol con la respectiva señal de estándar interno**

| Nivel | [mg/100mL] | Área    | Área n-propanol |
|-------|------------|---------|-----------------|
| 1     | 15         | 39,00   | 306,68          |
| 2     | 25         | 65,47   | 306,71          |
| 3     | 40         | 105,52  | 297,34          |
| 4     | 50         | 132,90  | 303,53          |
| 5     | 100        | 269,43  | 301,68          |
| 6     | 150        | 415,63  | 301,73          |
| 7     | 300        | 846,10  | 301,35          |
| 8     | 400        | 1115,44 | 304,69          |



**Figura 9. Recta de calibración de etanol.**

Como se observa en la figura 9 se puede observar que existe linealidad entre las variables área y concentración ya que se obtuvo un  $R^2 = 0,9999$ , además también se puede ver que la recta está compuesta por más de 3 puntos lo que hace válido su uso para la determinación de etanol en las muestras de sangre.

### **Muestras de análisis.**

Las muestras almacenadas en un principio se aclimataron a temperatura ambiente durante 2 horas. Una vez descongeladas las muestras se sirvieron en viales para GC-HS-FID y se montaron en el equipo. El proceso se repitió para cada una de las muestras de sangre recolectadas, además la detección de etanol en las muestras se realizó a partir de la curva de calibración mostrada en la figura 9.

### **2.4.3. DETERMINACION DE ETILGLUCORONIDO Y ETILSULFATO.**

Se proyectó analizar las 52 muestras de sangre y orina previa estandarización de las condiciones del método en el sistema LC-MS/MS. Inicialmente se realizaron ensayos preliminares que permitieron adaptar un protocolo analítico para la determinación cualitativa de ambos metabolitos estudiados en sangre y orina. Estos ensayos fueron realizados a partir de una revisión bibliográfica de la cual se extrajeron las condiciones cromatográficas utilizadas para el sistema LC-MS/MS durante el estudio. Se compararon las siguientes técnicas analíticas:

- ✓ (Rainio, 2008) para la identificación de consumo de etanol crónico con nuevos biomarcadores.
- ✓ (Crunelle, 2014) para evaluar la dependencia de etanol a partir del análisis de ETG en matrices biológicas

- ✓ La técnica de (Wurst, 1999), para la determinación de EtG en fluidos biológicos y tejidos post mórtem.
- ✓ La técnica de (Wurst, 2000), para la determinación de EtG en orina.

### **Protocolo analítico.**

### **Instrumento analítico.**

Durante el desarrollo del proyecto se utilizó un cromatografo líquido acoplado a un espectrómetro de masas en tandem con ionización química por presión atmosférica (LC-APCI-MS/MS), este equipo tiene las siguientes características:

- ✓ Cromatógrafo líquido Hitachi LaChrom Elite System
- ✓ Auto-muestreador L-2200
- ✓ Columna cromatográfica Thermo Scientific Hypersil Gold PFP C18 con tamaño de partícula 5 micras.
- ✓ Espectrómetro de masas Bruker Amazon SL series con ionización química por presión atmosférica con trampa de iones.

A continuación se presenta el protocolo empleado para el análisis de las muestras, este incluye la condiciones analíticas para el uso del LC-MS/MS, la preparación de muestras controles y los análisis finales de todas las muestras de sangre y orina.

### **Condiciones Analíticas del LC-MS/MS.**

Inicialmente antes de utilizar el equipo de LC-MS/MS, se realizó la preparación de la fase móvil y posteriormente se fijaron los parámetros instrumentales como se muestra a continuación:

**Tabla 3 Parámetros para el cromatografo liquido**

| <b>CROMATOGRAFO LIQUIDO</b> |                              |
|-----------------------------|------------------------------|
| Presión máxima de la bomba  | 4.00 bar                     |
| Temperatura de la Columna   | 35 °C                        |
| Volumen de inyección        | 0,001 mL                     |
| Fase móvil A                | Acetato amonio 10mmol/L pH 8 |
| Temperatura automuestreador | 15 °C                        |
| Flujo                       | 0,8 mL/min                   |
| Tiempo total de análisis    | 5 min                        |

**Tabla 4 Parámetros para el espectrómetro de masas en tandem**

| <b>ESPECTROMETRO DE MASAS EN TANDEM</b> |           |
|---|-----------|
| Tipo de escaneado                       | MRM       |
| Duración del escaneado                  | 75 ms     |
| Periodos por escaneados                 | 5 min     |
| Polaridad                               | Negativa  |
| Fuente de Ion                           | APCI      |
| Temperatura                             | 450 °C    |
| Flujo de N <sub>2</sub>                 | 2,07 bar  |
| Flujo de gas                            | 5,0 l/min |
| Temperatura Vaporización                | 500 °C    |

#### **Disoluciones estándares.**

Las disoluciones de estándares para la determinación cualitativa de etilglucoronido y etilsulfato se prepararon en el laboratorio del instituto de Medicina Legal y Ciencias Forenses de la ciudad de Cali. Según el siguiente proceso:

- ✓ Se prepararon dos soluciones, etilglucoronido y etilsulfato a partir de estándares certificados marca cerillant. Se tomó 1 mL de ambos estándares de ampollas de 1 mg/mL y se llevó a un balón de 100 mL, para obtener dos soluciones de 0,0100 mg/mL. Posteriormente se aforo con metanol grado HPLC, se filtró con poro de 45 micras y se homogenizo.

#### **Muestra para calibración.**

Con el fin de determinar el límite de detección del espectrómetro de masas en tandem (MS/MS) se preparó un pool de soluciones blanco a partir de las disoluciones de los estándares de referencia las cuales fueron inyectadas directamente al espectrómetro de masas haciendo uso de una bomba de jeringa,

se utilizó metanol grado HPLC como solvente y el análisis se realizó mediante el modo MRM (monitorización de reacción múltiple), además también se pasaron dichas muestras a través del equipo de cromatografía líquida con el fin de evaluar el funcionamiento de este. A continuación se presentan las concentraciones usadas:

**Tabla 5 Concentraciones de calibración cualitativa de etilglucoronido y etilsulfato**

|              | Etilglucoronido (ng/mL) | Etilsulfato (ng/mL) |
|--------------|-------------------------|---------------------|
| Calibrador 1 | 100                     | 100                 |
| Calibrador 2 | 200                     | 200                 |
| Calibrador 3 | 1000                    | 1000                |
| Calibrador 4 | 2500                    | 2500                |
| Calibrador 5 | 5000                    | 5000                |
| Calibrador 6 | 7500                    | 7500                |
| Calibrador 7 | 10000                   | 10000               |

#### **Tratamiento de muestras.**

#### **Extracción de metabolitos.**

Antes de iniciar el análisis de las muestras de sangre y orina estas fueron descongeladas hasta alcanzar temperatura ambiente. Posteriormente fueron sometidas al siguiente protocolo:

#### **Sangre.**

- ✓ Con Micropipetas previamente calibradas y certificadas se tomaron 0,2 mL de sangre y 0,6 mL de acetonitrilo grado LC-MS (1:3) los cuales fueron mezclados en copillas de 1 mL.
- ✓ Esta mezcla se llevó al vortex por un minuto.
- ✓ Posterior al vortex la muestra fue centrifugada a 4500 RPM por 20 minutos. Este procedimiento se repitió para las 52 muestras de sangre.
- ✓ Se tomó el sobrenadante con la ayuda de Micropipetas y se puso en viales de 1.0 mL para LC-MS/MS.

### **Orina.**

- ✓ Con Micropipetas previamente calibradas y certificadas se tomaron 0,2 mL de sangre y 0,6 mL de acetonitrilo grado LC-MS (1:3) los cuales fueron mezclados en copillas de 1 mL.
- ✓ Esta mezcla se llevó al vortex por un minuto.
- ✓ Posterior al vortex la muestra fue centrifugada a 4500 RPM por 12 minutos. Este procedimiento se repitió para las 52 muestras de orina.
- ✓ Se tomó el sobrenadante con la ayuda de Micropipetas y se puso en viales de 1.0 mL para LC-MS/MS.

### **Detección cualitativa de etilglucoronido y etilsulfato.**

El análisis cualitativo de los metabolitos estudiados no se realizó en la muestras de sangre y orina debido a que no se logró realizar la determinación de estos mismos en las muestras de calibración.

### **3. RESULTADOS.**

A continuación se presentan los resultados obtenidos a partir de la revisión de las historias de deceso de los sujetos estudiados.

**Tabla 6 Casos positivos analizados distribuidos según etiología de muerte**

| Etiología de muerte |           |               |         |          |
|---------------------|-----------|---------------|---------|----------|
| Accidente transito  | Homicidio | Indeterminada | Natural | Suicidio |
| 3 casos             | 21 casos  | 1 casos       | 0 casos | 1 casos  |
| 12%                 | 81%       | 4%            | 0%      | 4%       |

**Tabla 7 Casos positivos analizados distribuidos según tiempo de toma de muestra**

| Tiempo de Toma de muestra |           |            |            |
|---------------------------|-----------|------------|------------|
| < 6 horas                 | 6-8 horas | 9-12 horas | > 12 horas |
| 2 casos                   | 8 casos   | 15 casos   | 0 casos    |

|    |     |     |   |
|----|-----|-----|---|
| 8% | 31% | 58% | 0 |
|----|-----|-----|---|

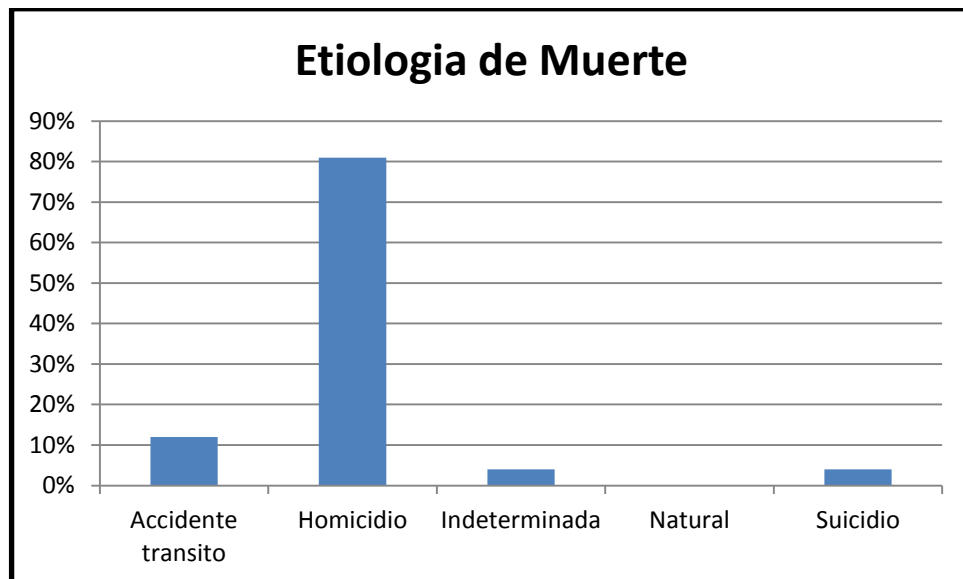
**Tabla 8 Casos positivos analizados distribuidos según el sexo de los sujetos**

| Sexo   |       |
|--------|-------|
| Hombre | Mujer |
| 22     | 4     |
| 85%    | 15%   |

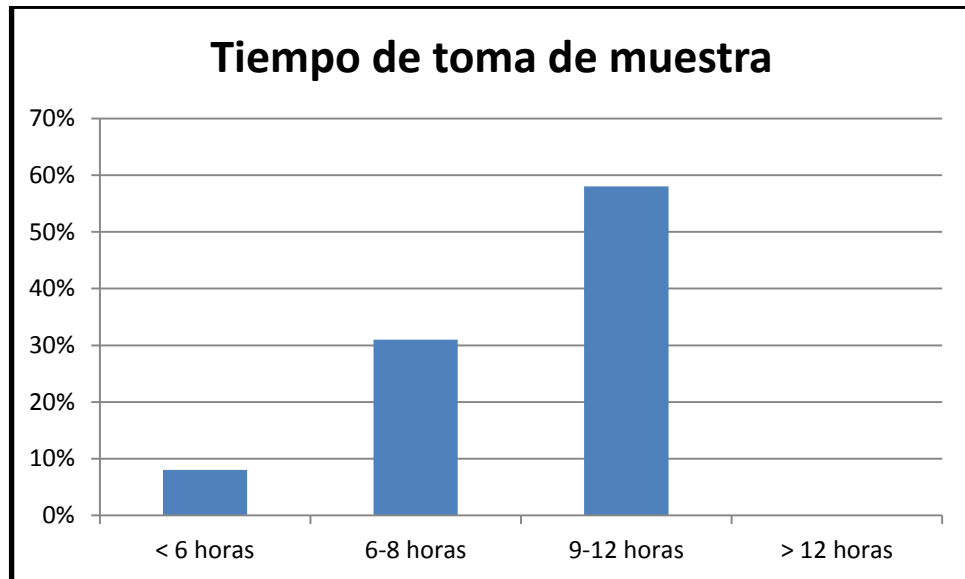
**Tabla 9 Casos positivos analizados distribuidos según la edad de los sujetos**

| Edad (años) |          |         |         |         |         |
|-------------|----------|---------|---------|---------|---------|
| <18         | 18-30    | 31-40   | 41-50   | 51-60   | 61-70   |
| 0 casos     | 12 casos | 4 casos | 6 casos | 0 casos | 4 casos |
| 0%          | 47%      | 15%     | 23%     | 0%      | 15%     |

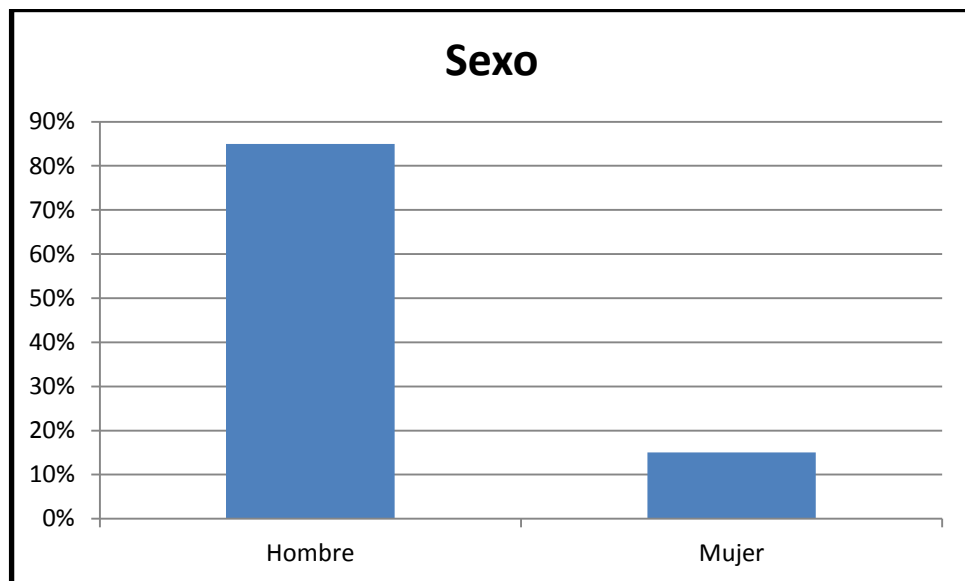
**Grafico 1 Diagrama de barras para etiología de muerte**



**Grafico 2 Diagrama de barras para Tiempo de toma de muestra**

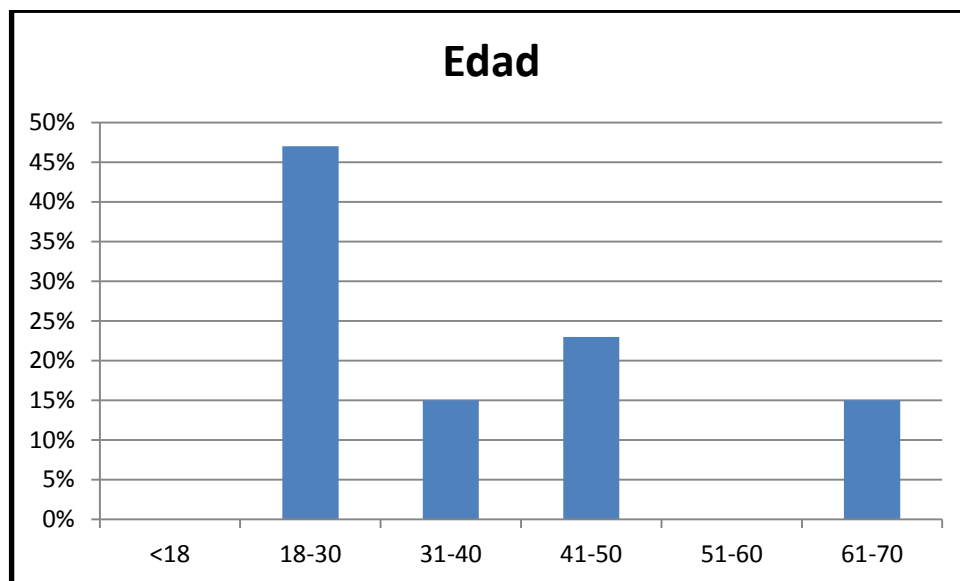


**Grafico 3 Diagrama de barras para distribución de sexo de los sujetos.**





**Grafico 4 Diagrama de barras para Edad.**



#### **DETERMINACION DE ALCOHOLEMIA.**

Una vez se guardaron las muestras y se ordenaron los datos de estas, se procedió a la determinación de la alcoholemia en sangre por medio del equipo de HS-GC-FID. A continuación se presentan los resultados:

#### **Determinación de alcoholemia.**

A continuación se presentan los resultados obtenidos para la determinación de la alcoholemia en las muestras analizadas.

**Tabla 10 alcoholemia en muestras de sangre analizadas por medio de cromatografía de gases acoplada a un detector de Ionización de llama.**

| No CASO | cualitativo | mgEtOH/100mL | No CASO | cualitativo | mgEtOH/100mL |
|---------|-------------|--------------|---------|-------------|--------------|
| 1       | positivo    | 1526,34      | 27      | positivo    | 86,52        |
| 2       | negativo    | 0            | 28      | negativo    | 0            |
| 3       | negativo    | 0            | 29      | negativo    | 0            |
| 4       | positivo    | 112,44       | 30      | negativo    | 0            |
| 5       | negativo    | 0            | 31      | negativo    | 0            |
| 6       | negativo    | 0            | 32      | negativo    | 0            |
| 7       | negativo    | 0            | 33      | negativo    | 0            |
| 8       | positivo    | 4,655        | 34      | positivo    | 9,02         |

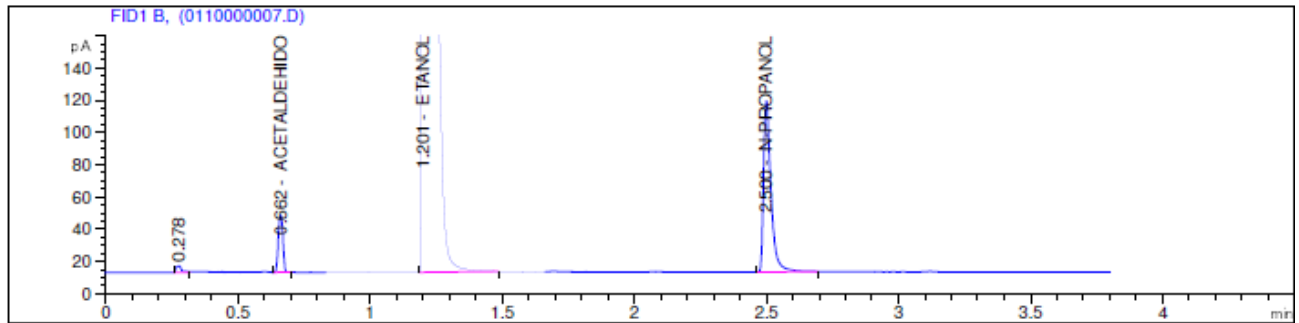
|    |          |         |    |          |        |
|----|----------|---------|----|----------|--------|
| 9  | positivo | 164,655 | 35 | positivo | 14     |
| 19 | positivo | 26,89   | 36 | negativo | 0      |
| 11 | negativo | 0       | 37 | positivo | 7,77   |
| 12 | positivo | 6,3     | 38 | negativo | 0      |
| 13 | negativo | 0       | 39 | negativo | 0      |
| 14 | positivo | 89,84   | 40 | positivo | 331,57 |
| 15 | positivo | 13,56   | 41 | negativo | 0      |
| 16 | positivo | 13,05   | 42 | negativo | 0      |
| 17 | negativo | 0       | 43 | positivo | 16,35  |
| 18 | negativo | 0       | 44 | negativo | 0      |
| 19 | positivo | 0       | 45 | negativo | 0      |
| 20 | positivo | 0       | 46 | negativo | 0      |
| 21 | positivo | 187,36  | 47 | positivo | 38,78  |
| 22 | negativo | 0       | 48 | positivo | 155    |
| 23 | negativo | 0       | 49 | positivo | 5,15   |
| 24 | positivo | 27,99   | 50 | positivo | 117,65 |
| 25 | positivo | 84,15   | 51 | positivo | 97,9   |
| 26 | positivo | 225,99  | 52 | negativo | 0      |

**Tabla 11 correlación de la alcoholemia con el consumo de etanol según antecedentes**

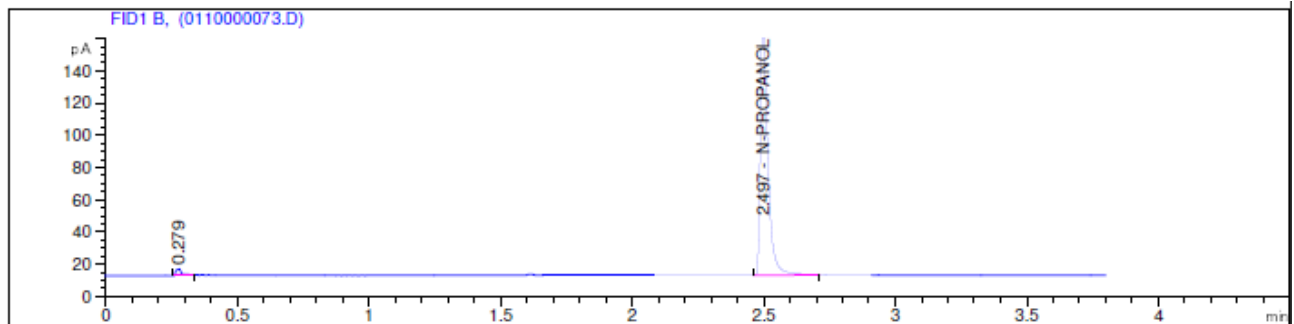
| <b>No CASO</b> | <b>mg EtOH/100mL</b> | <b>Consumo EtOH antes de deceso</b> | <b>No CASO</b> | <b>mg EtOH/100mL</b> | <b>Consumo EtOH antes de deceso</b> |
|----------------|----------------------|-------------------------------------|----------------|----------------------|-------------------------------------|
| 1              | 1526,34              | Consumo                             | 27             | 86,52                | no reporta                          |
| 2              | 0                    | no consumo                          | 28             | 0                    | no consumo                          |
| 3              | 0                    | no consumo                          | 29             | 0                    | no consumo                          |
| 4              | 112,44               | Consumo                             | 30             | 0                    | Consumo                             |
| 5              | 0                    | no consumo                          | 31             | 0                    | no consumo                          |
| 6              | 0                    | no consumo                          | 32             | 0                    | no consumo                          |
| 7              | 0                    | no consumo                          | 33             | 0                    | no consumo                          |
| 8              | 4,655                | no consumo                          | 34             | 9,02                 | no consumo                          |

|    |         |            |    |        |            |
|----|---------|------------|----|--------|------------|
| 9  | 164,655 | no reporta | 35 | 14     | no reporta |
| 19 | 26,89   | Consumo    | 36 | 0      | no consumo |
| 11 | 0       | no consumo | 37 | 7,77   | no reporta |
| 12 | 6,3     | no consumo | 38 | 0      | no consumo |
| 13 | 0       | no consumo | 39 | 0      | no consumo |
| 14 | 89,84   | Consumo    | 40 | 331,57 | Consumo    |
| 15 | 13,56   | no reporta | 41 | 0      | no reporta |
| 16 | 13,05   | no reporta | 42 | 0      | no reporta |
| 17 | 0       | no consumo | 43 | 16,35  | Consumo    |
| 18 | 0       | no consumo | 44 | 0      | no consumo |
| 19 | 0       | no consumo | 45 | 0      | no consumo |
| 20 | 0       | no consumo | 46 | 0      | no consumo |
| 21 | 187,36  | Consumo    | 47 | 38,78  | Consumo    |
| 22 | 0       | no consumo | 48 | 155    | no consumo |
| 23 | 0       | no consumo | 49 | 5,15   | no consumo |
| 24 | 27,99   | no reporta | 50 | 117,65 | Consumo    |
| 25 | 84,15   | Consumo    | 51 | 97,9   | Consumo    |
| 26 | 225,99  | Consumo    | 52 | 0      | no consumo |

**Imagen 4 Cromatograma de Resultado positivo para alcoholemia en el caso 1**



**Imagen 5 Cromatograma de Resultado negativo para alcoholemia en el caso 2.**



De la tabla número 10 se puede observar que se obtuvieron 24 resultados positivos y 28 resultados negativos para alcoholemia en las 52 muestras analizadas por medio de MS-GC.

### **Determinación de Etilglucoronido y Etilsulfato.**

Es importante tener cuenta que por el momento bajo las condiciones utilizadas en el Cromatógrafo líquida y en el detector de masas con ionización química por presión atmosférica no se logró determinar la presencia o ausencia de las moléculas objetivo. Cabe destacar que la fase final del proyecto se realizara en un futuro y que los resultados se presentan de acuerdo a los avances permitidos por el daño de la fuente de ionización por electrospray.

#### 4. DISCUSION.

En el mundo forense cada día se avanza más en la construcción de técnicas analíticas y nuevos métodos que permiten obtener resultados exactos y precisos con el fin de generar respuestas judiciales concretas y sin vacíos que pueden ser aprovechados por mentes maliciosas. Múltiples son las técnicas que se utilizan en las diferentes regionales de medicina legal en el país, cromatografía líquida y de gases, espectrometría de masas, espectrometría de infrarrojo, entre otras las cuales permiten determinar la presencia y/o cuantificar la cantidad de muchos marcadores bioquímicos que se producen en nuestro organismo cuando se consumen drogas de abuso como la cocaína u otro tipo de sustancias como el etanol.

Una de las técnicas más utilizadas para determinación de etanol en sangre es la cromatografía de gases con detector de ionización de llama y acoplado a un auto-muestreador de espacio en cabeza (HS – GC – FID) cuyo fundamento se basa en la volatilidad de los componentes analizados y la solubilidad de la mezcla de los solutos a separar. Es importante destacar que esta técnica posee un gran poder de resolución para compuestos orgánicos volátiles pero su mayor limitación está en la termolabilidad de los analitos los cuales deben ser estables a la temperatura requerida por parte del equipo (Garcia & Sutti, 2014). En este caso dicha técnica fue utilizada con el fin de determinar la alcoholemia en las muestras de sangre de forma cualitativa, cuyo parámetro característico que permitió la identificación de esta sustancia basado en el tiempo de retención ( $t_R$ ) del estándar certificado de etanol el cual fue 1,20 min mientras que el n-propanol (estándar interno) fue detectado a 2,50 min como se puede observar en la imagen 3. Con lo anterior se pudo observar que se obtuvieron 24 resultados positivos y 28 resultados negativos para alcoholemia en las 52 muestras analizadas por medio de MS-GC, como se pudo observar en la tabla 10.

Con los resultados mostrados en las tablas 6, 7, 8 y 9 se puede realizar una discusión que permite generar aspectos de relevancia forense con relación al consumo de etanol. En primera instancia los tiempos de la toma de muestras fueron calculados a partir de la diferencia entre la hora de llegada del cadáver al Instituto y las 9 de la mañana hora en la cual se realizaba el muestreo. Si se observan los tiempos que aparecen en el grafico 2 de puede analizar que el total de las muestras que tuvieron un resultado positivo fueron tomadas antes de las 12 horas posteriores a la muerte de los sujetos por lo que se puede deducir que la redistribución y eliminación post mortem que se produce con sustancias como el etanol, etilglucoronido y etilsulfato estará reducida (Schmitt, 2007; Wurst, 1999; Weinmann, 2004). Por otro lado en el grafico 3 podemos observar una predominancia 85% de los hombres en los resultados positivos para alcoholemia, este dato se puede relacionar con diferentes informes emitidos por la OMS u otras organizaciones gubernamentales para la salud en los cuales se reporta que son

los hombres quienes en sus vidas presentan una mayor cantidad de problemas relacionados con el consumo crónico de etanol. (Anderson P, 2008)

Al analizar el grafico 4, es importante resaltar que el porcentaje más alto 47% de los sujetos analizados de edad entre los 18 y 30 años pueden relacionar un rango de edad probable con el consumo de etanol y los problemas producidos por la ingesta de bebidas embriagantes. Además si se analiza el grafico 1 el cual relaciona la etiología de muerte de los sujetos con el resultado positivo de alcoholemia se puede observar que cerca en cerca del 90% de los casos las muertes de los sujetos fueron producidas por homicidios o accidentes de tránsito con lo que se puede ver una relación marcada entre estas variables y el consumo de etanol antes de la muerte de los sujetos de estudio. Estos valores se relacionan con los publicados en el año 2013 en la estrategia nacional de respuesta integral frente al consumo de alcohol en Colombia, dicha publicación afirma que la población más afectada se encuentra entre los 18 y 24 años de edad y que los valores de muertes a causa homicidios y accidentes de tránsito son alarmantes ya que en la mayoría de ocasiones tienen una relación directa con el consumo crónico de etanol. Múltiples han sido las estrategias y los esfuerzos invertidos para contrarrestar el consumo excesivo de etanol, los objetivos del gobierno colombiano se han basado en 3 pilares fundamentales: reducir la vulnerabilidad al consumo, reducir el impacto del consumo y crear capacidad de respuesta frente al consumo y sus consecuencias (Ministerio de Protección social, 2013). Esta es una problemática social del presente que cada vez se toma más hogares y que no distingue raza, sexo ni edad siendo el alcohol una sustancia psicoactiva muy atractiva y de fácil acceso por la población por lo que cada vez se hace más difícil generar estrategias que disminuyan su consumo, afectando en mayor medida la población juvenil de nuestro país. Es por esto que se hace necesario poseer métodos efectivos de análisis que permitan identificar cuando un sujeto ha consumido alguna bebida que contiene algún porcentaje de etanol o poder conocer la relación de una muerte con el consumo de etanol premortem, con lo cual las autoridades pueden desarrollar nuevas estrategias de control sobre esta problemática.

Si bien es cierto este proyecto no tuvo como objetivo cuantificar la cantidad de etanol en sangre y orina de los sujetos de análisis, este valor podría entregar información que da indicios acerca de la obtención de falsos positivos durante la determinación de alcoholemia. Según (Piazza & Rodriguez, 2015) existen causas asociadas a la producción de etanol endógeno como el síndrome de fermentación intestinal en el cual los sujetos pueden presentar valores de hasta 3 mg/100L en sangre sin haber consumido bebidas que contienen etanol horas antes de su muerte. Teniendo en cuenta esto y el límite de cuantificación del equipo de CG-FID que es 15 mg/mL en el estudio se presentaron muestras donde su valor de alcoholemia puede postularlas como falsos positivos, dichos casos son el número 8, 12, 34, 37 y 49 como se puede apreciar en la tabla 10. Por otra parte diferentes investigaciones han revelado que una vez el etanol entra en nuestro organismo

este puede distribuirse por todo el organismo llegando a almacenarse en una mayor proporción en tejidos ricos en lípidos, por lo que aun después de la muerte se pueden llegar a obtener valores de alcoholemia positivos (Martín., 2014) generando múltiples dudas que no pueden ser resueltas solo con la realización de un análisis de alcoholemia. Lo anterior se puede relacionar con la información consultada en el relato de deceso del cadáver en el que se puede conocer si este presentaba algún tipo de relación con el consumo de etanol antes de su muerte lo que ayudaría como evidencia preliminar para clasificar dichas muestras como candidatos a ser falsos positivos para alcoholemia, pero dicho resultado debería ser confirmado con la presencia o ausencia de etilglucoronido y etilsulfato en sangre y orina.

Este trabajo de investigación tuvo como objetivo determinar la presencia de dos metabolitos del etanol etilglucoronido y etilsulfato que se producen por reacciones no oxidativas en el hígado de los seres humanos después de ingerir cierta cantidad de etanol. Dichos marcadores toman un papel muy importante en el análisis forense de la embriaguez de un sujeto después de su muerte ya que estos pueden ser determinados en el cuerpo humano hasta 5 días después de la última ingesta de etanol (Schmitt, 2007; Wurst, 1999; Weinmann, 2004). Es importante resaltar que la técnica más usada para la detección de estas moléculas es la cromatografía líquida de alta resolución con detector selectivo de masas en tándem con ionización por electrospray (MS/MS-ESI-LC) por medio de la cual diversos investigadores han tenido la posibilidad de evaluar un ion molecular para ambas moléculas estudiadas, 221.0 m/e para ETG y 125.0 m/e para ETS y dos transiciones para estos mismos 85,0 m/e y 95,0 m/e para ETG y 97,0 m/e y 80,0 m/e para ETS. Pero dicho equipo presento averías que no se lograron subsanar durante el tiempo dado para la ejecución del proyecto de investigación por lo que se optó por utilizar una ionización química por presión atmosférica y evaluar si esta adaptación del equipo de espectrometría de masas podría ser una alternativa a la ionización por electrospray usada generalmente para estos análisis forenses. Es importante comprender el tipo de daño que presento el equipo, las fuentes de ionización como ESI poseen un puerto transportador de la muestra hacia el analizador de masas, en este caso esa tarea fue cumplida por un capilar el cual a través de su pequeño poro de salida depositaba pequeñas gotas de muestra sobre la fuente de ionización y posteriormente el analizador de masas. El capilar nombrado anteriormente sufrió un desprendimiento de su base impidiendo de esta forma el transporte de la muestra hacia la fuente de ionización afectando directamente la obtención de resultados óptimos haciendo uso de la fuente de ESI.

El análisis de etilglucoronido y etilsulfato fue realizado haciendo uso del modo MRM y en primera instancia aplicando las condiciones óptimas para APCI descritas por su manual. Posteriormente dichas condiciones fueron variadas debido a que se realizó una revisión bibliográfica que permitió enfocar el análisis en los metabolitos estudiados para determinar las condiciones que aparecen en las tablas 3 y 4. Cuando se realiza un análisis en modo: monitorización de

reacción múltiple (MRM) se busca eliminar el ruido que se puede en los espectros de masas obtenidos. En este caso el analizador de trampa de iones que posee el equipo de masas utilizado está conformado por tres electrodos de superficie; uno central que es anular y uno superior e inferior que forman el cierre de los extremos del anillo de la trampa donde se produce la ionización, fragmentación y el análisis de masas. Durante el proceso de análisis de masas se producen dos voltajes de radiofrecuencia diferentes entre los dos electrodos externos y el central lo que promueve la generación de un campo electromagnético tridimensional en el cual quedan atrapados los iones formados manteniendo una trayectoria estable dependiendo de su relación  $m/z$ . Cuando se promueve un cambio gradual en la radiofrecuencia aplicada en el electrodo central se podrán detectar iones específicos ya que se da lugar a la desestabilización de la trayectoria de este ion o iones a la trampa que posteriormente los eyectara en orden creciente de su relación  $m/z$  dando lugar así a un espectro de masas como el que se observa en la imagen 5 en la que se observa la presencia de un ion molecular (Ion precursor) y las respectivas transiciones (iones productos) que se pueden presentar tomando Etilglucoronido como ejemplo, se toman 2 señales para análisis que son 85 y 75 ya que como se ve en la imagen son las más abundantes y estables después del ion molecular permitiendo así una fácil detección. En la imagen 5 podemos ver los fragmentos de molécula que se forman y las diferentes señales que se obtienen después de que se pierden moléculas de agua, dióxido de carbono, etanol, etano y monóxido de carbono (Dresen & Weinmann, 2005). Así mismo en la imagen 6 se pueden observar las transiciones más estables estudiadas para este Etilsulfato, se debe tener en cuenta que los iones precursores evaluados son  $[SO_3]^{-}$  y  $[HSO_4]^{-}$  ya que presentan una abundancia alta lo que es un parámetro importante para la generación de resultados exactos y veraces (Dresen & Weinmann, 2005). Además, generalmente estos equipos pueden tener la capacidad de poseer tecnologías de triple cuadrupolo donde el analizador de masas se compone de 3 cuadrupolos que pueden ser configurados a partir del modo MRM:

- ✓ Q1 y Q3 funcionan como filtros que permiten filtrar diferentes rangos de masas una vez estas son programadas en el equipo durante el análisis de una determinada muestra (Gomez & Gonzalez, S.F.).
- ✓ Q2 es la celda de colisión de alta presión donde los iones que son filtrados a partir de Q1 se fragmentan en iones hijos de menor tamaño y peso en comparación con un ion precursor previamente filtrado en Q1 (Gomez & Gonzalez, S.F.).
- ✓ Q3 además este puede funcionar como trampa de iones donde se almacenan los iones formados en pasos anteriores con lo que se logra mejorar la sensibilidad y eliminar el ruido del espectro de masas obtenido (Gomez & Gonzalez, S.F.).



Imagen 6 Espectro de masas del Etilglucuronido evaluado en modo MRM.

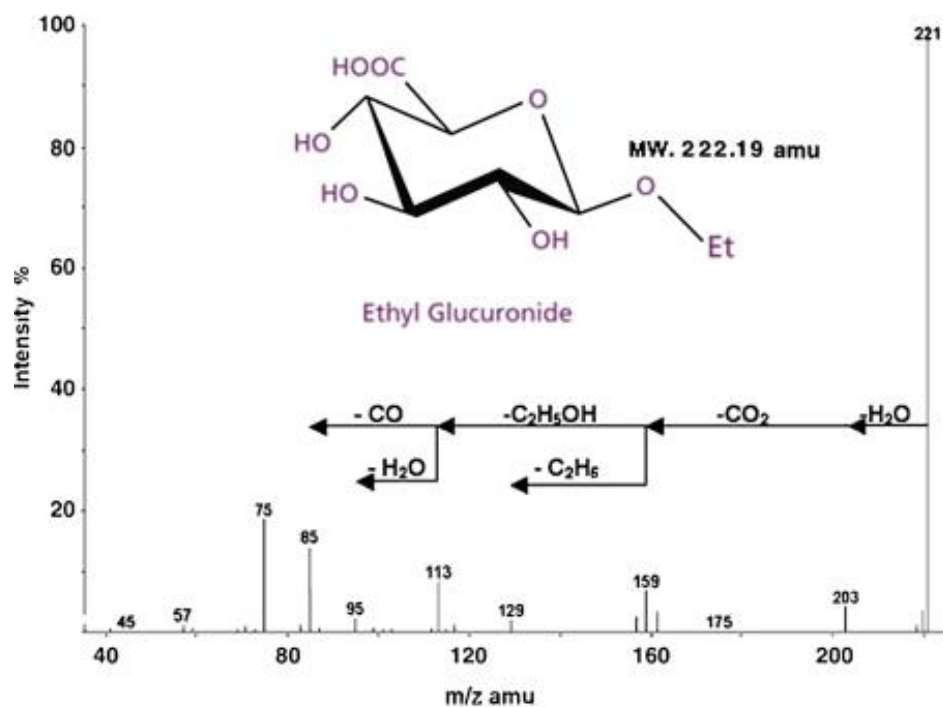
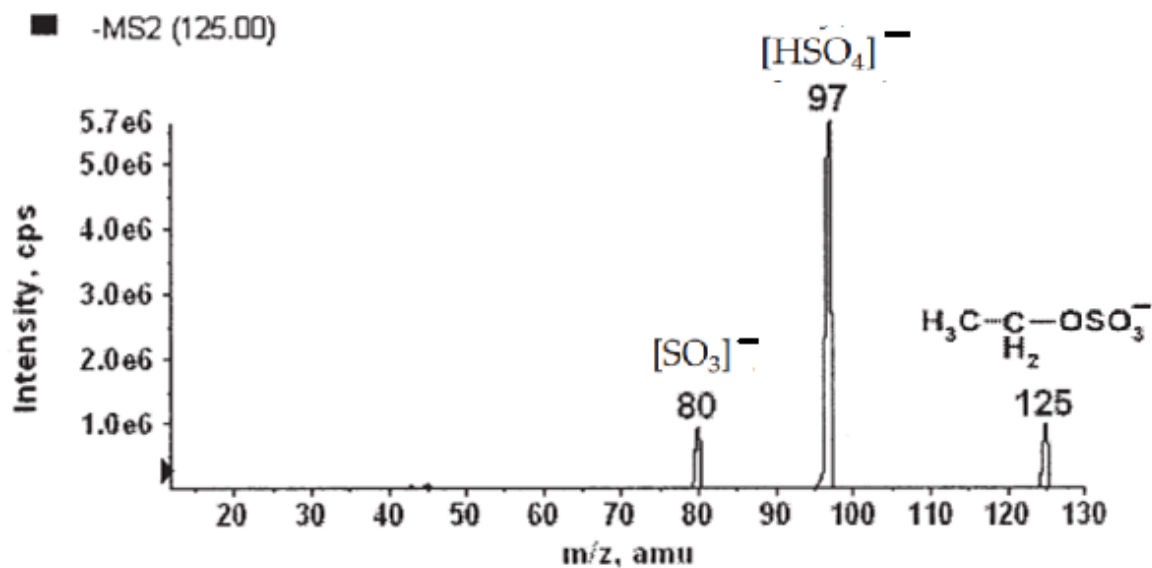


Imagen 7 Espectro de masas del Etilsulfato evaluado en modo MRM.



Este empleo de la espectrometría de masas en tandem con el pasar de los años ha ofrecido mejores resultados en cuanto a la sensibilidad se refiere haciendo una comparación con equipos en los que solo se posee un cuadrupolo. Cuando un equipo de masas tiene la opción de ser operado en modo MRM otorga la

capacidad analítica de detectar una gran gama de sustancias en diferentes matrices biológicas, reduciendo en muchas situaciones los cuidados en cuanto a la preparación de las muestras y el tiempo de análisis (QUintella, A, & M, 2005).

Como se observa en la sección de resultados, en análisis de los metabolitos estudiados debe continuar ya que la presencia o ausencia de estos en los blancos y en las muestras reales de sangre y orina no fue determinada aun. Varias pudieron ser las causas de los resultados obtenidos, una de ellas está relacionada con las condiciones requeridas por la fuente de iones para realizar la ionización ya que esta emplea temperaturas muy elevadas para alcanzar la evaporación e ionización de la fase móvil. En cierto modo estas temperaturas altas pudieron promover la degradación de las moléculas objeto, si se considera que estas moléculas son estables a una temperatura cercana a la fisiológica (37°C) ya que su mayor producción se da en el hígado humano, por lo cual si se exponen a una temperatura mayor (350-500 °C temperatura de ionización en APCI) a esta generaría una degradación irreversible y esto conllevaría a la no producción de los fragmentos particulares de cada molécula por ende no se obtendría el espectro de masas que las representa (Alvarez, 2014).

Otra posible causa pudo estar relacionada con el flujo de muestra a través de los microorificios de las sondas por los cuales se transportaba la muestra desde la jeringa de inyección directa hacia la fuente de ionización. Estos orificios pueden saturarse debido al uso de diferentes solventes y sales produciéndose un taponamiento disminuyendo así la cantidad de muestra que llegaría a la fuente de ionización, esta situación pudo haber afectado en gran medida la detección ya que se pudo ver afectada la homogénea evaporación e ionización del solvente con lo cual la producción de fragmentos del analito cargados positiva o negativamente se vería disminuida y casi nula (Skoog, JamesHoller, & Crouch, Espectrometría de masas molecular, 2007).

Por otro lado se realizaron 3 ensayos con el fin de evaluar el funcionamiento del equipo de cromatografía líquida, 1 vial con etilglucoronido, 1 vial con etilsulfato y un vial que contenía una mezcla de 1 mL de ambas moléculas a una concentración de 10000 ng/mL. Como se observa en la tabla 9 el resultado fue similar al obtenido por inyección directa, es decir, no se logró determinar la presencia de los metabolitos estudiados. Es importante resaltar que se utilizó una columna Hypersil Gold (C18) que tiene un comportamiento netamente apolar debido a su larga cadena de carbono, por lo que los metabolitos estudiados al ser moléculas con carácter polar no deberían quedar retenidos en la fase estacionaria sino eluir rápidamente y presentar tiempos de retención pequeños en su detección. Es probable que la concentración máxima utilizada de 10000 ng/mL para realizar estos ensayos no haya sido óptima partiendo del hecho de que una fuente como APCI ha sido generalmente usada para moléculas con pesos moleculares cercanos a los 1000 g/mol que en comparación con los pesos de los metabolitos estudiados son grandes lo que sumado a lo expuesto anteriormente

posiblemente explica la no detección de los fragmentos objetivo para cada analito (Skoog, Holler, & Crouch, Cromatografía de Líquidos, 2008).

Otro parámetro importante a tener en cuenta en la detección de las moléculas estudiadas es el voltaje de los electrodos que componen la trampa de iones. En próximos avances se debe tener presente que la determinación de los iones característicos de ambas moléculas depende de una correcta calibración y funcionamiento de estos componentes, por ende la aplicación de un voltaje incorrecto puede afectar en gran medida la retención y filtración de los fragmentos esperados impidiendo de esta forma su análisis por lo cual esta puede ser una causante de la no determinación de los iones moleculares ni las transiciones de estos programadas previamente en el equipo. Cabe resaltar que inicialmente se realizaron ensayos con una molécula control como la reserpina cuyos iones permiten evaluar el funcionamiento del equipo y su correcta calibración donde se evalúan principalmente la sensibilidad y exactitud del equipo (Skoog, JamesHoller, & Crouch, Espectrometría de masas molecular, 2007).

Además, para futuros análisis es importante revisar las condiciones usadas durante este proyecto ya que se debe tener en cuenta el voltaje aplicado a la muestra por parte de la corona cuando esta entra en la fuente de ionización y evaluar nuevos intervalos con el fin de generar un vapor cargado homogéneamente para no afectar directamente la ionización química del analito ya que por esto el número de moléculas de disolvente ionizado pueden disminuir y por lo tanto disminuiría la probabilidad de choque entre una molécula del analito y una molécula de disolvente lo que terminaría en la no generación de los fragmentos de masas característicos de etilglucoronido y etilsulfato. (Skoog, JamesHoller, & Crouch, Espectrometría de masas molecular, 2007)

Es importante subrayar el papel de estos metabolitos en el análisis forense y su aplicación en la generación de resultados concretos y veraces en cuanto a alcoholemia se refiere, si bien hasta el momento la avería del equipo impidió realizar su detección se debe recalcar que el proyecto sigue en marcha y que los resultados presentados se muestran simplemente por cuestiones de tiempo, pero que en cierta forma podrán servir en un futuro como base para optimizar las condiciones de los métodos propuestos.

## **5. CONCLUSIONES.**

- ✓ Se logró determinar la alcoholemia en las 52 muestras de sangre analizadas por medio de cromatografía líquida con detector de ionización de llama obteniéndose 26 resultados positivos para etanol en sangre, donde el 90% de estos sujetos tuvieron una edad entre los 18 y 30 años además su causa de muerte fue principalmente homicidio y accidente de tránsito.
- ✓ Se debe seguir evaluando la viabilidad del uso de la ionización química por presión atmosférica como alternativa a la ionización por electrospray ya que con la fuente de APCI utilizada en el proyecto hasta el momento no se logró observar la presencia de los metabolitos estudiados.
- ✓ Se debe resolver los problemas presentados con el análisis usando una fuente APCI, para estandarizar las condiciones cromatográficas y de esta manera identificar EtG y EtS por cromatografía líquida acoplada a un detector de masas en el laboratorio de toxicología del Instituto Nacional de Medicina Legal Cali.
- ✓ Para lograr determinar la relación entre la presencia de ETG y ETS con la alcoholemia se debe propender por continuar los ensayos haciendo uso de una fuente de ionización por electrospray una vez el equipo sea reparado y funcione completamente bien.

### **5.1. RECOMENDACIONES.**

- ✓ Se recomienda realizar ensayos en el equipo de espectrometría de masas en los cuales los rangos de temperatura no superen los 150 grados con el fin de proteger la estabilidad de las moléculas estudiadas durante el análisis.
- ✓ Se recomienda realizar ensayos haciendo uso de una fuente de ionización por electrospray para evaluar la presencia de los metabolitos estudiados, posteriormente conociendo este resultado se procedería a evaluar el rendimiento de una fuente de ionización química por presión atmosférica en la detección de dichas moléculas.

- ✓ Es importante realizar un mantenimiento preventivo del equipo de cromatografía líquida y del equipo de masas del laboratorio de toxicología con el fin de evaluar el rendimiento de estos antes de iniciar el análisis de diferentes moléculas.
  
- ✓ Realizar la extracción de los metabolitos de las matrices biológicas haciendo uso de una columna de extracción en fase sólida con el fin de optimizar la separación de los metabolitos.
  
- ✓ Realizar lavados de las sondas portadoras de muestra con agua para LC-MS y acetonitrilo antes y después de un análisis de una concentración diferente de las muestras de ETG y ETS.
  
- ✓ Antes de llevar las muestras al equipo de masas se recomienda filtrarlas con el fin de eliminar posibles contaminantes que obstruyan las sondas que conectan el puerto de inyección directa y el equipo de cromatografía líquida con el detector de masas.
  
- ✓ Se recomienda realizar análisis con Reserpina ya que esta es la molécula de calibración que se utiliza en este equipo de masas, una vez comprobado el correcto funcionamiento del espectrómetro se podrá proceder a realizar ensayo con estándares de etilglucoronido y etilsulfato.

## 6. Bibliografía

- Alvarez, C. T. (2014). *Determinacion De Etanol Con Fines Medicos Y Medicos Legales*. Cuenca: Universidad Catolica De Cuenca.
- Anders Helander, M. B. (2009). Detection Times for Urinary Ethyl Glucuronide and Ethyl Sulfate in Heavy Drinkers during Alcohol Detoxification. *Alcohol and Alcoholism*, 55-61.
- Anderson P, G. A. (2008). Alcohol y atención primaria de la salud: informaciones clínicas básicas para la identificación y el manejo de riesgos y problemas. *Organizacion Panamericana de la Salud*, 1-148.
- Arrieta, D. E. (2000). MECANISMOS IMPLICADOS EN LAS CONDUCTAS INDUCIDAS POR EL ALCOHOL: EL PAPEL DE LAS ENZIMAS CEREBRALES RESPONSABLES DEL METABOLISMO DEL ACETALDEHIDO. *UNIVERSIDAD DE JAEN*, 47-60.
- C McIntosh, J. C. (2004). ALCOHOL AND THE NERVOUS SYSTEM. *J Neural Neurosurg Psychiatry*, 6-21.
- CL, C. (2014). Hair ethyl glucuronide as a biomarker of alcohol consumption in alcohol-dependent patients: role of gender differences. *PubMed*, 163-6.
- D. Favretto, A. Nalesso, G. Frison, G. Viel, P. Traldi, S.D. Ferrara, A novel and an effective analytical approach for the LC-MS determination of ethyl glucuronide and ethyl sulfate in urine, *Int J Legal Med* 124 (2010) 161-164.
- Dresen, S., & Weinmann, W. (2005). Forensic Confirmatory Analysis of Ethyl Sulfate—A New Marker for Alcohol Consumption—by Liquid-Chromatography/ Electrospray Ionization/Tandem Mass Spectrometry. *Elsevier*, 1044-1050.
- Fernandez, A. A. (2015). INTERPRETACIÓN DE LA PRESENCIA DE ALCOHOL EN AUTOPSIAS CON ESPECIAL MENCION A LOS LACTANTES. *Departamento Medicina Legal de Costa Rica*, Vol 32 (2).
- Ferrari, L. A. (2008). Análisis toxicológico de etanol y su interpretacion forense. *Ciencia Forense Latinoamericana*, 20-35.
- FORENSES, I. N. (2017). *identificacion y confirmacion de sustancias de interes forense en muestras biologicas y no biologicas por GC-MS o LC-MS/MS*. cali: INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA LEGAL Y CIENCIAS FORENSES.

- Friedrich Martin wurst, C. K. (2000). Ethyl glucuronide: a marker of recent alcohol consumption with clinical and forensic implications. *Alcohol* , 111-16.
- FM, W. (1999). Ethyl glucuronide--a marker of alcohol consumption and a relapse marker with clinical and forensic implications. *PubMed*, 71-7.
- Garcia, E. L., & Sutti, A. M. (2014). Determinación por cromatografía de gases, el valor del cociente: etanol en humor vitreo/sangre en cadáveres necropsiados de la. *Horiz Med* , 34-38.
- Gomez, M. C., & Gonzalez, M. B. (S.F.). *Espectrometria de masas y analisis de biomarcadores*. Madrid: Universidad Compluetense .
- Haiko Schloegl, T. R. (2006). Distribution of ethyl glucuronide in rib bone marrow, other tissues and body liquids as proof of alcohol consumption before death. *Forensic Science International*, 156, 213-218.
- Hao-Jung Chun, J. P. (2016). Development and Validation of a Method for Alcohol Analysis in Brain Tissue by Headspace Gas Chromatography with Flame Ionization Detector. *Journal Of Analytical Toxicology* , 1-6.
- Halter CC, Laengin A, Al-Ahmad A, Wurst FM, Weinmann W, Kuemmerer K (2009) Assessment of the stability of the ethanol metabolite ethyl sulfate in standardised degradation tests. *Forensic Sci Int* 186:52–55
- Helander A, O. I. (2007). Postcollection synthesis of ethylglucoronide and ethylsulfate by bacteria in urine may cause false identification of alcohol consumption. *Clin Chem* , 18855-1857.
- Hoiseth G, Karinen R, Johnsen L, Normann PT, Christophersen AS, Morland J (2008) Disappearance of ethyl glucuronide during heavy putrefaction. *Forensic Sci Int* 176:147–151
- Linde, A. (11 de enero de 2012). *Cromatografía de gases: Detector de ionización de llama y detector termoiónico*. Recuperado el 23 de Abril de 2018, de Cromatografía de gases: Detector de ionización de llama y detector termoiónico.:  
[http://www.abellolinde.es/internet.lg.lg.esp/es/images/Cromatograf%C3%ADa%20de%20Gases%20Ionizaci%C3%B3n%20y%20Termoi%C3%B3nico%2019007-01316\\_120153.pdf?v=1.0](http://www.abellolinde.es/internet.lg.lg.esp/es/images/Cromatograf%C3%ADa%20de%20Gases%20Ionizaci%C3%B3n%20y%20Termoi%C3%B3nico%2019007-01316_120153.pdf?v=1.0)
- Lucia Polit, L. M. (2008). Ethyl glucuronide and ethyl sulfate in autopsy samples 27 years after death. *Int J Legal Med*, 507-509.

- Martín., A. V. (2014). FARMACOLOGÍA Y TOXICOLOGÍA DEL ALCOHOL ETÍLICO, O ETANOL. PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY OF ETHYL ALCOHOL OR ETHANOL. *An Real Acad Med Cir Vall* , 51: 242-248.
- Matayoshi, C. Y. (2017). *Relación entre alcoholemia, etilglucurónido y hepatopatía en cadáveres del Instituto Anatómico Forense de Madrid y su utilidad forense en la valoración del consumo de alcohol*. Madrid: Universidad Complutense de Madrid.
- Miranda, A., & Martin, O. (22 de Octubre de 2014). *Cromatografía de Gases FID Gas Chromatography Flame Ionization Detector*. Recuperado el 08 de Abril de 2018, de Cromatografía de Gases FID Gas Chromatography Flame Ionization Detector: <https://www.ucm.es/tecnicasgeologicas/cromatografia-de-gases-fid>
- Ocampo CB; Ferro C; Cadena H; Marín D; Lozano L; Ramírez CA; Munstermann L. . (2013). jerajeraejjsdfjao. *acta tropica*, 27- 30.
- Oliel, S., & Everwine, D. (31 de Julio de 2015). *Crece el consumo nocivo de alcohol en las Américas*. Recuperado el 25 de Abril de 2018, de Crece el consumo nocivo de alcohol en las Américas: [https://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=11116%3A2015-harmful-alcohol-use-increasing-americas&catid=1443%3Aweb-bulletins&Itemid=135&lang=es](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=11116%3A2015-harmful-alcohol-use-increasing-americas&catid=1443%3Aweb-bulletins&Itemid=135&lang=es)
- Piazza, M., & Rodriguez, L. (2015). ETANOL ENDÓGENO SIN INGERIR ALCOHOL: NIVELES DE CONCENTRACIÓN Y PRINCIPALES CAUSAS DE SU PRODUCCIÓN. *Boletín del Instituto Nacional de Salud*, 10-12.
- QUintella, A, C., & M, C. (2005). Metodología LC–MS. Aspectos generales de la técnica. *Revista de Toxicología, Asociación Española de Toxicología y sus aplicaciones en el campo de la toxicología*, 7-14.
- Rainio, J. (2009). Objective post-mortem diagnosis of chronic alcohol abuse – A review of studies on new markers. *Legal Medicine*, 229-235.
- Restek Corp. (2000), A Technical Guide for Static Headspace Analysis Using GC, Guía Técnica. [www.restekcorp.com](http://www.restekcorp.com)
- Rodriguez, J. (S.F.). *Seminario Espectrometría de Masas*. Ciudad Mexico: Agilent Technologies.
- S.C. Turfus, T. V. (2013). An evaluation of the DRI-ETG EIA method for the determination of the ethyl glucuronide concentrations in clinical and postmortem urine. *Drug Test Anal* 5, 439-445.
- saldarriaga, c; Valderrama, B; . (2014). jraj fjaoidsjiadu. xxxxx, 37-45.



Schmitt G1, Aderjan R, Keller T, Wu M. Ethyl glucuronide: an unusual ethanol metabolite in humans. Synthesis, analytical data, and determination in serum and urine. *J Anal Toxicol*. 1995; 19(2):91-4.

Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2008). Cromatografia de Líquidos. En D. A. Skoog, F. J. Holler, & S. R. Crouch, *Principios de análisis Instrumental* (págs. 775-781). Ciudad De Mexico: Cengage Learning.

Skoog, D. A., JamesHoller, F., & Crouch, S. R. (2007). Espectrometría de masas molecular. En D. A. Skoog, F. JamesHoller, & S. R. Crouch, *Principios deAnálisis Instrumental* (págs. 560-585). Ciudad de Mexico: Cengage Learning.

social, M. s. (2013). *ESTRATEGIA NACIONAL DE RESPUESTA INTEGRALFRENTE AL CONSUMO DEALCOHOL EN COLOMBIA*. Bogotá: Ministerio de salud-Universidad Nacional de Colombia.

VILLA, G. P. (2003). *Espectrometría de masas* . Cluda De Mexico: Universidad Nacional Autónoma de Mexico.

W. Weinmann, P. Schaefer, A. Thierauf, A. Schreiber, F.M. Wurst, Confirmatory analysis of ethylglucuronide in urine by liquid-chromatography/electrospray ionization/tandem mass spectrometry according to forensic guidelines, *J Am Soc Mass Spectrom* 15 (2004) 188-193.

Wurst FM, Kempter C, Seidl S, Alt A. Ethyl glucuronide - A marker of alcohol consumption and a relapse marker with clinical and forensic implications. *Alcohol Alcoholism*. 1999;34(1):71-7.

Wurst FM, Kempterb C, Metzgerb J, Seidl S, Alt A. Ethyl glucuronide: a marker of recent alcohol consumption with clinical and forensic implications. *Alcohol*. 2000; 20:111–116.

You, Y., Uboh, C. E., & Soma, L. R. (2007). Biomarkers of alcohol abuse in racehorses by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom*, 3785-3794.