



Validación del método para la cuantificación de alcohol en sangre por cromatografía gaseosa con detector de ionización de llama y espacio de cabeza y correlación con el método enzimático

Validation of the method for the quantification of blood alcohol by gaseous chromatography with flame ionization detector and head and correlation space with the enzymatic method

TRIGO ORSINI, MYRIAM LINA^{1*}

FECHA DE RECEPCIÓN: 28 DE SEPTIEMBRE DE 2017

FECHA DE ACEPTACIÓN: 10 DE OCTUBRE DE 2017

Resumen

El presente estudio describe la estandarización del método para la cuantificación de alcohol en sangre por Cromatografía Gaseosa con Detector de Ionización de Llama y espacio de cabeza. La separación del alcohol de una matriz compleja como la sangre fue llevada a cabo de manera exitosa utilizando una columna ELITE-1, la fase móvil o gas de arrastre es una mezcla de hidrógeno y aire, inyector split y detector de ionización de llama.

El método fue validado con los siguientes parámetros: especificidad, linealidad, precisión, exactitud, límite de detección y límite de cuantificación. También se realizó la prueba de aptitud del sistema. El método fue específico para el alcohol, la respuesta fue lineal en el rango de 0,125 – 1,0 mg/mL de concentración del analito. El valor del coeficiente de variación o desviación estándar relativa (C.V. o DSR) para la precisión fue óptimo. La recuperación media fue de

Abstract

The present study describes the standardization of the method for the quantification of alcohol in blood by Gas Chromatography with Flame Ionization Detector and headspace. The separation of the alcohol from a complex matrix such as blood was successfully carried out using an ELITE-1 column, the mobile phase or entrainment gas is a mixture of hydrogen and air, split injector and flame ionization detector.

The method was validated with the following parameters: specificity, linearity, precision, accuracy, limit of detection and limit of quantification. The system fitness test was also performed. The method was alcohol specific, the response was linear in the range of 0.125 - 1.0 mg / mL analyte concentration. The value of the coefficient of variation or relative standard deviation (C.V. or DSR) for precision was optimal. The mean recovery was 99.06%. And the limit of detection and quantification were

¹ Facultad de ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas Laboratorio Instituto de Investigaciones Fármaco. La Paz. Bolivia. Bioquímicas. Instituto de Investigaciones Técnicas de la Universidad Policial "Mariscal Antonio José de Sucre".

* Autor de correspondencia: myriamtrigo@gmail.com

99,06%. Y el límite de detección y cuantificación resultaron óptimos para la cuantificación de alcohol en sangre en el rango definido.

Finalmente el método cromatográfico fue correlacionado con el método analítico (previamente validado) actualmente utilizado en la División de Dosaje Etílico del Instituto de Investigaciones Técnicas de la Universidad Policial "Mariscal Antonio José de Sucre", mediante el análisis estadístico de las respuestas analíticas de ambos métodos se obtuvo una muy buena correlación por lo que se concluye que el método cromatográfico puede ser utilizado para los fines consiguientes.

PALABRAS CLAVE

Validación, etanol, cromatografía gaseosa, método cromatográfico, método enzimático.

optimal for the quantification of blood alcohol in the defined range.

Finally the chromatographic method was correlated with the enzymatic method (previously validated) currently used in the Ethical Dosage Division of the Institute of Technical Investigations of the "Mariscal Antonio José de Sucre" Police University, through the statistical analysis of the analytical responses of both methods a very good correlation was obtained by which it is concluded that the chromatographic method can be used for the consequent purposes.

KEY WORDS

Validation, ethanol, gas chromatography, chromatographic method, enzymatic method.

INTRODUCCIÓN

El alcohol etílico conocido popularmente como alcohol, es el componente fundamental de las bebidas embriagantes, el consumo permitido y socialmente aceptado lo convierte en una sustancia de abuso utilizada en la mayor parte de las culturas y épocas así como el tóxico universalmente más ingerido, lo cual origina una problemática que, en el caso de abuso en su consumo trasciende a lo social, sanitario, laboral y familiar.

Código Nacional de Tránsito contempla sanciones para aquellos conductores que se encuentren en estado de ebriedad. Y el Decreto Supremo 420 establece el derecho a la vida y a la integridad física sancionando toda acción u omisión que tenga por objeto degradar la condición humana.

Como consecuencia de este problema el control de Alcholemla por Cromatografía Gaseosa y el desarrollo del método denominado "espacio de cabeza" o más propiamente "de cámara de vapores en equilibrio con el líquido" resulta ser el procedimiento óptimo para la determinación del alcohol en sangre (REPETTO, M & REPETTO, G, 2009), debido a que constituye un método mediante el cual es posible separar, identificar y cuantificar el principio activo de manera muy específica.

En el área forense los métodos clínicos (pruebas de consumo reciente de alcohol, pruebas de la pérdida de control de las facultades), y algunos métodos bioquímicos que emplean reacciones de óxido-reducción (Truhaut-Boudéne, Newman, pentóxido de yodo, Nicloux) son aceptables como métodos presuntivos o de descarte; sin embargo actualmente es la cromatografía de gases el método de elección al ser altamente específico para el etanol y por

excelencia aceptado por su exactitud y precisión, por academias y organizaciones que velan por el cumplimiento de normas científicas en laboratorios analíticos que sirven a sistemas de justicia.

El método para determinar alcohol en sangre debe validarse y la validación analítica es el establecimiento de evidencia documentada de que un procedimiento analítico conducirá, con un alto grado de seguridad, a la obtención de resultados precisos y exactos dentro de las especificaciones y los atributos de calidad previamente establecidos. Que es exacto, preciso, selectivo, reproducible y que, por lo tanto es válido para realizar su determinación cuantitativa en la matriz biológica correspondiente. (Aguirre, 2001)

La validación de un método en el contexto del bioanálisis conlleva la aceptación de una serie de características propias derivadas de la dificultad añadida que supone el hecho de tener que determinar analitos en muestras biológicas complejas. Así por ejemplo, la aplicación de conceptos estrictamente estadísticos o bien la utilización de criterios de aceptación de resultados, está totalmente condicionada por la variabilidad intrínseca que supone la manipulación de muestras biológicas, no sólo desde la perspectiva de su análisis, sino también desde una visión más amplia que incluye su obtención a partir de animales o humanos y su almacenaje a una temperatura de congelación determinada. (Aguirre, 2001)

De acuerdo con la AEFI los parámetros que deben realizarse para la validación de un método bioanalítico son: selectividad o sensibilidad, linealidad y rango, exactitud, precisión (repetibilidad, precisión intermedia), límite de detección y límite de cuantificación.

Una vez validado el método para la cuantificación de alcohol en sangre por Cromatografía Gaseosa con Detector de Ionización de Llama y Espacio de Cabeza, se procedió a la correlación de este método con el método enzimático actualmente utilizado por la División de Dosaje Etilico del Instituto de Investigaciones Técnicas de la Universidad Policial "Mariscal Antonio José de Sucre"-IITCUP, mediante la correlación de las rectas de regresión con análisis estadístico para determinar si el método enzimático puede ser utilizado como un método confiable, seguro, exacto y preciso para el control.

MATERIALES Y MÉTODOS:

La presente investigación fue de tipo LONGITUDINAL RETROSPECTIVA.

Muestra

Las muestra se constituyó en sangre fortificada a diferentes niveles de concentración de acuerdo a los requerimientos de Validación.

Los equipos utilizados fueron: un Cromatógrafo Gaseoso, Perkin Elmer, balanza analítica Sartorius, agitadores magnéticos con temperatura contro-

lada marca Fisatom, destilador de agua J.P. SELECTA, s.a. y sistema de purificación de agua "Aqua MAX™", Marca YOUNGLIN. Todos los materiales de vidrio fueron: clase A

Los reactivos utilizados fueron: carbonato de potasio p.a., marca Riedel-de Haën (Lote:51820), agua ultrapura calidad HPLC, estándar Hidroalcohólico de trabajo de concentración 100g; 0,38g; 0,64g; 1,02g EtOH/L H₂O, proveedor IBMETRO, lote: 5118451.01 y sangre humana recolectada por punción venosa (con H₂O₂ como desinfectante) en tubos vacutainer con EDTA.3K de voluntarios sanos que no han ingerido alcohol.

Las condiciones cromatográficas utilizadas fueron: Un Cromatógrafo Gaseoso, Perkin Elmer; una columna ELITE 1 (100% Dimetil polisiloxano), longitud 30 metros, diámetro interno 0,53 mm., espesor de película 3 µm. Rango de temperatura -60 a 260/280°C, marca Perkin Elmer; el detector de Ionización de Llama a 150°C; inyector Split a 150°C; volumen de inyección de 500µL (vapor) y las condiciones de trabajo: Temperatura inicial 35°C, 1 min y 10°C/min de gradiente hasta 100°C de temperatura final.

Estandarización de método cromatográfico

Se prepararon estándares a diferentes concentraciones (0,125; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0 mg/mL) a partir de un estándar primario de 100 mg/mL. En un vial de 10 mL se colocó 1 mL de estándar de la concentración correspondiente y 1 mL de solución saturada de K₂CO₃, se introdujo en el vial un imán. Se tapó con tapón de goma y se precintó con aluminio, de tal manera que quede herméticamente cerrado. El vial fue colocado en un baño maría en un agitador magnético a 50°C durante 30 minutos. Luego se tomaron 500 µL de aire confinado en el vial y se inyectó en el cromatógrafo gaseoso.

VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

Especificidad

Se prepararon 6 muestras sin interferencias (soluciones de estándares de trabajo) y 6 muestras con interferencias (soluciones de estándares de trabajo con matriz) a la concentración media de la curva de calibración (0,5 mg/mL).

Linealidad y rango

Se prepararon 5 niveles de concentración, cada nivel con tres réplicas, para linealidad del método (analito + matriz).

Precisión

Repetibilidad del sistema instrumental

Se determinó analizando repetidamente una misma muestra de forma consecutiva 6 veces, a la concentración media de la curva de calibración (0,5 mg/mL).

Repetibilidad del método

Se evaluó la repetibilidad del método preparando muestras fortificadas a tres niveles de concentración (0.125; 0.5; 1.0 mg/mL)

Precisión intermedia

La precisión intermedia mide la variabilidad del método en este caso se optó por días diferentes y analistas diferentes, realizando el análisis a la concentración media de la curva en matriz fortificada y se calculó el coeficiente de variación total (CV).

Exactitud

Para evaluar la exactitud se prepararon 3 estándares por triplicado a concentraciones de 0,125; 0,5 y 1,0 mg/mL y tres muestras fortificadas (matriz + analito) por triplicado a las mismas concentraciones de los estándares.

Límites de detección y cuantificación

Para evaluar el límite de detección y cuantificación se prepararon tres concentraciones menores al punto más bajo de la curva de calibración, (0,1; 0,075 y 0,05 mg/mL) por triplicado y se determinó la curva de calibración para estas concentraciones.

Prueba de aptitud del sistema

Los parámetros de evaluación fueron los siguientes:

- Precisión, expresada como el coeficiente de variación obtenido a partir de 5 inyecciones repetidas de solución de estándar de trabajo, según USP 37.
- Parámetros cromatográficos:
 - o Factor de capacidad,
 - o Número de platos teóricos (N):
 - o Factor de asimetría o de cola (tailing)
- Límites de detección o cuantificación ((AEFI), 2001, pág. 107) (AGILENT, 2006).

Correlación de dos métodos analíticos

La correlación de los métodos analíticos se realizó mediante la construcción de una curva de calibración con los datos (respuestas analíticas) obtenidos por ambos métodos en muestras fortificadas en todo el intervalo de Linealidad.

Se calculó el coeficiente de correlación, el coeficiente de determinación, cálculo de homogeneidad de varianzas y las hipérbolas de confianza.

Finalmente se comprobó la normalidad de residuales para lo cual se empleó la prueba de normalidad de Anderson-Darling.

RESULTADOS

Estandarización del método para la cuantificación de alcohol en sangre

Figura 1.
Cromatograma de estándar de alcohol

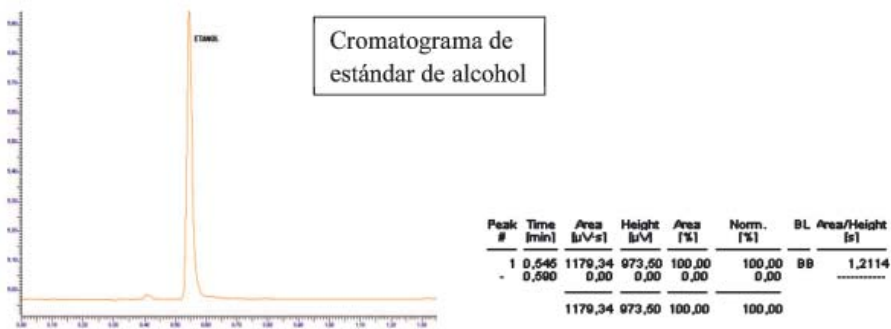
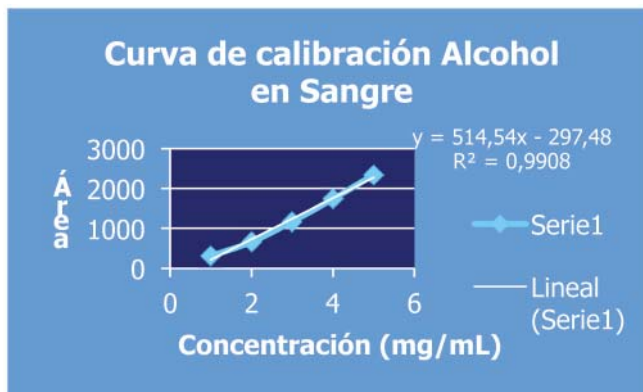


Tabla 1.
Curva de Calibración de Alcohol en Sangre



a =	297,48	b =	514,54
r =	0,9954	r ² =	0,9908

Se observa que las respuestas son proporcionales a la concentración del analito y que el intervalo de trabajo es óptimo para realizar la alcoholemia

Validación del método analítico: ESPECIFICIDAD

Tabla 2.
Homogeneidad de varianzas

$H_{(0)} =$	$s_1^2 = s_2^2$		$H_{(1)} =$	$s_1^2 \neq s_2^2$	
F_{exp} =	1,21	F(0.05,5,5) =	5,05	Conclusión	Se acepta $H_{(0)}$
Existe homogeneidad de varianzas					

Prueba de t de Student-Fisher de comparación de dos medias con grupos independientes, para varianzas homogéneas

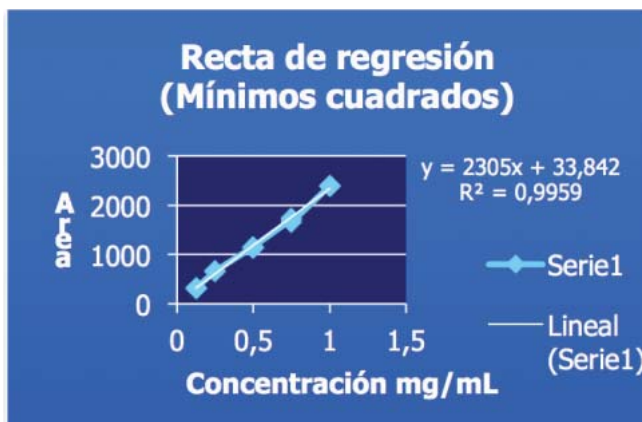
Tabla 3.
Comparación de dos medias con grupos independientes, para varianzas homogéneas

$H_{(0)} =$	$\mu_1 = \mu_2$		$H_{(1)} =$	$\mu_1 \neq \mu_2$	
s(total) =	13,23580				
t_{exp} =	0,74	t(0.05,10) =	2,23	Conclusión	Se acepta $H_{(0)}$
La matriz no es un interferente significativo					

Una vez comprobada la homogeneidad de varianzas, se aplica la prueba de T de Student- Fisher en donde la prueba bilateral encuentra para una prueba de un riesgo α del 5% (0,05) que no existe diferencias significativas en la determinación de alcohol cuando se trabaja en presencia o ausencia de la matriz (sangre).

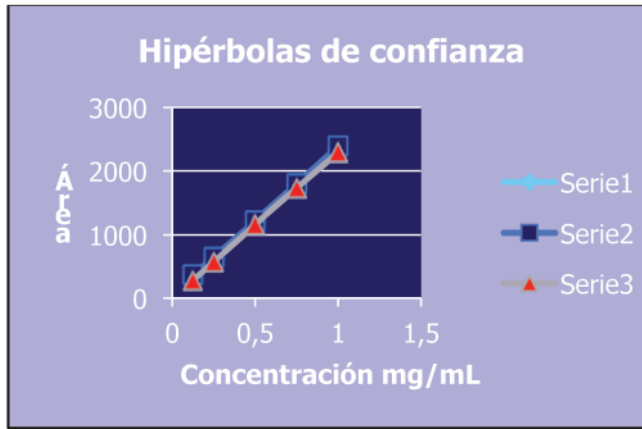
Validación del método analítico: LINEALIDAD Y RANGO

Figura 2.
Recta de regresión



a =	33,84160569	b =	2305,03821
r =	0,997937241	r² =	0,99587873

Figura 3.
Hipérbolas de confianza



Las hipérbolas de confianza nos indican que todo el sistema (analistas, equipo, condiciones ambientales, material volumétrico, reactivos, etc) está funcionando de manera tal que no interfiere en la interacción entre la concentración (x) y la respuesta analítica (y).

Coefficiente de correlación y Coeficiente de determinación

Tabla 4.
Coefficiente de correlación y Coeficiente de determinación

$H_{(0)}$ =	No hay correlación entre x e y		$H_{(1)}$ =	Hay correlación entre x e y	
$t(0.05, n-2)$	2,16037	$T_{exp} =$	56,04795	Conclusión	Se rechaza $H_{(0)}$
$r^2 * 100 =$	99,587	% de los pares de datos se ajustan a la recta			

El coeficiente de correlación (r) nos indica el grado de relación entre la variable (x) y la variable (y), **existiendo correlación con una probabilidad elevada como se observa en las tablas.**

El coeficiente de determinación (r^2) expresa la proporción de la variación total de la respuesta (y-área) explicada por el modelo. El intercepto ordenada en el origen no difiere estadísticamente de cero. **Las varianzas de las concentraciones son homogéneas, y el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados.**

En el análisis de varianza para la regresión y linealidad, comprobándose previamente que se cumplen los supuestos de homogeneidad de varianzas y normal de los residuales, **se demuestra la existencia de una pendiente estadísticamente diferente de cero y una falta de ajuste en las concentraciones.**

Validación del método analítico: PRECISIÓN

Tabla 5.
Repetibilidad del sistema instrumental

	RESPUESTA ANALÍTICA	TIEMPO DE RETENCIÓN
COEFICIENTE DE VARIACIÓN(%)	0,707911761	0,312501014
INTERPRETACIÓN	Repetibilidad del instrumento en respuesta analítica	Repetibilidad del instrumento en tiempos de retención
CRITERIOS DE ACEPTACIÓN (CV)	no más de 2%	

Tabla 6.
Repetibilidad del método

RESPUESTA ANALÍTICA	RELACIÓN
PROMEDIO	2387,258889
COEFICIENTE DE VARIACION(%)	5,709160968
Criterio de aceptación: CV(%) no más de 15 %	

Tabla 7.
Precisión intermedia del método

ANALISTA X	DIA 1	DIA 2	DIA 3
CV(%)	0,50	1,21	2,21
	DIA 1	DIA 2	DIA 3
CV(%)	0,21	0,31	0,68
	Conclusión		
CV TOTAL	1,4	Precisión intermedia aceptable	

Validación del método analítico: EXACTITUD

Tabla 8.
Homogeneidad de varianzas

$H_{(0)} =$	$s_1^2 = s_2^2$		$H_{(1)} =$	$s_1^2 \neq s_2^2$	
Gexp=	0,7220	G(0.05,k,n)=	0,8709	Conclusión	Se acepta $H_{(0)}$
El factor de concentración no influye en la variabilidad de los resultados					

Tabla 9.
Recuperación media

$H_{(0)} =$	Recup. Media = 100		$H_{(1)} =$	Recup. Media \neq 100	
texp=	0,99763	t(0.05,n-1)=	2,30600	Conclusión	Se acepta $H_{(0)}$
No existe diferencia significativa entre la recuperación y 100. Por tanto es un Método exacto					

La exactitud se expresa como porcentaje de recuperación de la diferencia entre la media obtenida y el valor aceptado como verdadero, y en este caso la recuperación es satisfactoria ya que aplicando una prueba de t de Student el valor $t_{\text{experimental}} < t_{\text{tablas}}$, no habiendo diferencia significativa entre la recuperación media y el 100%, por lo que la exactitud es correcta.

Validación del método analítico: LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

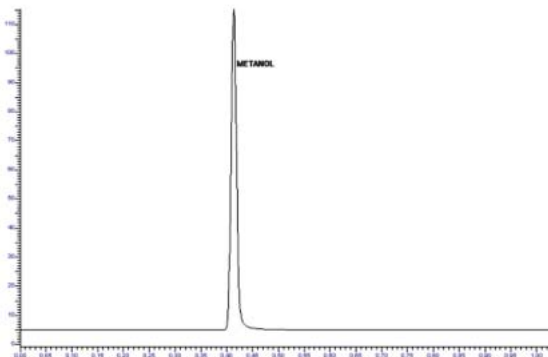
Tabla 10.
Límite de detección y límite de cuantificación

		UNIDADES
LÍMITE DE DETECCIÓN	0,011705112	mg/mL
LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	0,022843384	mg/mL

Los límites de detección y cuantificación encontrados demuestran claramente que el método puede ser aplicado para la determinación de alcohol en sangre

Prueba de aptitud del sistema: PARÁMETROS CROMATOGRÁFICOS

Figura 4.
Factor de capacidad



$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

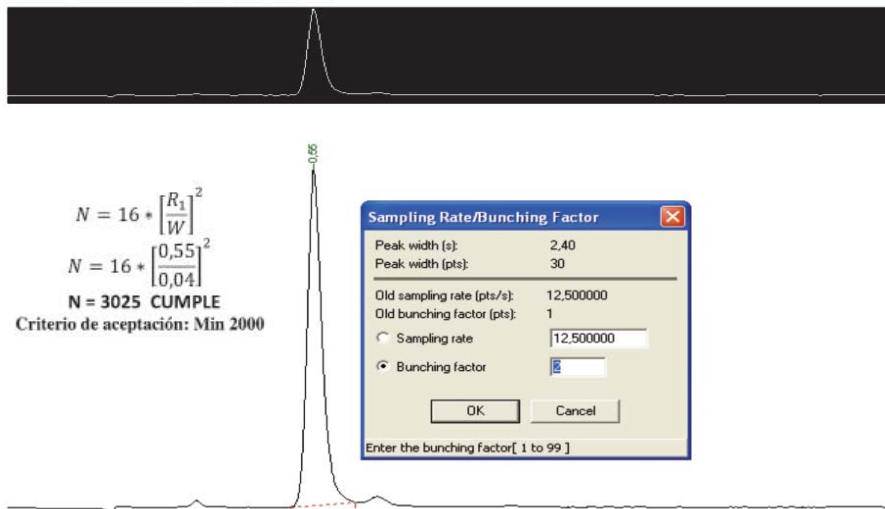
$$k' = \frac{0,55 - 0,41}{0,41}$$

$$k' = 0,34$$

Criterio de aceptación:
Entre 1 - 10

Peak #	Time [min]	Area [$\mu\text{V}\cdot\text{s}$]	Height [μV]	Area [%]	Norm. Area [%]	BL	Area/Height [s]
-	0,001	0,00	0,00	0,00	0,00		
1	0,413	83945,85	110584,20	100,00	100,00	BB	0,7591
-	0,590	0,00	0,00	0,00	0,00		
		83945,85	110584,20	100,00	100,00		

Figura 5.
Número de platos teóricos



Factor de asimetría

Factor de asimetría

$$T = W_{0.05} / 2 * tw$$

$$T = 2,2 / 2 * 1$$

$$T = 1,1$$

MUY BUENO

Límites:

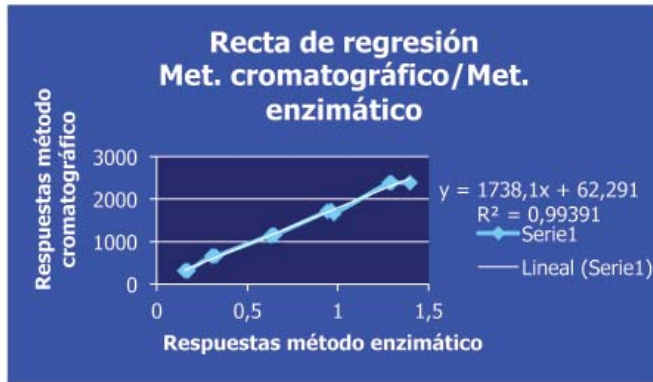
- Excelente: 1-1.05
- Muy bueno: 1.2- 1.9
- Inaceptable: 2
- Pobre: 4

Los parámetros cromatográficos calculados demuestran que el sistema es apto para la determinación de alcohol en sangre

Límites de detección y cuantificación.- Fueron calculados en la Validación del método

Correlación entre el método cromatográfico (GC) y el método enzimático (UV)

Figura 6.
Recta de regresión método cromatográfico / método enzimático



a =	62,2905817	b =	1738,12917
r =	0,9969	r ² =	0,9939

La relación de las respuestas de las muestras tratadas por el método enzimático (x-variable independiente) y las respuestas de las muestras tratadas por el método cromatográfico (GC) (y-variable dependiente) se expresa matemáticamente como una recta de regresión ($y=bx+a$) obtenida por un método de ajuste, en este caso mínimos cuadrados. Con lo cual se pudo comprobar que existe una buena correlación entre ambos métodos.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede concluir que:

- El método estandarizado y validado para la cuantificación de alcohol en sangre por Cromatografía gaseosa con detector de ionización de llama y espacio de cabeza es rápido, sencillo y económico en relación a otros encontrados en la literatura, resultando una alternativa eficiente para el análisis en el campo forense.
- Se validó el método analítico para la cuantificación de alcohol en sangre por cromatografía gaseosa en el Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas (IIFB) de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas de la UMSA, con lo que se comprobó que éste cumple con todos los requerimientos exigidos en el protocolo. Por lo tanto, se puede asegurar que la metodología se encuentra en condiciones de ser utilizada para el análisis rutinario de determinación de etanol en sangre lo que garantiza resultados confiables y reproducibles con aplicación en las pericias forenses.

- El método luego de la validación resultó específico ya que es capaz de medir de manera inequívoca el analito, lineal, preciso y exacto.
- Los límites de detección y cuantificación son muy bajos, sin embargo no se puede determinar claramente los niveles de alcohol endógeno.
- El método para la cuantificación de alcohol en sangre por Cromatografía gaseosa con detector de ionización de llama y espacio de cabeza presenta correlación estadística con el método enzimático utilizado en la División de Dosaje Etilico del Instituto de Investigaciones Técnicas de la Universidad Policial "Mariscal Antonio José de Sucre".

BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre L., Martín M., Antunez S., Carles C., Cortes R. (2001). Validación de Métodos Analíticos. España
- Agilent. (s.f.). Recuperado el 18 de 12 de 2015, de <http://www.agilent.com>
- AGILENT. (2006). www.agilent.com. Recuperado el 25 de Febrero de 2016, de <http://www.mac-mod.com/tr/07031-tr.html>. 2006
- AGILENT. (2009-2010). www.agilent.com. Recuperado el 03 de Febrero de 2016, de <http://www.agilent.com/che/supplies>
- (FDA), F. a. (2000). Guidance for Industry, Analytical Procedures and Methods Validation, Chemistry, Manufacturing, and Controls Documentation. (2010). Recuperado el 12 de Marzo de 2016, de <http://www.chomacademy.com>.
- FDA, F. a. (2000). Guidance for Industry, Analytical Procedures and Methods Validation, Chemistry, Manufacturing, and Controls Documentation.
- FERRARI, L. A. (2008). Análisis toxicológico de etanol y su interpretación forense. Ciencia Forense latinoamericana, 7, 8.
- Gaceta 418NEC, Decreto Supremo, septiembre/2012. (10 de Septiembre de 2012). Recuperado el 04 de Marzo de 2016, de <http://www.gacetaoficialdebolivia.gob.bo/normas/verGratis/140935>
- Gaceta 103NEC, Decreto supremo 420 2010-02-03. (03 de Febrero de 2010). Recuperado el 22 de 10 de 2015, de <http://www.gacetaoficialdebolivia.gob.bo/normas/verGratis/36194>
- Gaceta 177NEC, Decreto supremo 1347 2010-10-06. (06 de Octubre de 2010). Recuperado el 04 de Marzo de 2016, de <http://www.gacetaoficialdebolivia.gob.bo/normas/verGratis/138663>
- GARCÍA USIETO, E. (2003). Manual SET de alcoholismo. Madrid: Médica Panamericana.
- GONZALES I., CABRERA, M. A., & BERMEJO, M. d. (2015). Metodologías Biofarmacéuticas en el Desarrollo de Medicamentos. Universidad Miguel Hernández.
- GOODMAN, L., & GILMAN, A. (2012). GOODMAN & GILMAN Las bases farmacológicas de la TERAPÉUTICA. McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A. de C.V.
- GUPTA, M., & BHARGAVA, H. (2006). Development and Validation of a High Performance Liquid Chromatographic Method for the Analysis of Budesonide. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 423-428.
- International Conference on Harmonization (ICH). Unión Europea, J. E. (1995). Validation of Analytical Procedures: definitions and terminology (Q2A).
- International Conference on Harmonization (ICH). Unión Europea, J. E. (1997). Validation of Analytical Procedures: methodology (Q2B).
- LADERO, J. M., & LIZASOAIN, I. (2003). Alcohol (I). Farmacología del alcohol. Intoxicación aguda. En P. e. LOENZO, DROGO-DEPENDENCIAS. Farmacología. Patología. Psicología. Legislación (pág. 335). Madrid: Editorial Médica Panamericana.
- LOCANI, O. (2009). Toxicología Forense. Ediciones Argentinas Dosyuna.
- MORALES, R. Centro de tecnología aplicada en BPMv. validación de técnicas analíticas. Cuantificación de acetaminofén por espectrofotometría UV. Análisis estadístico para linealidad, exactitud y precisión. Determinación de límites de detección y cuantificación. Purificación y Análisis de Fluidos Ltda., Bogotá.
- NORIEGA RODRIGUEZ, J. A. (2003). HPLC y Cromatografía de Gases: Aspectos teóricos y Aplicaciones Analíticas. Sonora.
- NÚÑEZ DE ARCO, J. (2011). MEDICINA LEGAL Y CRIMINALÍSTICA. Tomo I. La Paz: TEMIS.
- OMS. (enero de 2015). Recuperado el Domingo de Enero de 2016, de www.who.int/mediacentre/factsheets/fs349/es/
- PAREJA, C., JURADO, C., & JIMENEZ, M. (Octubre de 2006). Recuperado el 19 de Noviembre de 2011, de <http://www.aetox.es/wp-content/revista/revtox.24.1.alcohol.pdf>
- QUATTROCCHI, O. A., ANDRIZZI, S. I., & LABA, R. F. (1992). Introducción a la HPLC, Aplicación y Práctica. Buenos Aires: Artes gráficas Farro.



Reglamento del Código del Tránsito, 8 de junio de 1978. (22 de Octubre de 2010). Recuperado el 23 de Septiembre de 2015, de www.lexivox.org/norms/BO-RE-RS187444.shtml
SKOOG, D. A. (2001). Principios de Análisis Instrumental.
The United States Pharmacopeial Convention. Vol I. (2014).

VALLS, O., & DEL CASTILLO, B. (1998). Técnicas Instrumentales en Farmacia y Ciencias de la Salud. Barcelona: Ediciones Piro.
www.transparencia.gob.bo. (07 de Febrero de 2009). Recuperado el 24 de Septiembre de 2015, de http://www.transparencia.gob.bo/data/marco_legal/ds/ds29894.pdf