



# ARTÍCULOS ORIGINALES

## DETERMINACIÓN DE UN NUEVO BIOMARCADOR PARA EL ANÁLISIS MÉDICO FORENSE DEL ETANOL

### DETERMINATION OF A NEW MEDICAL BIOMARKER FOR FORENSIC ANALYSIS OF ETHANOL

MSc. Ph.D Guillermo Rocabado\*, O.Rocabado\*\*, S Rocabado\*\*\*, Dr. Saul Pantoja\*\*\*\*, Alucema A\*

Recibido: 08/05/2012

Aceptado: 22/05/2012

#### RESUMEN

La investigación del etanol, trae consigo una serie de problemáticas a la hora de su análisis y su determinación forense, esto en razón de la vida media que presenta, lo que impide su determinación en una muestra, ello si ha transcurrido mucho tiempo, en consecuencia se plantea una alternativa de estudio y determinación del etanol, que nos permita determinar su presencia de forma indirecta, conociendo parámetros bioquímicos. En este caso un nuevo método de análisis e identificación planteando por (Rocabado G.), es basado en la determinación y cuantificación de ácido nicotínico, bajo su forma de ester etílico (método de extracción), ya que se llegó a observar que las concentraciones de esta son distintas a las encontradas en muestras de tejido cadavérico en personas fallecidas sobrias (TCFS), la concentración decae en muestras de tejidos cadavéricos fallecidos bajo la influencia del etanol (TCFE).

Conociendo la capacidad que tiene el ácido nicotínico de esterificarse en presencia de etanol en medio ácido, se extrae como indicador de nicotinamida indirecta de fluidos y tejidos, aprovechando esta capacidad para extraerla como éster y realizar curvas patrón de identificación y cuantificación. El método instrumental analítico fue la espectrofotometría U.V.

#### INTRODUCCIÓN

La embriaguez o conjunto de fenómenos psíquicos y somáticos de la intoxicación aguda, posee una extraordinaria importancia sociológica, criminológica y médico legal. Por otra parte, es de destacar la importancia criminológica y criminalística de la

embriaguez, motivo de frecuentes actuaciones médico legales que dan lugar a variados y difíciles problemas periciales. El alcohol, considerado como un factor criminógeno general de primer orden, engendra de modo específico determinados delitos, riñas, alteraciones de orden público, lesiones, homicidios y

\* Departamento de Química y Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Católica del Norte, Angamos 0610, Antofagasta, Chile.

\*\* Instituto de Investigaciones Forenses, Fiscalía General de la Republica. La Paz-Bolivia.

\*\*\* Estomatólogo Forense.

\*\*\*\* Presidente de la Sociedad Boliviana de Ciencias Forenses. Máster en Medicina Forense en la Universidad de Valencia-España. Creador, Coordinador Académico y Profesor del módulo de Patología Forense de la Maestría de Medicina Forense de la UMSA.

**Responsable:** Dr. Guillermo Rocabado. E: mail: guillermoroc@hotmail.com

por último un lugar destacado merecen los delitos de agresión sexual, sin olvidarnos de los delitos de circulación o accidentes de tráfico. En consecuencia, es importante su detección a partir de muestras obtenidas de personas con vida o a partir de muestras cadavéricas a efectos de establecer su presencia y cantidad de la misma, para orientar a la investigación forense.

La determinación del alcohol etílico resulta un problema para el analista forense, a la hora de establecer la concentración inicial y final en circulación sanguínea y determinar el estado de la víctima o cadáver, a este efecto se adopto la toma de muestras en otras matrices como el humor vítreo (HV), el líquido cefalorraquídeo (LCR), el líquido pericárdico (LP) o el líquido sinovial (LS). Pues cabe señalar que la determinación de alcohol en los exámenes de alcoholemia es muy empleada como estrategia de análisis, sin embargo otra alternativa es a través del empleo de biomarcadores de la ingesta de etanol, los cuales surgen del metabolismo y de los procesos bioquímicos del organismo.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Para el estudio se diseño un método de análisis e identificación realizada en el Instituto Anatómico Forense de Madrid-España (IAFM), por (Rocabado G.), este se basó en la determinación y cuantificación de ácido nicotínico, bajo su forma de ester etílico (método de extracción), de esta manera verificar mediante la cuantificación espectroscópica empleando un espectrofotómetro U.V. Visible, UV-VIS Spectrophotometer Double Beam, MAPADA UV-6300 PC with 8- HOLE AUTO CELL CHANGER. La determinación de ácido nicotínico bajo la forma de ester.

Se trabajo con 96 muestras biológicas de tejido cadavérico, obtenido de la región abdominal, de los cuales 45 muestras pertenecían a (TCFS) tejido cadavérico de fallecidos sobrios y 51 muestras a (TCFE) tejido cadavérico de

fallecidos con ingesta de etanol. Todos los tejidos se conservaron durante toda la experiencia congelados con nitrógeno líquido, hasta la utilización de los mismos. La extracción se realizo empleando la reacción del grupo carboxílico como base, segunda regla de los ácidos carboxílicos, tratándolo con etanol en medio ácido, y dejando esterificado al grupo carboxílico. Esto conociendo la capacidad que tiene el ácido nicotínico de esterificarse en presencia de etanol en medio ácido y se extrae como indicador de nicotinamida indirecta de tejidos.

El peso de cada una de las muestras sujetas a la extracción fue de 2g, el volumen de extracción de cada muestra fue 8 ml, de las mismas que se tomaron alícuotas de 2500  $\mu$ l, y posteriormente analizadas por U.V.

Para poder extrapolar los datos de la medición, se trabajo con una batería del ester de nicotina, (Nicotina 96 % de pureza HPLC SIGMA ®), a la que se esterifico con etanol absoluto (etanol 96 °GL PANREAC ® grado HPLC), a distintas concentraciones, con la que se realizo la curva patrón.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La extracción del ácido nicotínico, bajo la forma de ester, proporciono las concentraciones esperadas para poder ser determinadas mediante espectroscopia ultravioleta UV Vis, mediante el empleo de metanol en medio ácido, con un promedio de 4  $\mu$ g/2g= (2 $\mu$ g/g) $\pm$ 0,2 en (TCFE) y 7,7  $\mu$ g/2g= (3,85 $\mu$ g/g) $\pm$ 0,3 en (TCFS). Lo que refleja una disminución en la concentración de nicotinato o ácido nicotínico en su organismo, a causa del etanol por bloqueo y saturación de vías metabólicas del mismo.

La concentración en (TCFE), del éster del ácido nicotínico, mostro ser menores (2  $\mu$ g/g  $\pm$ 0,2 E.S.), comparada a los resultados obtenidos en tejidos de referencia (TCFS) (3,85  $\mu$ g/g  $\pm$  0,3 E.S.). Este resultado podría deberse a la saturación de los sistemas enzimáticos de degradación del etanol,

causando un bloqueo del sistema NAD de oxidación microsomal dependiente de NADP; por lo tanto destacar que el etanol puede influenciar el sistema enzimático NADPH, haciendo que a

concentraciones elevadas de etanol dicha capacidad se vea reducida y conduzca a un decaimiento de la formación de nicotinato.

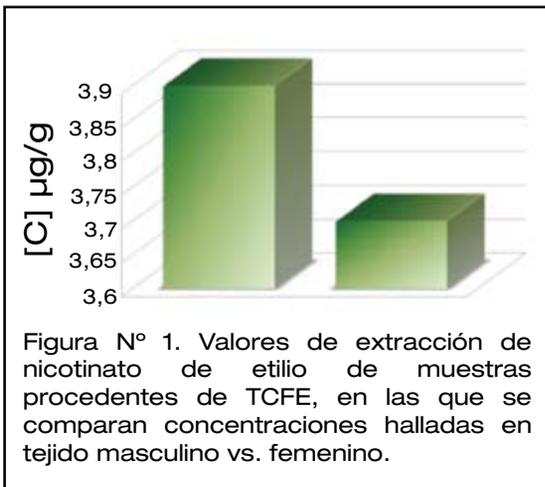
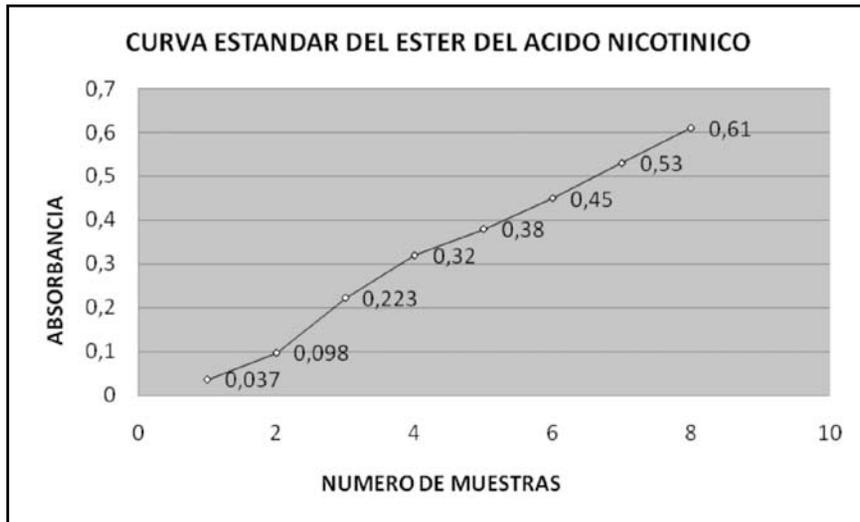


Figura N° 1. Valores de extracción de nicotinato de etilio de muestras procedentes de TCFE, en las que se comparan concentraciones halladas en tejido masculino vs. femenino.

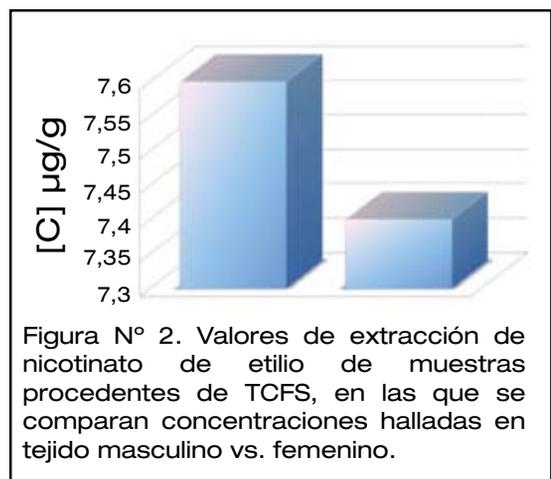


Figura N° 2. Valores de extracción de nicotinato de etilio de muestras procedentes de TCFS, en las que se comparan concentraciones halladas en tejido masculino vs. femenino.

### AGRADECIMIENTO

- A la Agencia Española de Cooperación Internacional (AECI).
- Al Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid-España.
- A la Sociedad Boliviana de Ciencias Forenses.

## REFERENCIAS

1. Alan Stevens, James Lowe. *Anatomía patológica*. Ed. Harcourt. Madrid. 2001.
2. Anderson, W. H. and Prouty, R. W. *Collection and storage of specimens for alcohol analysis*. In J. C. Garriot, Editor, *Medicolegal Aspects of Alcohol*. Lawyers and Judges Publishing Company, Co, United States of America, pp. 253-264 (chapter 11). (1996).
3. Appleby, A. John y Frank R. Foulkes. *Fuel Cell Handbook*. Van Nostrand Reinhold Co. 1989. New York.
4. Borkenstein, R. F., Smith, H. W. *The Breathalyzer and its Applications*. *Medicine, Science and the Law*. 2 (1962) pp. 13 a 22.
5. Browning, E. *Toxicity ana Metabolism of Industrial Solvents*. Elsevier Amsterdam 1965.
6. Burtis C. A., Ashwood E. R. *Tiezt Textbook of Clinical Chemysry*. Editorial Saunders, 2° Ed. 1994.
7. Caplan, Y. H. *Blood, urine and other fluid and tissue specimens for alcohol analyses*. In J. C. Garriot, Editor, *Medicolegal Aspects of Alcohol*. Lawyers and Judges Publishing Company, Co, United States of America, pp. 137-144 (chapter 5). (1996).
8. Centers for Disease Control and Prevention. *Guidelines for treatment of sexually transmitted diseases*. *Morbid Mortal Weekly Rep* 1998;47(no. RR-1):1—116. 1998.
9. Cook, D. S., Braithwaite, R. A. and Hale, K. A. *Estimating antemortem drug concentrations from postmortem blood samples: the influence of postmortem redistribution*, *J Clin Pathol*, 53, pp. 282-285. (2000).
10. Córdoba, D. *Toxicología*. (4ª ed.). Barcelona, España: Editorial Manual Moderno, pp. 379-386. (2000).
11. De Lima, V. and Midio, A. F. *Origin of blood ethanol in decomposed bodies*, *Forensic Sci. Int* . 106. pp. 157-162. (1999).
12. Dobowski, K. M. *Alcohol Detrmination. SomePhysiological and Metabolic Considerations*. *Alcohol and Traffic Safety*. B. H. Fox (ed.) 1963.
13. Dohil R, Israel DM, Hassall E. *Effective 2-wk therapy for Helicobacter pylori disease in children*. *Am J Gastroenterology* 92:244—7. 1997.
14. Draeger Hispania. *Manual de análisis de alcohol en el aire espirado*. 2000. Madrid.
15. Fennerty MB. *Primary sclerosing cholangitis and primary biliary cirrhosis; how effective is medical therapy?* *Postgrad Med* 94:81—92. 1993.
16. Garito, J. *CAnalysis for alcohol in postmortem specimens*. In J. C. Garriot, Editor, *Medicolegal Aspects of Alcohol*. Lawyers and Judges Publishing Company, Co, United States of America, pp. 151-165 (chapter 6) . (1996).
17. Gil E., Vargas F.; Robledo T. y Espiga I. *B Salud y Serie de informes técnicos n° 1*. Ministerio de Sanidad y Consumo. Madrid 1994.
18. Gisbert Calabuig J.A. , *Medicina Legal y Toxicología*, Editorial Masson, 5° Edición, Barcelona España, pag. 764 - 780. 2001.
19. GOODMAN, A. *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. Editorial Medica Panamericana, 8° ed., México 1996, p. 1789 - 54.
20. GOODMAN y GILLMAN. *Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. Editorial Panamericana, 8° ed., México 1991, p. 195-432.
21. Graham DY, Lew GM, Klein PD, et al. *Effect of treatment of Helicobacter pylori infection on the long-term recurrence of gastric or duodenal ulcer*. *Ann Intern Med* 116:705—8. 1992.
22. Guay DR, Meatherall RC, Baxter H et al. *Pharmacokinetics of metronidazole in patients undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis*. *Antimicrob Agents Chemother* 25:306—10. 1984.
23. Hadley, J. A. and Smith, G. S. *Evidence for an early onset of endogenous alcohol productions in bodies recovered from the water*, *Accident Anal. Prev*. 35, pp. 763-769. (2003).
24. Hargar, R. H. *B Body in Alcohol Determining for Methods Analytical Published*>National Highway Traffic Safety Administration. U.S. 1974.
25. Hentschel E, Brandstatter G, Dragosics B, et al. *Effect of ranitidine and amoxicillin plus metronidazole on the eradication of Helicobacter pylori and the recurrence of duodenal ulcer*. *N Engl J Med* 328:308—12. 1993.
26. Hepler, B. R. and Isenschmid, D. S. *Specimen selection, collection, preservation, and security*. In S. B. Karch, Editor, *Drug Abuse Handbook*. CRC Press, Boca Raton (1998), pp. 884- 900 (chapter 12. 2) (1998).
27. Israel DM, Hassall E. *Treatment and long-term follow-up of Helicobacter pylori-associated duodenal ulcer disease in children*. *J Pediatr* 123:53—8. 1993.
28. Jones, A. W. and Holmgren, P. *Uncertainty in estimating blood ethanol concentrations by analysis*

- of vitreous humour, *J Clin Pathol* , 54, pp. 699-702. (2001).
29. Jones, A. W. (Measuring Blood-Alcohol Concentration for Clinical and Forensic Purposes. In S. B. Karch, Editor, *Drug Abuse Handbook*. CRC Press, Boca Raton. pp. 340-360 (chapter 5.2) 1998).
  30. KATZUNG, G. Beltran. *Farmacología Básica y Clínica*. 7° ed., Editorial El Manual Moderno, Mexico DF., Santa Fe de Bogota 1999, p.669-673.
  31. Kugelberg, F. C. Results of ethanol analysis in postmortem specimens. *Forensic Science international*, U.S.A. 165, pp. 10-29. (2007).
  32. Kupfer, D. M., Chaturvedi, A. K. et al. Identification of postmortem microbial contaminants, *J. forensic Sci.* 44, pp. 592-596. (1999).
  33. Lau AH, Chang CW, Sabatini S. Hemodialysis clearance of metronidazole and its metabolites. *Antimicrob Agents Chemother*;29:235—8. 1986.
  34. Leikin, J. B. and Warson, W. A. Post-mortem Toxicology: What the dead can and cannot tell us, *J Toxicol Clin Toxicol.* 41, pp. 47-56. (2003).
  35. Lehninger, Albert L. *Bioquímica*. Editorial Omega. Barcelona 1987.
  36. Lewis, R. J., Johnson, R. D., Angier, M. K. and Vu, N. T. Ethanol formation in unadulterated postmortem tissues, *Forensic Sci. Int.*146, pp. 17-24. (2004).
  37. Ley de tráfico, circulación de vehículos y seguridad vial. Ed. Tecno. Grupo Anaya. 2002.
  38. Li ,G., Baker, S. P., Lamb, M. W., Qiang, Y. y McCarthy, M. L. (Characteristics of alcohol-related fatal general aviation crashes, *Accident anal.* 37, pp. 143-148. 2005).
  39. LITTER, Manuel. *Farmacología Experimental y Clínica*. 3° ed. , Buenos Aires, 1986, p. 1303-19; 608-38.
  40. Lundquist, F. And Wolthers, H. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 14, 265. 1958.
  41. Mario Martínez Ruiz, Antonio Aguilar Ros. *Manual de drogodependencias para enfermería*. pág.63-71. Ed. Díaz de Santos. Madrid, 2002.
  42. *Manual de protección ciudadana*". Ministerio Secretaría General de Gobierno. Santiago de Chile. 1995.
  43. Martínez-Ortiz JA\* ; Páez L von Saalfeld K. *Revista Costarricense de Cardiología Rev. costarric. cardiol* v.4 n.1 San José abr. 2002; Tratamiento de Dislipidemias con Acido Nicotínico.
  44. Mencías Rodríguez, E. y Mayero Franco, L.M. *Manual de toxicología básica*. Ed. Diaz-Santos. Madrid. 2000.
  45. Ministerio del Interior. *Reglamento General de Circulación*. 1999. Dirección General de Tráfico. PAGE, C.P., Curtis, M.J., Sutter, M.L., Walker, M.J., Hoffman, B.B., "Farmacología integrada". Harcourt Brace de España, (1998).
  46. Partipilo ML, Woster PS. The role of *Helicobacter pylori* in peptic ulcer disease. *Pharmacotherapy*: 13:330—9. 1993. Petković, S. M., Simić, M. A. and Vujić, D. N. Postmortem production of ethanol in different tissues under controlled experimental conditions, *J Forensic Sci.* 50, pp. 204-208. (2005).
  47. Piédrola Gil Gonzalo. *Medicina preventiva y salud pública*. Cap. 79. Alcohol y salud pública. V. Domínguez, A.L. Villarino, R. Herruzo y M. Conde. Masson. Barcelona, 2002.
  48. Pounder, D. J. and Jones, A. W. Measuring Alcohol Postmortem. In S. B. Karch, Editor, *Drug Abuse Handbook*. CRC Press, Boca Raton, pp. 369-387 (chapter 5.3) (1998).
  49. Simpson R., Braithwaite R. A, Jarvie D R, Screening for drugs of abuse II: cannabinoids, lysergic acid diethylamide, buprenorphine, methadone, barbiturates, benzodiazepines and other drugs. *Ann Clin Biochem*; 34: 460-510. 1997.
  50. Smith PD, moderator. *Gastrointestinal infections in AIDS*. *Ann Intern Med.*;116:63—77. 1992.
  51. Sylvester, P. A., Wong, N. A., Warren, B. F. and Ranson, D. L. Unacceptably high site variability in postmortem blood alcohol analysis, *J Clin Pathol* , 51, pp. 250-252. (1998).
  52. Wallach J. *Interpretación clínica de las pruebas de laboratorio*. Editorial Masson. 3ª Ed. 1998.
  53. Winek, C. L., Wahba, W. W., Windisch, R. M. and Winek, C. L. Jr. Serum alcohol concentrations in trauma patients determined by immunoassay versus gas chromatography, *Forensic Sci. Int.* 139, pp. 1-3 (2004).
  54. [www.mires/pnd/publica/html/delga/htm](http://www.mires/pnd/publica/html/delga/htm) Publicaciones de la delegación del Gobierno para el plan Nacional sobre drogas PDF y LMT/ drogas + información – riesgo, edición 2003/ de que drogas hablamos y a quienes les interesan.
  55. [www.europa.eu.int/scadplus/leg/es/s03000.htm](http://www.europa.eu.int/scadplus/leg/es/s03000.htm) Salud pública. Actividades de la Unión Europea.
  56. [www.TRAGGG.HTM](http://www.TRAGGG.HTM). Foros Internacionales. Argentina, España, México, Italia, Chile y América Latina. El Sagrado Corán y la Salud Group: Members, Posts: 69, Member No.: 102, Joined: 7-September 04.