



**El Trabajo Final Integrador (TFI) “INFLUENCIA DE LOS FACTORES DE
CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA EN LA DETERMINACIÓN DE
ALCOHOLEMIA”**

**Desarrollado por los Bqcos. Laura del Carmen Lanzaco y Pablo Gustavo Murúa,
alumnos de la ESPECIALIZACIÓN EN CRIMINALÍSTICA Y ACTIVIDADES
PERICIALES, ha sido dirigido por:**

**Prof. Bqco. Esp. Héctor Andrés Suarez
Director del Proyecto Integrador**

Córdoba, 2018



<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

**INFLUENCIA DE LOS FACTORES DE CONSERVACION DE LA MUESTRA EN
LA DETERMINACION DE ALCOHOLEMIA**

Dedicamos el presente trabajo a nuestras familias por el apoyo incondicional recibido en cada momento y por ser el mejor estímulo de superación para nosotros.

INFLUENCIA DE LOS FACTORES DE CONSERVACION DE LA MUESTRA EN LA DETERMINACION DE ALCOHOLEMIA

Agradecimientos:

Al Tribunal Superior de Justicia por solventar económicamente nuestra capacitación.

A las autoridades de la Dirección General de Policía Judicial y a la Jefa de la División Química Legal, Bqca. Laura Verónica Oviedo, por permitir el uso de instalaciones y equipos.

A nuestro Director, Bqco. Esp. Héctor Andrés Suarez por el apoyo y aporte científico brindados.

A los miembros del tribunal examinador por el tiempo dedicado a la lectura y corrección del trabajo.

A nuestras compañeras (Bqcas. Micaela Roca y Vilma Morichetti) del Área Química Analítica y en especial a la Bqca. Fernanda Luna por compartir generosamente información sobre el tema.

A las Bqcas. Leticia Costa y Soledad Argüello, por su colaboración en cálculos estadísticos.

A nuestras familias que asistieron con traducciones, presentación y edición.

**INFLUENCIA DE LOS FACTORES DE CONSERVACION DE LA MUESTRA EN
LA DETERMINACION DE ALCOHOLEMIA**

ÍNDICE GENERAL:

RESUMEN

SUMMARY

I. INTRODUCCIÓN.	3
II. OBJETIVOS.	4
III. MATERIALES Y MÉTODOS.	4
3.1. Equipamiento.	5
3.2. Reactivos.	6
3.3. Materiales.	6
3.4. Procesamiento de las muestras.	7
IV. RESULTADOS.	9
V. DISCUSIÓN.	25
VI. CONCLUSIONES.	26
VII. BIBLIOGRAFIA.	27

**INFLUENCIA DE LOS FACTORES DE CONSERVACION DE LA MUESTRA EN
LA DETERMINACION DE ALCOHOLEMIA**

ÍNDICE DE ABREVIATURAS:

etc.: etcétera.

gr/l.: gramos por litro.

hs.: horas.

min.: minutos.

ml.: mililitro.

mg.: miligramos.

ul.: microlitros.

INFLUENCIA DE LOS FACTORES DE CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA EN LA DETERMINACIÓN DE ALCOHOLEMIA

ÍNDICE DE FIGURAS:

1. Lecturas de etanolemia en función del tiempo, según la temperatura y la presencia/ausencia de NaF.	12
2. Medias de cada tratamiento, en función del tiempo, según la temperatura y la presencia/ausencia de NaF.	14
3. Lecturas de etanolemia en función del tiempo, según la temperatura y la presencia/ausencia de cámara de aire, para una concentración de 0,5 g/l.	17
4. Medias para la concentración de etanol de 0,5 g/l en función del tiempo, según la temperatura y la presencia/ausencia de cámara de aire.	18
5. Lecturas de etanolemia en función del tiempo, según la temperatura y la presencia/ausencia de cámara de aire, para la concentración de etanol de 1,5 g/l.	18
6. Medias para la concentración de etanol de 1,5 g/l en función del tiempo, según la temperatura y la presencia/ausencia de cámara de aire.	19
7. Lecturas de etanolemia en función del tiempo, según la temperatura y la presencia/ausencia de cámara de aire, para la concentración de etanol de 2,5 g/l.	20
8. Medias para la concentración de etanol de 2,5 g/l en función del tiempo, según la temperatura y la presencia/ausencia de cámara de aire.	21
9. Lecturas iniciales y a 15 días, de muestras forenses conservadas a 4° C.	23
10. Lecturas iniciales y a 15 días, de muestras forenses conservadas a 25° C.	24

INFLUENCIA DE LOS FACTORES DE CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA EN LA DETERMINACIÓN DE ALCOHOLEMIA

ÍNDICE DE TABLAS

1. Esquema de trabajo N° 1, influencia de la presencia/ausencia del conservante fluoruro de sodio y temperatura, sobre la generación de etanol.	7
2. Esquema de trabajo N° 2, influencia de la presencia/ausencia de cámara de aire y la temperatura, sobre la pérdida de etanol.	8
3. Resultados y valores promedio en función de las temperaturas de conservación y la presencia o no de conservante fluoruro de sodio, a tiempo 1.	10
4. Resultados y valores promedio en función de las temperaturas de conservación y la presencia o no de conservante fluoruro de sodio, a tiempo 2.	10
5. Resultados y valores promedio en función de las temperaturas de conservación y la presencia o no de conservante fluoruro de sodio, a tiempo 3.	11
6. Resultados y valores promedio en función de las temperaturas de conservación y la presencia o no de cámara de aire, a tiempo 1.	15
7. Resultados y valores promedio en función de las temperaturas de conservación y la presencia o no de cámara de aire, a tiempo 2.	16
8. Lecturas iniciales y a 15 días, de muestras forenses conservadas a 4° C.	21
9. Lecturas iniciales y a 15 días, de muestras forenses conservadas a 25° C.	22

INFLUENCIA DE LOS FACTORES DE CONSERVACION DE LA MUESTRA EN LA DETERMINACION DE ALCOHOLEMIA

RESUMEN

La determinación de etanol (alcohol etílico o simplemente alcohol) es uno de los análisis más frecuentemente solicitado en un laboratorio forense y posee consecuencias legales relevantes.

En el presente trabajo se abordan los aspectos relacionados con la obtención de la muestra biológica (sangre) y las condiciones de conservación que pueden afectar los resultados obtenidos. El propósito de este estudio fue optimizar la etapa preanalítica de la determinación de alcoholemia, con el objeto de lograr resultados incuestionables.

Se prepararon muestras de sangre entera obtenidas de donantes voluntarios, las cuales fueron alicuotadas y adicionadas con cantidades conocidas de etanol para obtener concentraciones finales de 0,5; 1,5 y 2,5 gr/l., además de una muestra sin agregado de alcohol etílico utilizada como blanco. Se sometió a las mismas a diferentes condiciones de preservación: presencia/ausencia de cámara de aire, temperatura, tiempo y presencia/ausencia de fluoruro de sodio (NaF) como conservante. Adicionalmente se examinaron muestras de procedencia forense, con un 50% de cámara de aire y anticoagulante EDTA, conservadas a dos temperaturas distintas por 15 días. La totalidad de las muestras, fueron analizadas mediante el método Head Space – Cromatografía Gaseosa con detector de ionización de llama (HS-GC-FID), a las 4hs, 15 días y 45 días posteriores a la toma, según tres esquemas de trabajo.

La utilización de NaF como conservante en muestras sanguíneas de donantes vivos, obtenidas bajo condiciones de esterilidad, no influyó en los resultados a los 15 y 45 días, tanto a los 4°C como a 25°C. La peor condición para la obtención de resultados reproducibles, fue la combinación de 25°C como temperatura de conservación y 50% de cámara de aire, perdiéndose entre el 12,1 y 30,4 % de alcohol a los 15 días. Las muestras forenses mostraron resultados coincidentes a los hallados “in vitro”.

Palabras clave: sangre, etanol, factores de conservación.

INFLUENCIA DE LOS FACTORES DE CONSERVACION DE LA MUESTRA EN LA DETERMINACION DE ALCOHOLEMIA

SUMMARY

Ethanol's determination is one of the most frequent requested analyses in a forensic lab, with relevant legal consequences.

The present study sought to assess aspects related to the biological sample (blood), and whether their preservation conditions can affect the results. The aim of this work was to optimize the pre-analytical phase of the ethanol's determination, an attempt to obtain unquestionable results.

Whole blood's samples from volunteer donors were aliquoted and added with known quantities of ethanol to obtain concentrations of 0,5; 1,5 and 2,5gr/l, besides of a sample without the addition of ethyl alcohol, that was considered a blank. These samples were submitted to different conditions of preservation: presence/absence of air chamber, temperature, time and presence/absence of sodium fluoride as a preservative. Additionally, forensic samples were examined, with a 50% of air chamber and EDTA as an anticoagulant, preserved under two different temperatures for 15 days. The totality of the samples were analyzed using the Head Space method- Gas Chromatography- with a flame ionization detector (HS-GC-FID), at different times: 4 hours, 15 days and 45 days, according to three work schemes.

The utilization of sodium fluoride as a preservative in blood's samples of living donors, under sterility conditions, failed to influence the results at the 15 and 45 days' time-point, both in samples preserved at 4°C and at 25°C. The worst condition for reproductibility was the combination of 25°C, as a preservation temperature, and 50% of air chamber, losing between 12 and 32% of alcohol in 15 days. The forensic samples showed similar results to those found "in vitro".

Keywords: blood, ethanol, conservation factors

I. INTRODUCCIÓN:

La determinación de alcohol etílico en humores o tejidos humanos es una de las prácticas analíticas más frecuente en un laboratorio forense. Los valores de concentración de alcohol en sangre son los parámetros utilizados para estratificar clínicamente si un paciente está bajo los efectos dañinos del alcohol. Su determinación posee importantes consecuencias legales, tanto en individuos vivos (conductores de vehículos bajos los efectos del alcohol, accidentes laborales, abusos sexuales y lesiones graves) como en casos postmortales por muertes violentas como suicidios y homicidios tanto dolosos como culposos (1) (2).

En los hechos delictivos ocurridos en Córdoba capital, las personas imputadas y damnificadas, son examinadas en los consultorios de Policía Judicial, por el médico de turno y durante dicho acto, se extraen las muestras para análisis toxicológicos. La recolección y conservación de las matrices biológicas en Policía Judicial, cumple con las recomendaciones de diferentes organizaciones nacionales e internacionales, al igual que la documentación que la acompañan.

La sangre se extrae en tubos plásticos tipo vacutainer, con anticoagulante EDTA. En ese momento, el médico genera un informe donde consta el examen clínico realizado, tipo del delito cometido, dependencia judicial interviniente, fechas y horas del hecho y de la recolección, nombre de la persona sometida a la revisión, el tipo de muestra biológica obtenida y los análisis solicitados. Los especímenes biológicos se conservan refrigerados hasta que son retirados por personal de Química Legal, momento en el que se controla la coincidencia de las muestras con las notas, se identifican ambos elementos con etiquetas adhesivas numeradas y se confecciona un registro del procedimiento que es firmado por ambas partes. A posteriori, se ingresan las muestras en el libro de la División y en el sistema informático, adjudicándoles un profesional que efectuará el análisis y un administrativo que transcribirá el correspondiente informe; por lo que cada paso de la cadena queda registrado y puede ser controlado (3).

Por el contrario, en los casos ocurridos en el interior provincial, la extracción de las muestras se efectúa en dispensarios, hospitales o clínicas, en donde por desconocimiento o falta de recursos, no se cumplen las normativas relacionadas con dichos procedimientos. A diario se observa la utilización de pequeños frascos de vidrio de reactivos reciclados o jeringas que suelen ser remitidas con las agujas correspondientes (con el consiguiente riesgo de accidentes) y a menudo sin anticoagulante lo que dificulta su análisis. Posteriormente, el espécimen biológico queda a resguardo transitorio en las comisarías por un tiempo (de días a meses), donde no siempre existen heladeras para mantenerlo refrigerado. Finalmente, personal policial efectúa el traslado de la

muestra (muchas veces sin respetar la cadena de frío), acompañada por una nota de remisión con datos similares a los de los consultorios médicos de Policía Judicial. Durante la recepción en el laboratorio, se corroboran los datos, se identifican muestras y notas con etiquetas numeradas y se continúa con el mismo procedimiento de las muestras extraídas en los consultorios médicos.

Por lo tanto, las condiciones de extracción, conservación y traslado de las muestras biológicas, son muy diferentes en la capital con respecto al interior provincial, lo que resulta inadmisibles dada la relevancia de la determinación de alcohol como prueba judicial.

En el presente trabajo se evalúan los aspectos relacionados a la correcta forma de efectuar la toma y preservación de muestras sanguíneas para el análisis de etanol y algunos factores internos y externos a las muestras, que pueden generar resultados conflictivos a la hora de interpretar los guarismos, tales como pérdidas y generación de alcohol en los recipientes donde son resguardadas las muestras.

II. OBJETIVOS:

Estudiar la influencia de los factores preanalíticos de conservación en las muestras sanguíneas preparadas en el laboratorio (temperatura, presencia de cámara de aire, tiempo de conservación, agregado de NaF) y su incidencia sobre la concentración de alcohol en las mismas.

Evaluar la influencia de cámara de aire y temperatura, sobre muestras de casos forenses reales receptados en el laboratorio de la División Química Legal.

Destacar la importancia de la calidad en la recolección del material biológico para el estudio de los niveles de etanol en el área criminalística y legal.

III. MATERIALES Y MÉTODOS:

A un pool de muestras de sangre entera de donantes vivos, se le adicionaron cantidades calculadas de etanol para obtener concentraciones finales de 0,5 - 1,5 y 2,5 gr/l, además de una muestra sin agregado de alcohol utilizada como blanco de muestra. Las mismas fueron sometidas a diferentes condiciones de preservación. Posteriormente fueron analizadas por cromatografía gaseosa con detector de ionización de llama con headspace, para determinar las concentraciones de etanol presente.

Se utilizó el programa InfoStat para el análisis estadístico, para las 12 combinaciones diferentes que surgieron de las temperaturas, presencia/ausencia de NaF y los 3 momentos de tiempo. (4).

3. 1. Equipamiento:

- Cromatógrafo de gases con detector de ionización de llama (GC FID), marca Agilent Technologies, modelo 7890A acoplado a un automuestreador de HS Agilent G1888 con capacidad para 70 muestras. El equipo operó con una columna capilar DB-ALC1 Agilent de 30 m x 0,320 mm diámetro interno y 1,80 µm de espesor de film. Se utilizó el software EZChrom Elite para el procesamiento de los datos.
- Estufa de cultivo marca Faeta.
- Heladera marca Patrick No Frost.

Características del equipamiento de Cromatografía Gaseosa con detector de ionización en llama:
(19), (20)

Variables	Valor
Automuestreador HS	
Temperatura del horno de muestras	60 °C
Temperatura del loop	70 °C
Temperatura línea de transferencia	80 °C
Tiempo de termostatzado	14,0 min
Agitación del vial	alta
Presión del vial	15 psi
Tiempo de presurización	0,15 min
Tiempo de llenado del loop	0,15 min
Tiempo de equilibrio del loop	0,08 min
Tiempo de inyección	0,50 min
Tiempo del ciclo	7,0 min
CG	

Temperatura del inyector	150 °C
Volumen de inyección	1 µL
Relación de split	1:5
Temperatura del horno	35 °C isotérmica
Tiempo de corrida	6 min
Flujo del gas carrier helio	5 mL/min
Presión en cabeza de columna	18 psi
FID	
Temperatura	300 °C
Flujo de hidrógeno	40 mL/min
Flujo de aire cromatográfico	450 mL/min
Flujo de make-up nitrógeno	25 mL/min

3. 2. Reactivos:

- Alcohol etílico grado HPLC, marca Sintorgan.
- Alcohol N- Propanol, grado HPLC, marca Sintorgan (estándar interno).
- Solución Fisiológica de Cloruro de Sodio marca Braun.
- Agua destilada calidad MILI Q.
- Generador de hidrógeno marca Parker modelo H2PEM165.
- Gas helio calidad cromatográfica.
- Gas aire calidad cromatográfica
- Solución de Hipoclorito al 5% para desinfectar superficies.

3. 3. Materiales:

- Viales de 10 ml de vidrio Agilent, con septa de silicona y precintos de aluminio, de 20 mm de diámetro.
- Tips de capacidad 1000 ul, color azul.
- Tips amarillos de capacidad 200 ul, color amarillo.
- Micropipeta automática de volumen variable marca Boeco, de 20-200 ul.
- Micropipeta de volumen fijo, marca eppendorf de 500 ul.
- Matraces de vidrio 100 ml.

- Gradillas plásticas.
- Tubos de polipropileno tipo vacutainer con fluoruro de sodio (5 mg para 2 ml de sangre).
- Tubos de polipropileno con tapa a presión azul, sin fluoruro de sodio.
- Guantes de látex o nitrilo.
- Selladores y desencapsuladores de viales marca Agilent.

3. 4. Procesamiento de las muestras:

Las muestras descritas fueron sometidas a diferentes condiciones de preservación según los siguientes esquemas de trabajo:

Esquema N° 1:

Se evaluó la posible generación de etanol in vitro bajo diferentes condiciones de temperatura, tiempo y presencia/ausencia del conservante NaF, en muestras de sangre de donantes vivos. Las lecturas se efectuaron por cuadruplicado utilizando una curva de calibración preexistente. El esquema se realizó a tiempo 1 = 4 horas, tiempo 2 = 15 días y tiempo 3= 45 días.

Tabla N° 1:

CONCENTRACIÓN DE ETANOL (gr/l)	TEMPERATURA (° C)	FLUORURO DE SODIO
0	4	SI
0	4	NO
0	25	SI
0	25	NO
2,5	4	SI
2,5	4	NO
2,5	25	SI
2,5	25	NO

Esquema N° 2:

Se observó la influencia de la temperatura y la presencia de cámara de aire en la pérdida del tóxico volátil, en muestras de sangre de donantes vivos con NaF. Las lecturas se efectuaron por cuadruplicado utilizando una curva de calibración preexistente. El esquema se realizó a tiempo 1= 4 horas y tiempo 2= 15 días.

Tabla N° 2:

CONCENTRACIÓN DE ETANOL (gr/l)	TEMP. (°C)	CÁMARA DE AIRE (50%)
0	4	SI
0	4	NO
0	25	SI
0	25	NO
0,5	4	SI
0,5	4	NO
0,5	25	SI
0,5	25	NO
1,5	4	SI
1,5	4	NO
1,5	25	SI
1,5	25	NO

2,5	4	SI
2,5	4	NO
2,5	25	SI
2,5	25	NO

Esquema N° 3:

Se examinaron 30 muestras de sangre de casos forenses, conservadas en tubos plásticos herméticos, con anticoagulante y un 50% de cámara de aire, a dos temperaturas distintas; la mitad de ellas se conservó a 4°C y la otra mitad a 25°C. Se realizaron dos lecturas, una inicial y la otra a los 15 días.

El procedimiento para el análisis de etanol se detalla a continuación (5):

- Homogeneizar con agitación manual suave el material biológico.
- Dispensar 500 µl de alcohol N- propanol de 1g/l (estándar interno) y luego 500 µl de muestra en un vial de 10 ml.
- Colocar el tapón de silicona con la cara de teflón hacia el interior del vial y el precinto, grafar perfectamente el vial verificando la hermeticidad manualmente, homogeneizar nuevamente.
- Colocar los viales en una gradilla de plástico con tapa, para su traslado al equipo, luego acomodarlos en el carrusel del HS para su posterior análisis.

IV. RESULTADOS:

Esquema N° 1:

En las siguientes tablas se muestran los resultados por cuadruplicado y los valores promedio en función de las temperaturas de conservación y la presencia o no de conservante NaF, a tiempo 1, 2 y 3.

Tabla N° 3, Tiempo 1 (4 hs):

CONDICIONES	LECTURAS				PROM.
0 gr/l 4° C con fluoruro de sodio	0	0	0	0	0
0 gr/l 4° C sin fluoruro de sodio	0	0	0	0	0
0 gr/l 25° C con fluoruro de sodio	0	0	0	0	0
0 gr/l 25° C sin fluoruro de sodio	0	0	0	0	0
2,5 gr/l 4° C con fluoruro de sodio	2,40	2,43	2,51	2,51	2.46
2,5 gr/l 4° C sin fluoruro de sodio	2,44	2,55	2,55	2,53	2.52
2,5 gr/l 25°C con fluoruro de sodio	2,44	2,51	2,49	2,51	2.49
2,5 gr/l 25°C sin fluoruro de sodio	2,47	2,41	2,53	2,50	2.48

Tabla N° 4, Tiempo 2 (15 días):

CONDICIONES	LECTURAS				PROM.
0 gr/l 4° C con fluoruro de sodio	0	0	0	0	0
0 gr/l 4° C sin fluoruro de sodio	0	0	0	0	0
0 gr/l 25° C con fluoruro de sodio	0	0	0	0	0
0 gr/l 25° C sin fluoruro de sodio	0	0	0	0	0
2,5 gr/l 4° C con fluoruro de sodio	2,41	2,40	2,49	2,48	2.44
2,5 gr/l 4° C sin fluoruro de sodio	2,50	2,44	2,52	2,53	2.49
2,5 gr/l 25° C con fluoruro de sodio	2,26	2,34	2,38	2,32	2.33

2,5 gr/l 25° C sin fluoruro de sodio	2,27	2,30	2,35	2,39	2.32
--------------------------------------	------	------	------	------	------

Tabla N° 5, Tiempo 3 (45 días):

CONDICIONES	LECTURAS				PROM.
0 gr/l 4° C con fluoruro de sodio	0	0	0	0	0
0 gr/l 4° C sin fluoruro de sodio	0	0	0	0	0
0 gr/l 25° C con fluoruro de sodio	0	0	0	0	0
0 gr/l 25° C sin fluoruro de sodio	0	0	0	0	0
2,5 gr/l 4° C con fluoruro de sodio	2,43	2,35	2,45	2,41	2.41
2,5 gr/l 4° C sin fluoruro de sodio	2,48	2,50	2,47	2,52	2.49
2,5 gr/l 25°C con fluoruro de sodio	2,22	2,30	2,31	2,29	2.28
2,5 gr/l 25° C sin fluoruro de sodio	2,21	2,33	2,38	2,30	2.30

Para el análisis estadístico se utilizó el programa InfoStat (19) considerando un modelo mixto que contenga: un término que representa a las diferentes 12 combinaciones que surgirán a partir de las 2 temperaturas, presencia/ausencia de NaF y los 3 momentos de tiempo, y otro término que represente a las lecturas de cada tubo. De este modo, en forma coloquial, el modelo expresaría:

Etanolemia= efecto fijo del tratamiento + efecto aleatorio de tubo

Este modelo indicó que los datos de etanolemia dependen del tratamiento dado a cada muestra de sangre (usar o no NaF, 25°C ó 4°C y realizar la determinación a las 4 horas, 15 días o 45 días) y que las lecturas obtenidas pueden estar correlacionadas dado que se hicieron en un mismo tubo.

Los datos se muestran en siguiente figura:

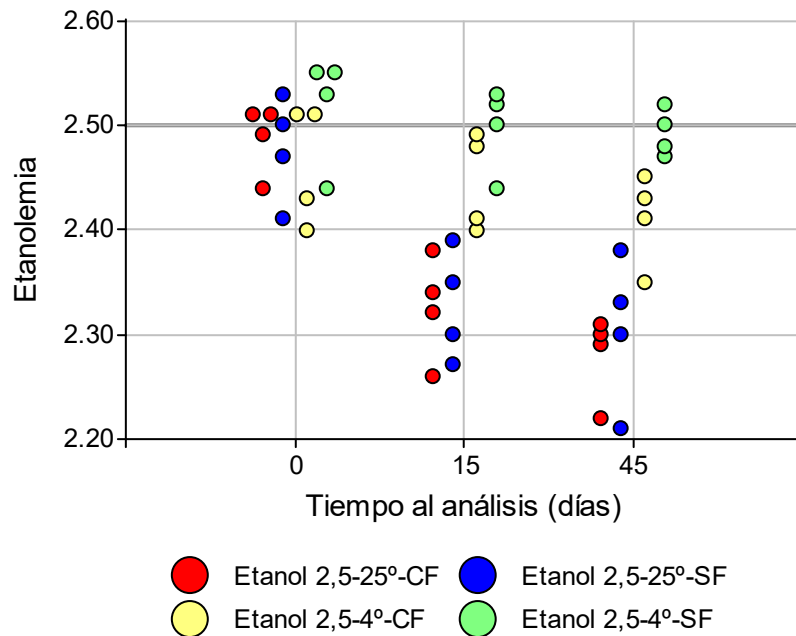


Figura N° 1: Lecturas de etanolemia en función del tiempo, según la temperatura y la presencia/ausencia de NaF.

Se puede observar que si no hay refrigeración con el transcurso del tiempo, las concentraciones de etanol tienden a ser menores que la inicial, se utilice o no conservante (con una pérdida entre el 5 y 10%).

El análisis de varianza tuvo como hipótesis nula que no hay diferencias entre las medias de los tratamientos (las 12 combinaciones). Corriendo el modelo propuesto, la prueba resultó significativa ($p < 0,0001$) y por ello luego se han comparado las medias mediante la prueba Di Rienzo, Guzmán, Casanoves (DGC) para detectar las diferencias (6).

Los resultados al comparar las medias fueron:

ETANOL - Medias ajustadas y errores estándares para TIEMPO_TRAT

DGC (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

TIEMPO_TRAT	Medias	E.E.		
0_2,5-4°-SF	2.52	0.02	A	
15_2,5-4°-SF	2.50	0.02	A	
45_2,5-4°-SF	2.49	0.02	A	
0_2,5-25°-CF	2.49	0.02	A	
0_2,5-25°-SF	2.48	0.02	A	
0_2,5-4°-CF	2.46	0.02	A	
15_2,5-4°-CF	2.45	0.02	A	
45_2,5-4°-CF	2.41	0.02		B
15_2,5-25°-SF	2.33	0.02		C
15_2,5-25°-CF	2.33	0.02		C
45_2,5-25°-SF	2.31	0.02		C
45_2,5-25°-CF	2.28	0.02		C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Si bien el modelo utilizado no aislaba los posibles efectos de interacción (dependencia o relación entre los factores), las interacciones pueden explorarse a través de las comparaciones de medias.

1-Analizando los perfiles de los tratamientos a lo largo del tiempo:

- A 4°C y sin usar NaF, no se detectaron diferencias significativas entre los 3 momentos de tiempo. Esto es, en las muestras refrigeradas y sin agregado de NaF, en promedio la etanolemia no se modificó al pasar el tiempo, sin generación “in vitro” de etanol.
- A 4°C y con uso de NaF, no se detectaron diferencias significativas entre los 2 primeros momentos de tiempo, pero en las muestras almacenadas por 45 días, la concentración de etanol resultó menor.
- A 25°C y sin usar NaF, los valores de etanolemia determinados a los 15 días fueron menores a los obtenidos a las 4 horas (con una pérdida entre el 5 y 10% probablemente por deficiente hermeticidad de los tubos utilizados). Luego, el paso del tiempo no produjo modificaciones.
- A 25°C y con uso de NaF, se obtuvo igual comportamiento que al no usar NaF.

2-Analizando los comportamientos de los tratamientos en cada tiempo:

- Entre las determinaciones realizadas a las 4 horas no se detectaron diferencias. Esto sugiere que: si la determinación de etanolemia se realiza a poco tiempo de extraer la muestra, no sería necesario usar conservante o refrigerar.
- Transcurridos 15 días, tanto en las muestras refrigeradas como en las mantenidas a 25°C, el valor de etanolemia no dependió de usar o no conservante, pero cabe señalar que los valores obtenidos a 25°C fueron significativamente menores que los correspondientes a 4°C. Los resultados sugieren que: en este estudio para almacenar las muestras por 15 días, no fue importante el agregado de NaF pero sí la refrigeración.
- Pasados los 45 días desde la obtención de las muestras, a 4°C y sin NaF no se modificó la etanolemia. En las restantes condiciones los valores obtenidos fueron menores al antes mencionado, no habiendo acción distintiva para el uso del NaF en las muestras a 25°C.

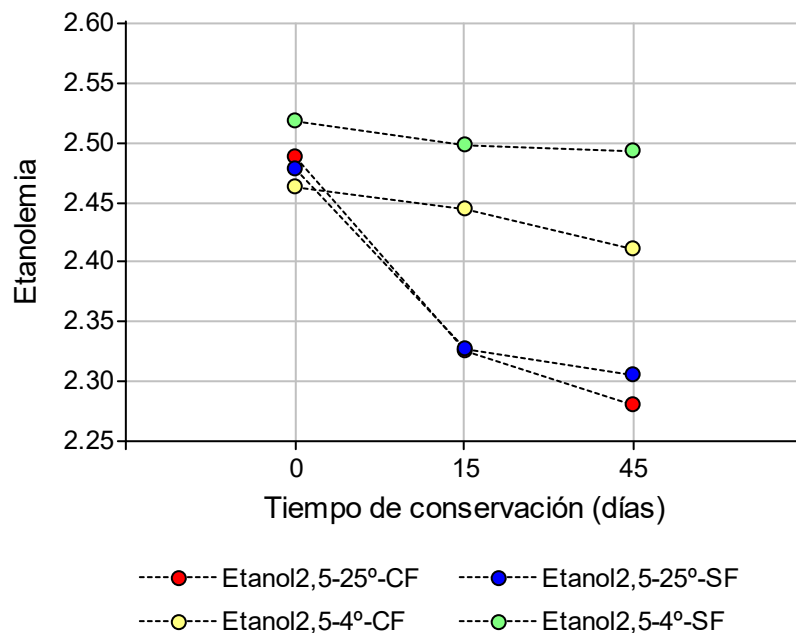


Figura N° 2: Medias en cada tratamiento, a lo largo del tiempo, según la temperatura y la presencia/ausencia de NaF.

Los resultados obtenidos bajo el protocolo 1 permiten demostrar que la temperatura de conservación resultó el factor más importante para mantener los niveles de etanolemia, siendo recomendable la refrigeración en las muestras que no se analizan dentro de las 4 horas de obtenido el material biológico.

Esquema N° 2:

En las siguientes tablas se muestran los resultados por cuadruplicado y los valores promedio en función de las temperaturas de conservación y la presencia o no de cámara de aire, obtenidos a tiempo 1 y 2.

Tabla N° 6, Tiempo 1 (4 hs):

CONDICIONES	CONCENTRACIONES (g/L)				PROM.
0 gr/l, 4° C, sin cámara de aire	0	0	0	0	0
0 gr/l, 4° C, con cámara de aire	0	0	0	0	0
0 gr/l, 25° C, sin cámara de aire	0	0	0	0	0
0 gr/l, 25° C, con cámara de aire	0	0	0	0	0
0,5 gr/l, 4° C, sin cámara de aire	0,46	0,47	0,48	0,48	0,47
0,5 gr/l, 4° C, con cámara de aire	0,43	0,45	0,45	0,45	0,45
0,5 gr/l, 25° C, sin cámara de aire	0,44	0,48	0,46	0,48	0,47
0,5 gr/l, 25° C, con cámara de aire	0,45	0,46	0,45	0,48	0,46
1,5 gr/l, 4° C, sin cámara de aire	1,38	1,41	1,51	1,46	1,44
1,5 gr/l, 4° C, con cámara de aire	1,39	1,39	1,46	1,47	1,43
1,5 gr/l, 25° C, sin cámara de aire	1,39	1,46	1,49	1,48	1,46
1,5 gr/l, 25° C, con cámara de aire	1,40	1,45	1,48	1,47	1,45
2,5 gr/l, 4° C, sin cámara de aire	2,32	2,42	2,40	2,41	2,39
2,5 gr/l, 4° C, con cámara de aire	2,33	2,44	2,47	2,49	2,43
2,5 gr/l, 25° C, sin cámara de aire	2,31	2,41	2,42	2,42	2,39
2,5 gr/l, 25° C, con cámara de aire	2,30	2,42	2,43	2,44	2,40

Tabla N° 7, Tiempo 2 (15 días):

CONDICIONES	CONCENTRACIONES (g/L)				PROM.
0 gr/l, 4° C, sin cámara de aire	0	0	0	0	0
0 gr/l, 4° C, con cámara de aire	0	0	0	0	0
0 gr/l, 25° C, sin cámara de aire	0	0	0	0	0
0 gr/l, 25° C, con cámara de aire	0	0	0	0	0
0,5 gr/l, 4° C, sin cámara de aire	0,47	0,46	0,48	0,48	0,47
0,5 gr/l, 4° C, con cámara de aire	0,47	0,47	0,48	0,49	0,48
0,5 gr/l, 25° C, sin cámara de aire	0,47	0,49	0,52	0,52	0,50
0,5 gr/l, 25° C, con cámara de aire	0,35	0,38	0,27	0,27	0,32
1,5 gr/l, 4° C, sin cámara de aire	1,42	1,42	1,47	1,43	1,44
1,5 gr/l, 4° C, con cámara de aire	1,39	1,40	1,43	1,45	1,42
1,5 gr/l, 25° C, sin cámara de aire	1,44	1,43	1,46	1,48	1,45
1,5 gr/l, 25° C, con cámara de aire	1,19	1,20	1,20	1,21	1,20
2,5 gr/l, 4° C, sin cámara de aire	2,44	2,39	2,44	2,43	2,43
2,5 gr/l, 4° C, con cámara de aire	2,46	2,40	2,41	2,43	2,43
2,5 gr/l, 25° C, sin cámara de aire	2,39	2,40	2,38	2,37	2,39
2,5 gr/l, 25° C, con cámara de aire	2,02	2,14	2,16	2,10	2,11

Se aplicó el mismo análisis estadístico que para el esquema 1; esto es, se ajustó el modelo utilizado para los datos del esquema 1 analizando separadamente lo ocurrido en cada concentración.

Los tratamientos considerados surgen de las combinaciones entre los niveles de temperatura, la presencia/ausencia de cámara de aire y el tiempo transcurrido al evaluar las muestras.

Bajo todas las concentraciones se pudo observar que pasados 15 días los niveles de etanol tendieron a ser menores cuando hubo cámara de aire y se usó una temperatura de 25°C.

En cada concentración, el análisis de la varianza resultó significativo ($p < 0,0001$) y confirmó que la única media estadísticamente diferente fue la obtenida a los 15 días en tubos con cámara de aire, conservados a 25°C. Los resultados obtenidos se exponen a continuación.

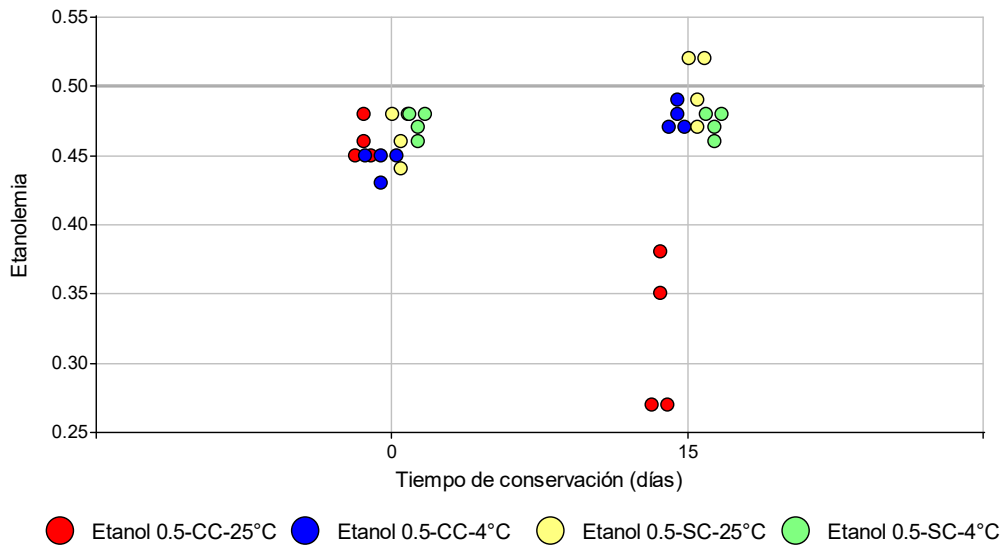


Figura N° 3: Lecturas de etanolemia en función del tiempo, según temperatura y la presencia/ausencia de cámara de aire, para la concentración de etanol de 0,5 g/l.

Los resultados de las comparaciones de medias se presentan a continuación.

Etanolemia - Medias ajustadas y errores estándares para Tratamiento

DGC (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

<u>Tratamiento</u>	<u>Medias</u>	<u>E.E.</u>	
SC-25°C-15 días	0.50	0.03	A
CC-4°C-15 días	0.48	0.03	A
SC-4°C-15 días	0.47	0.03	A
SC-4°C-4 horas	0.47	0.03	A
SC-25°C-4 horas	0.47	0.03	A
CC-25°C-4 horas	0.46	0.03	A
CC-4°C-4 horas	0.45	0.03	A
CC-25°C-15 días	0.32	0.03	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

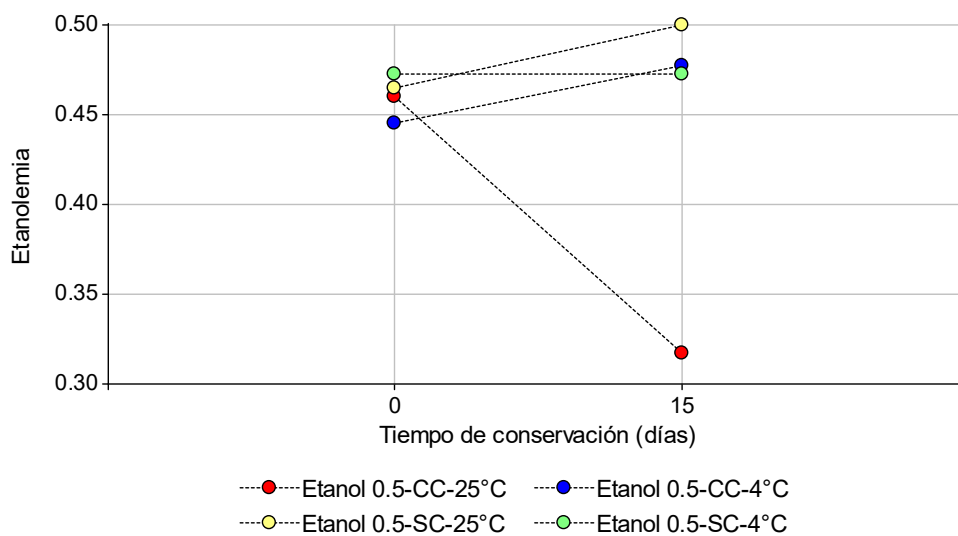


Figura N° 4: Medias para la concentración de etanol de 0,5 g/l en función del tiempo, según la temperatura y la presencia/ausencia de cámara de aire

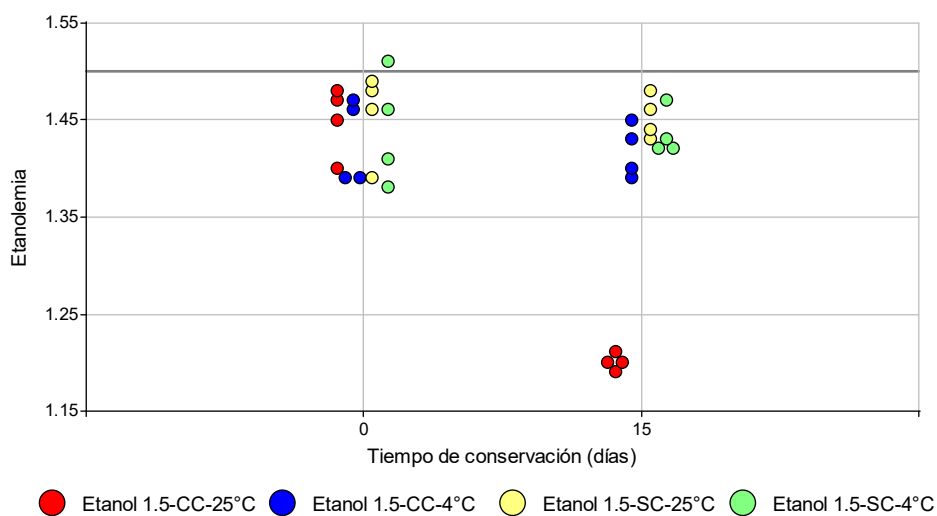


Figura N° 5: Lecturas de etanolemia en función del tiempo, según temperatura y la presencia/ausencia de cámara de aire, para la concentración de etanol de 1,5 g/l.

Los resultados de las comparaciones de medias se presentan a continuación.

Etanolemia - Medias ajustadas y errores estándares para Tratamiento

DGC ($\alpha=0.05$)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

Tratamiento	Medias	E.E.	
SC-25°C-15 días	1.46	0.04	A
SC-25°C-4 horas	1.45	0.04	A
CC-25°C-4 horas	1.45	0.04	A
SC-4°C-4 horas	1.44	0.04	A
SC-4°C-15 días	1.44	0.04	A
CC-4°C-4 horas	1.43	0.04	A
CC-4°C-15 días	1.42	0.04	A
CC-25°C-15 días	1.20	0.04	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

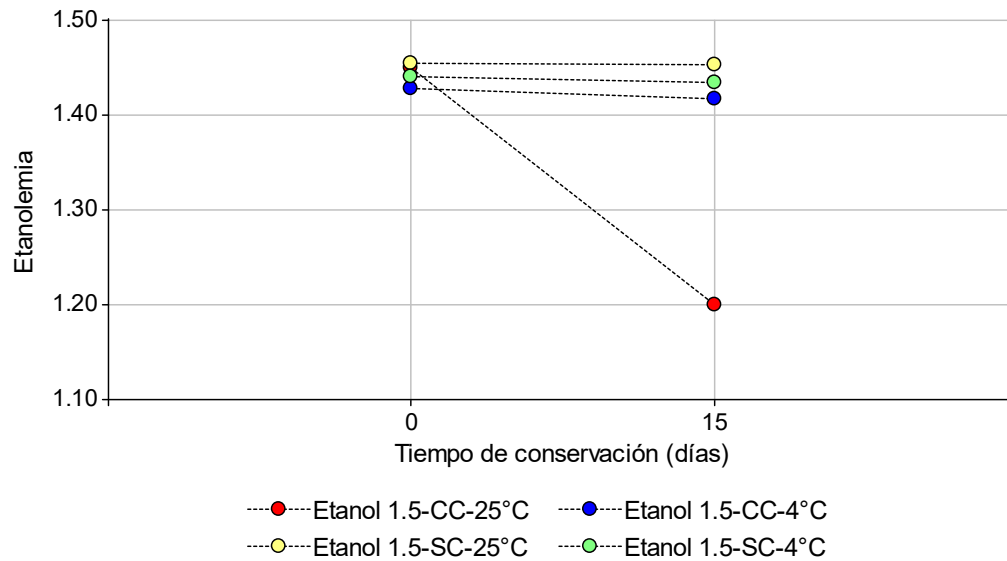


Figura N° 6: Medias para la concentración de etanol de 1,5 g/l, en función del tiempo, según temperatura y la presencia/ausencia de cámara de aire.

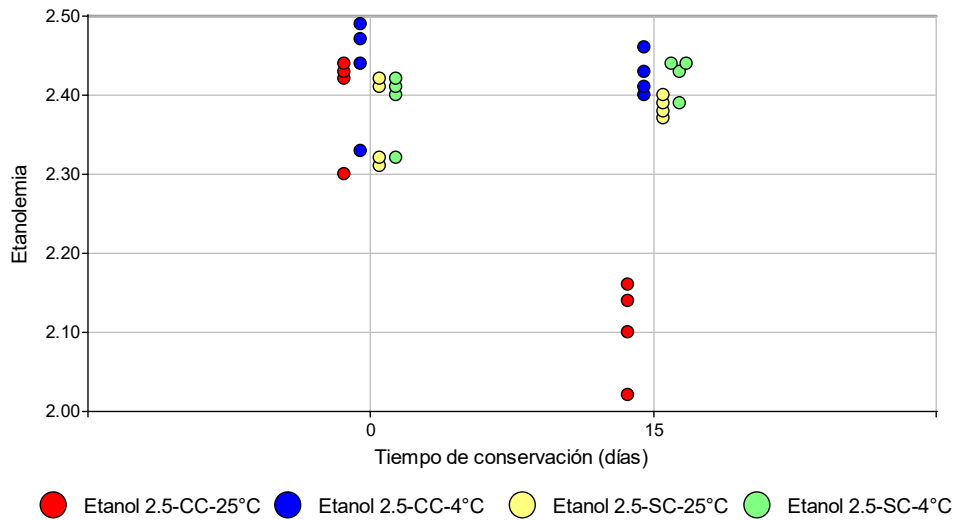


Figura N° 7: Lecturas de etanolemia en función del tiempo, según temperatura y la presencia/ausencia de cámara de aire, para la concentración de etanol de 2,5 g/l.

Los resultados de las comparaciones de medias se presentan a continuación.

Etanolemia - Medias ajustadas y errores estándares para Tratamiento

DGC (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

Tratamiento	Medias	E.E.	
CC-4°C-4 horas	2.43	0.05	A
CC-4°C-15 días	2.43	0.05	A
SC-4°C-15 días	2.43	0.05	A
CC-25°C-4 horas	2.40	0.05	A
SC-4°C-4 horas	2.39	0.05	A
SC-25°C-15 días	2.39	0.05	A
SC-25°C-4 horas	2.37	0.05	A
CC-25°C-15 días	2.11	0.05	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

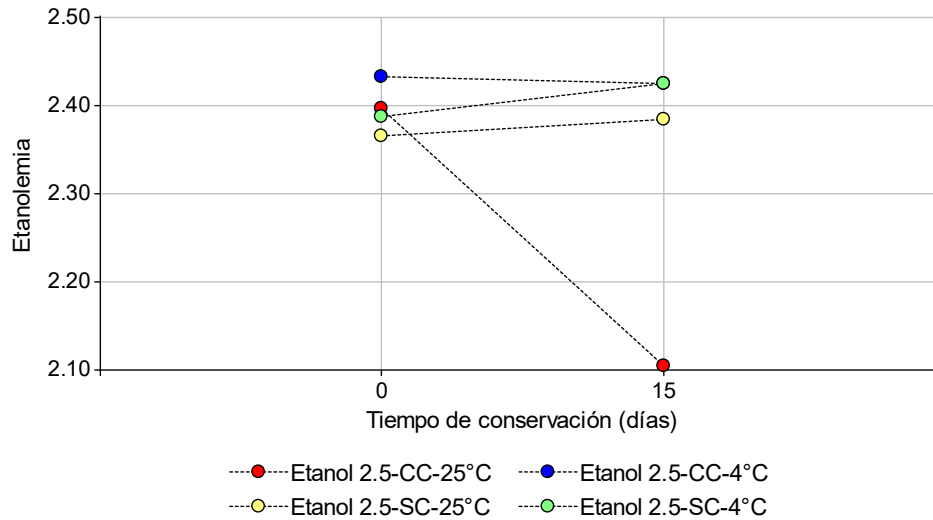


Figura N° 8: Medias para la concentración de etanol de 2,5 g/l en función del tiempo, según temperatura y la presencia/ausencia de cámara de aire.

Según los valores obtenidos a los 15 días, las pruebas estadísticas evaluadas en función de 3 concentraciones de etanol diferentes, frente a variables como temperatura y presencia de cámara de aire; se observaron diferencias estadísticamente significativas, entre las muestras con presencia y ausencia de cámara de aire mantenidas a 25°C (con pérdidas de etanol de 30,4% para la concentración de 0,5 g/l, 17,2% para la concentración de 1,5 g/l y de 12,1% para la 2,5 g/l). Las conservadas a 4°C, a pesar de presentar cámara de aire, no mostraron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de etanol.

Tabla N° 8, Esquema N° 3:

MUESTRA	TIEMPO "0"	15 DÍAS, A 4°C
1	1,31	1,40
2	0,91	0,99
3	1,19	1,13
4	0,19	0,17
5	0,88	0,87

6	1,77	1,98
7	1,20	1,10
8	1,48	1,48
9	1,00	0,90
10	1,83	1,93
11	0,72	0,69
12	2,19	2,23
13	0,94	0,91
14	0,76	0,71
15	0,56	0,53

Tabla N° 9, Esquema N° 3

MUESTRA	TIEMPO "0"	15 DIAS a 25°C
1	0,52	0,41
2	0,57	0,33
3	0,63	0,49
4	0,36	0,23
5	0,45	0,30
6	1,28	0,87
7	1,12	0,81
8	0,43	0,34

9	1,11	0,85
10	1,47	1,10
11	0,93	0,75
12	1,15	0,93
13	0,96	0,77
14	0,31	0,19
15	0,51	0,30

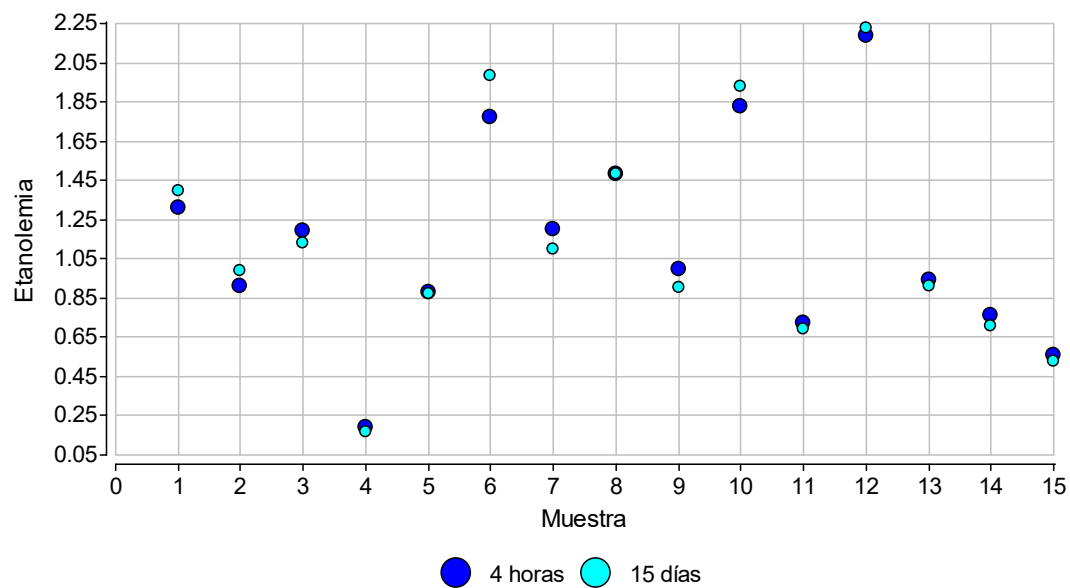


Figura N° 9: Concentraciones iniciales de etanol y a los 15 días, de muestras forenses conservadas a 4° C.

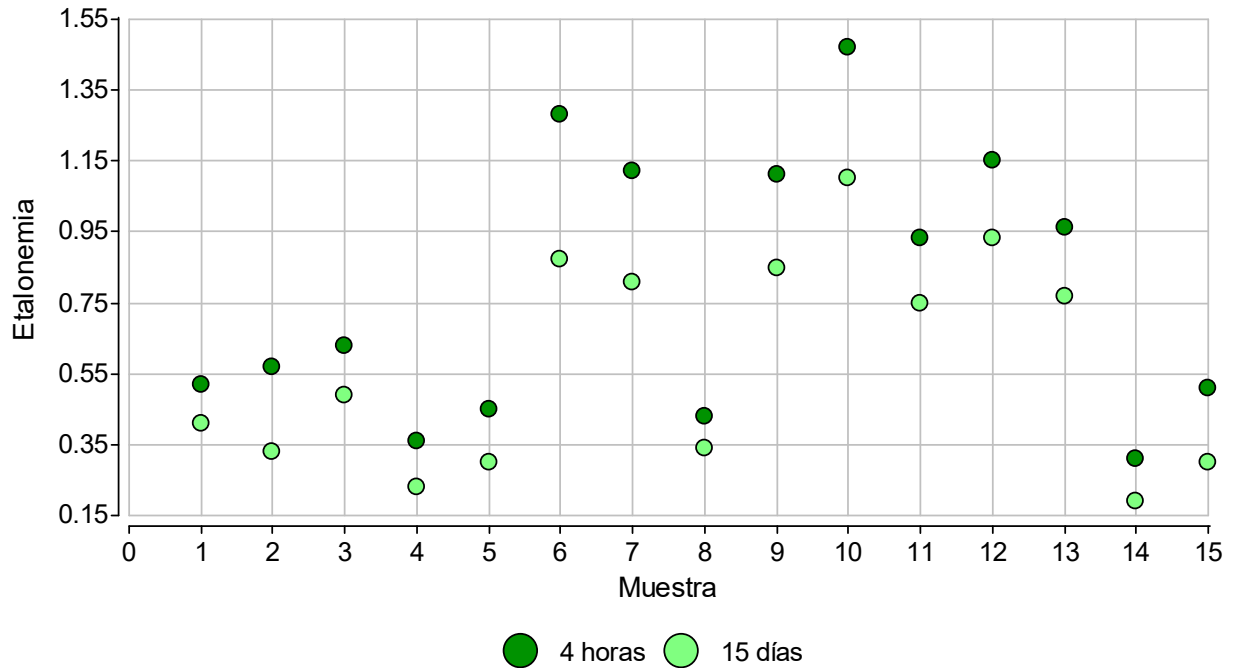


Figura N° 10: Concentraciones iniciales de etanol y a los 15 días, de muestras forenses conservadas a 25° C.

Los resultados en las muestras forenses con un 50% de cámara de aire, fueron coincidentes con los encontrados en las muestras con adición de etanol en la prueba experimental, en tanto que las conservadas a 4°C no evidenciaron cambios estadísticamente significativos, a diferencia de las conservadas a 25°C, en las que se observó una pérdida de etanol entre 19,1 y 42,1%.

Para cada una de las temperaturas de conservación, los datos fueron analizados mediante una prueba t para muestras apareadas, dado que se tienen dos lecturas hechas sobre cada tubo (en el tiempo inicial y transcurridos 15 días). La hipótesis nula establece que la media de las observaciones al tiempo inicial (T1) es igual a la media obtenida en observaciones realizadas a los 15 días (T2).

T°	N	Media(dif)	Media(T1)	Media(T2)	DE(dif)	LI(95%)	LS(95%)	T	p
4	15	-0.01	1.13	1.13	0.08	-0.05	0.04	-0.28	0.7863
25	15	0.21	0.79	0.58	0.10	0.16	0.26	8.46	<0.0001

En el análisis estadístico se puede observar que al conservar las muestras a 4°C, no se detectaron diferencias significativas, pero al hacerlo a 25°C, la media a los 15 días fue estadísticamente menor que la obtenida al inicio.

De esta manera, aquellas muestras conservadas a 25°C y analizadas 15 días después de obtenidas perdieron significativamente la concentración de alcohol.

V. DISCUSIÓN:

Las experiencias realizadas evidencian que los factores de conservación de la muestra pueden modificar la concentración de alcohol presente llevando a resultados incorrectos, por lo tanto es fundamental el cumplimiento de una adecuada etapa preanalítica.

Asimismo, la bibliografía consultada es concordante con estas valoraciones:

La temperatura de conservación del material biológico resultó el factor más importante para mantener los niveles de etanolemia, lo cual fue coincidente con los trabajos de otros autores, Winek y col. (1996) (7) y Ferrari y col. (2006) (8), que argumentaron que las muestras de sangre de personas vivas obtenidas con jeringa estéril y mantenidas a bajas temperaturas, pueden ser analizadas aún después de dos semanas sin cambios sustanciales.

El uso del fluoruro de sodio en las muestras procesadas en este trabajo, no fue relevante dado que se trataba de material de donantes vivos obtenido en condiciones de esterilidad, lo cual fue también reportado por los autores anteriormente citados; no así en muestras cadavéricas en las que la existencia de bacterias y hongos puede generar alcohol in vitro, según lo informado por O'Neal y Poklis (1996) (9) y Blume y Lakatua (1973) (10).

El cierre inadecuado de los recipientes contenedores y la presencia de cámara de aire en los mismos, son otros factores relevantes en la disminución de la concentración de alcohol, tal como fuera informado por Coloccia y Argeri (1969) (11), Parson (2002) (12) y Sreerama y Hardin (2003) (13).

La combinación de temperatura (25° C) y presencia de cámara de aire, fue la peor condición observada, con pérdidas de etanol significativas (entre 12,1 y 30,4%). Las muestras conservadas a 4°C, a pesar de presentar cámara de aire, no mostraron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de etanol. Estos resultados son similares a los hallados por Ferrari y col. (2006), quienes corroboraron que el factor más relevante en la pérdida de alcohol, era la presencia de cámara de aire (35%) y temperaturas de 25° C; con disminuciones de 33% en los valores de alcoholemia en las muestras conservadas por 15 días.

Las muestras de origen forense, presentaron un comportamiento similar a las adicionadas con alcohol, mostrando valores que decrecieron entre un 19,1 y un 42,1% a los 15 días de conservarse a 25° C, pero sin evidenciar cambios significativos a los 4°C.

Como posibles soluciones al problema planteado en relación de la toma de muestras en el interior de la provincia, se presentan dos probables alternativas:

En el corto plazo, realizar la capacitación del personal involucrado en la etapa preanalítica para generar conciencia sobre la relevancia de dicho proceso y la observancia de los documentos existentes. Asimismo, concientizar a las autoridades institucionales (Dirección General de Policía Judicial y Ministerio Público Fiscal), sobre la necesidad de mejorar la calidad de las muestras de sangre para la determinación de alcohol, proveyendo de los insumos necesarios y consensuando los criterios de aceptación/rechazo, según el cumplimiento o no de los protocolos de la División Química Legal.

En el largo plazo, solicitar la creación de delegaciones de Policía Judicial en las principales ciudades del interior provincial, con el fin de que el procedimiento de obtención, documentación y traslado sea equiparable en todo el territorio de la provincia.

VI. CONCLUSIONES:

- La presencia del conservante NaF en muestras de personas vivas, extraídas y preservadas en condiciones de esterilidad, a 4° y 25° C por 15 y 45 días, no fue un factor influyente en los resultados de alcoholemia.
- La combinación de una temperatura de 25°C y la presencia de cámara de aire (50%) fue la peor condición observada, con pérdidas de etanol entre el 12,1 y el 30,4 % a los 15 días; no así a 4° C y cámara de aire (50%), condición en la que no se observaron cambios significativos.
- La temperatura de conservación (4°C o 25°C) resultó ser el factor más importante para mantener los valores de etanolemia, siendo recomendable la refrigeración en las muestras que se analizan después de las 4 hs de obtenidas.
- Las muestras forenses presentaron resultados coincidentes a los de las adicionadas “in vitro” con etanol.
- Las diferentes condiciones de preservación de muestras sanguíneas utilizadas en el presente trabajo: 2 temperaturas (4° y 25° C), tres períodos de tiempo (4hs., 15 y 45 días) y dos porcentajes de cámara de aire (0 y 50%); mostraron resultados similares a los logrados por Ferrari y col. quienes experimentaron con tres temperaturas (25°, 4° y -0°C),

cinco proporciones de cámara de aire (0, 5, 20, 35 y 65%) y cinco períodos de tiempo (0, 3, 7, 15 y 30 días).

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. López Muñoz, F. (2015). Alcohol y Criminología: Un abordaje histórico. *Revista Aranzadi Doctrinal*. 5.
2. Gisberg Calabuig, J. A. (2004). *Medicina legal y toxicología*. 6 ed. Barcelona: Villanueva Cañadas. 878-891.
3. Ministerio Público Fiscal. Dirección General de Policía Judicial, División Química Legal(2014). *Protocolo para la recolección y traslado de muestras biológicas para estudios toxicológico*).
4. Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. *InfoStat versión (2017)*. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
5. Application StaticHeadspace Blood Alcohol Analysis with the G1888Network Headspace Sampler coupled to a 6890N gas chromatograph Agilent.
6. Di Rienzo, J.; A. Guzmán y F. Casanoves, (2001). A multiple comparisons method based on the distribution of the root node distance of a binary tree. *Journal of Agricultural, Biological and Environment Statistic*, 7 (1): 146- 159.
7. Winek, C. L., Winek, T. & Wahba, W. W. (1996). The effect of storage at various temperatures on blood alcohol concentration. *Forensic Sci. In*. 78, 179-185.
8. Ferrari, L. A., Triszcz, J. M., & Giannuzzi, L. (2006). Kinetics of degradation in forensic blood samples. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*. 161, 144-150.
9. O'Neal, C. and Poklis, A. (1996). Postmortem production of Ethanol and factors that influence interpretation. A critical review. *The Am. Journ. For. Med and Pathol*. 17: 8-20.
10. Blume, P. and Lakatua, D. J. (1973). The effect of microbial contamination of the blood sample on the determination of ethanol levels in serum. *Am. J. Clin. Pathol*. 60, 700-702.
11. Coloccia, E. y Argeri, N. (1969). Alcoholemia: Interpretación Legal y su determinación por el método de microdifusión. *Acta Bioquim.Clín. Latinoam*. 3, 96-110.
12. Parson, B. (2002). Blood alcohol question. *The TIAFT Mailing list*.

13. Sreerama, L. & Hardin, G.G. (2003). Improper sealing caused by the Styrofoam integrity seals in leak proof plastic bottle sealed to significant loss of ethanol in frozen evidentiary urine samples. *J. Forensic Sci.* 48 (3), 672-676.