



**ACADEMIA DE POLICÍA
“WALTER MENDOZA MARTÍNEZ”
INSTITUTO DE ESTUDIOS SUPERIORES**



**POSTGRADO EN CRIMINALISTICA
TESIS PARA OPTAR AL TITULO DE PERITO QUIMICO**

TEMA:

**VERIFICACION DE LA LINEALIDAD DEL MÉTODO PARA
DETERMINAR ALCOHOLEMIA POR CROMATOGRFÍA DE GAS.**

PRESENTADO POR:

**ING. ARMANDO SALVADOR ARCE VALLE
ING. JULIO CESAR MONDOY PEREZ**

MANAGUA, 18 DE MAYO DEL 2006.

DEDICATORIA

A NUESTRO DIOS, QUE NOS PERMITE TENER LA SABIDURÍA, INTELIGENCIA Y CONOCIMIENTO PARA LA ELABORACIÓN DE ESTE TRABAJO.

A NUESTRAS MADRES QUE NOS HAN APOYADO INCONDICIONALMENTE CON EL ANEHELO DE AYUDAR EN NUESTRA LABOR A FAVOR DE LA SOCIEDAD NICARAGÜENSE.

A NUESTROS AMIGOS QUE DE ALGUNA MANERA CONTRIBUYERON CON SU EXPERIENCIA Y NOS DIERON EL APORTE NECESARIO PARA REALIZAR EL ESTUDIO.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS QUE NOS HA GUIADO PARA ALCANZAR NUESTRAS METAS.

A NUESTRAS MADRES, ESPOSAS, HIJOS Y AMIGOS QUE EN TODO MOMENTO NOS HAN BRINDADO SU APOYO Y COMPRENSIÓN.

A NUESTRA ASESOR, Lic. FRANCISCO ARMANDO PEREZ GARCIA, QUIEN NOS ORIENTO Y AYUDO PARA PODER ELABORAR ESTA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA.

A TODOS LOS AMIGOS Y PERSONAS QUE NOS AYUDARON DE DIVERSAS FORMAS, EN ESPECIAL AL SUBMISIONADO ABELARDO ALVARADO MARTINEZ E ING. RAMONA MEDINA OPORTA.

INDICE

INTRODUCCION	1
1.1 Aspectos Introdutorios	1
1.2 Justificación	3
1.3 Problema	4
1.4 Metodología	5
1.5 Hipótesis	6
1.6 Objetivos General y Específicos	7
1.7 Marco Teórico	8
1.7.1 Toxocinética	9
1.7.1.1 Absorción	9
1.7.1.2 Distribución	10
1.7.1.3 Metabolismo	10
1.7.2 Factores que Modifican la Cinética del Etanol	11
1.7.2.1 Edad	11
1.7.2.2 Consumo Cronico de Alcohol	12
1.7.2.3 Ayuno	12
1.7.2.4 Sexo	12
1.7.2.5 Tabaquismo	12
1.7.2.6 Peso	12
1.7.2.7 Interacción con Fármacos	13
1.7.3 Tipos de Muestras para Análisis de Alcoholemia	13
1.7.4 Cromatografía de Gas	15
1.7.4.1 Representación del Cromatógrafo de Gas	15
1.7.4.2 Parámetros Relevantes en un Cromatógrama de Gas	16
1.7.4.2.1 Tiempo de Retención	16
1.7.4.2.2 Área del Pico	17
1.7.4.2.3 Factor de Capacidad	18
1.7.4.2.4 Platos Teóricos	19
1.7.4.2.5 Factor de Selectividad	19
1.7.4.2.6 Resolución	19
1.7.4.3 Calibración del Cromatógrafo de Gas	20
1.7.4.3.1 Modelos de Calibración	21
1.7.4.4 Protocolos de Calibración	23
1.7.4.4.1 Calibración Externa	23
1.7.4.4.2 Calibración Interna	23
1.7.4.4.3 Método de Dilución Isotópica	24

1.7.4.4.4	Agregado Patrón	24
1.7.5	Verificación de Linealidad	24
2	DISEÑO METODOLOGICO	26
2.1	Tipo de Estudio	26
2.2	Universo	26
2.3	Instrumentos de Recolección de la Información	26
2.4	Montaje del Método de Determinación de Alcohol en Sangre por Cromatografía de Gas	26
2.4.1	Materiales	27
2.4.2	Reactivos	27
2.4.3	Equipos	27
2.4.4	Preparación del Reactivo Patrón	27
2.4.5	Preparación del Patrón Interno	28
2.4.6	Preparación del Reactivo Iónico	28
2.4.7	Procedimiento para la Preparación de Muestras	29
2.5	Construcción de la Curva de Calibración	29
2.6	Verificación de la Linealidad del Método	29
2.6.1	Regresión por Mínimos Cuadrados	30
3	PRESENTACION Y DISCUSION DE RESULTADOS	32
	Capitulo 3.1 Cálculos para la Preparación del Reactivo Patrón	32
	Capitulo 3.2 Áreas del Etano y Propanol Leídas en el Cromatograma	34
	Capitulo 3.3 Procesamiento de la Información en Microsoft Excel	35
4	CONCLUSIONES	37
5	RECOMENDACIONES	38
6	BIBLIOGRAFIA	39
7.	GLOSARIO	41
	ANEXOS	43

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.7.1	Concentración y Efecto de las Diferentes Alcoholemias	15
Tabla 2.1	Patrones Standars para Calibrar el Método “Determinación de Alcoholemia”	28
Tabla 3.1	Áreas de Etanol y N-Propanol leídas en los Cromatogramas	34
Tabla 3.2	Datos Procesados en Microsoft Excel	35

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.7.1	Distribución de Alcohol en el Cuerpo	11
Figura 1.7.2	Esquema del Cromatógrafo de Gas	16
Figura 1.7.3	Ilustración de un Cromatograma	18
Figura 3.1	R_i Versus Concentraciones (g/L)	36

1. INTRODUCCION

En este capítulo se presentan los Aspectos Introdutorios, Justificación, Problema de la Investigación, Metodología utilizada, Hipótesis, Marco Teórico, Objetivos General y Específicos.

1.1 ASPECTOS INTRODUTORIOS

El alcoholismo es una causa de degeneración orgánica y psíquica (aspecto social). De acuerdo a la mayor parte de las estadísticas, aproximadamente el 10% de la población adulta tiene patrones de consumo patológico de alcohol. Por tanto, el alcoholismo es un problema médico-social, tanto en sus orígenes como en sus consecuencias y al tiempo es un problema de salud individual. El problema económico, social y sanitario que genera el alcoholismo, es sin duda muy superior al de los otros tóxicos sociales (tabaco, narcóticos, alucinógenos, etc.)

Está ampliamente demostrada la relación directa entre la concentración de alcohol en la sangre y el grado en que las reacciones y las decisiones del ser humano se ven afectadas. El estudio de todo lo referente a esta sustancia es de un alto interés, tanto científico como humano.

El método de oxidación-reducción fue el primero que se utilizó en el Laboratorio Central de Criminalística con el nombre de método de Widmark, para determinar alcohol etílico en sangre líquida, este fue introducido por la hermana república de Cuba durante el periodo de los 80's, como un aporte para el desarrollo y modernización de técnicas científicas de investigación criminalística.

Desde el año 1996, es aplicado en el Laboratorio Central de Criminalística de la Policía Nacional de Nicaragua el método de determinación de alcohol etílico en sangre líquida por cromatografía de gas, tanto el método como la técnica, fueron aportados por la Cooperación Española. En el año 1998, se deja de aplicar la cromatografía de gas debido a la desestabilización del sistema electrónico del equipo, y es hasta en el año 2003 que se logra poner nuevamente en funcionamiento. Han transcurrido aproximadamente seis años desde que se inicia a aplicar la técnica de cromatografía de gas para determinar alcohol etílico en sangre líquida, sin embargo hasta la actualidad el método, no ha sido sometido a un proceso de verificación y mucho menos de validación.

Debido a la gran responsabilidad que conllevan los resultados de los análisis emitidos en los informes periciales del Laboratorio Central de Criminalística ante la sociedad de Nicaragua, este estudio se enfoca en verificar la capacidad del método de alcoholemia de producir resultados que son directamente proporcionales a la concentración de etanol en sangre líquida.

El Laboratorio Central de Criminalística esta en camino a ser un laboratorio acreditado de alta competencia técnica de acuerdo a la norma ISO 17025. El cumplimiento de la norma ISO 17025 supone la incorporación en los procedimientos de trabajo de nuevos requisitos técnicos, de gestión y organización. El estudio sobre la verificación de la linealidad del método de alcoholemia juega un papel fundamental en el proceso de acreditación ya que es una guía sobre si se debe validar el método, modificarlo o desecharlo.

1.2. JUSTIFICACION

El método para determinar alcoholemia, por cromatografía de gas, aplicado actualmente y facilitado por la cooperación española en su noble propósito de contribuir a la modernización de métodos y técnicas científicas del laboratorio central de criminalística, no tiene ningún estudio, que demuestre en términos cuantitativos su confiabilidad.

Reviste gran importancia realizar un estudio experimental, que permita demostrar la confiabilidad de la técnica cromatográfica para determinar alcoholemia, y para lograr establecer un procedimiento adecuado sobre la calibración y verificación de la linealidad de la misma.

1.3. PROBLEMA DE LA INVESTIGACION

El Laboratorio Central de Criminalística de la Policía Nacional de Nicaragua, cuantifica el grado de intoxicación de personas por alcohol en la sangre, a través de la técnica cromatográfica de gas, pero no hay un estudio que sustente la confiabilidad de esta determinación que se emite en los peritajes químicos y es defendida en juicio oral y publico.

La falta de un estudio que verifique la confiabilidad del método para determinar alcoholemia por cromatografía de gas, puede originar ante los tribunales de justicia y por ende ante la sociedad nicaragüense, una percepción de desconfianza sobre la forma en que el Laboratorio Central de Criminalística de la Policía Nacional contribuye en el esclarecimiento de una gran cantidad de hechos delictivos en los que se ven involucrados sujetos sospechosos de haber consumido alcohol.

1.4 METODOLOGÍA

Para verificar la linealidad del método para determinar alcoholemia por cromatografía de gas se siguió la siguiente metodología ⁽⁶⁾:

- ✓ Se Prepararon soluciones de muestra a seis niveles de concentración, los cuales se encuentran dentro de los intervalos establecidos para este tipo de análisis.
- ✓ Se evaluó estadísticamente la regresión lineal del método.
- ✓ Se Calculó el coeficiente de regresión con la totalidad de los datos

1.5 HIPÓTESIS

La Linealidad del Método de Determinación de Alcoholemia por Cromatografía de Gas, permite afirmar que este método es adecuado para efectuar los análisis de las pericias químicas relacionadas con alcohol etílico en sangre líquida.

1.6 OBJETIVOS

1.6.1 OBJETIVO GENERAL

Verificar la linealidad del Método para Determinar Alcoholemia por Cromatografía de Gas a través del calculo del Coeficiente de Regresión Lineal (r).

1.6.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Describir el procedimiento analítico para realizar La Verificación de la Linealidad del Método para Determinar Alcoholemia por Cromatografía de Gas.
2. Aplicar el modelo lineal de la ecuación de la recta punto-pendiente, para obtener el coeficiente de linealidad a través del Método de Regresión Lineal.

1.7 MARCO TEORICO

El Etanol es una sustancia de Importancia toxicológica dada su acción farmacológica depresora del sistema nervioso central (SNC) y el abuso creciente del consumo de bebidas alcohólicas lo convierte en un problema de importancia médico-social debido a que los individuos alcoholizados pueden ser causa de trastornos y accidentes de los cuales son imputables.

Las vías de penetración posibles de los alcoholes son la digestiva, la respiratoria, y la absorción a través de la piel. En el caso del etanol, la intoxicación más frecuente ocurre cuando el individuo ingiere cantidades excesivas de esta sustancia por el consumo de bebidas alcohólicas fermentadas y/o destiladas ⁽¹⁾.

Las bebidas alcohólicas se emplean desde la antigüedad como forma de almacenar alimentos, pueden dividirse en tres grupos ⁽²⁾:

I. Bebidas De Bajo Contenido Alcohólico

Se tratan fundamentalmente de las cervezas, con graduaciones alcohólicas de 2 a 6 °.

II. Bebidas De Contenido Alcohólico Medio

Se trata fundamentalmente de los vinos, con graduaciones que oscilan entre los 6-8 ° de los vinos afrutados jóvenes a los 18-20 ° de vinos excepcionalmente Ofuertes. Por termino medio, los vinos de mesa tienen entre 11y 14 °.

1. Ladron J. *Toxicología Medica. McGraw-Hill-Interamericana de España. Madrid. 1995.*
2. Belitz H.D. *Química de los Alimentos. ACRIBIA, S.A. Zaragoza, España. 1988.*

III. Bebidas Destiladas

Se trata de bebidas obtenidas por destilación de vinos (brandy) o fermentos de maltas (whisky, ginebra, etc.) u otras soluciones azucaradas. Actualmente, salvo bebidas de gran calidad o regidas en fabricación por normas muy estrictas, suele recurrirse a proceso de fabricación denominado eufemísticamente destilación en frío, consiste en la mezcla de alcohol, agua y otros aditivos. Estas bebidas suelen tener una graduación de 40-50 °, pero frecuentemente la superan, incluso sin anunciarlo en la etiqueta con el fin de disimular mediante el sabor ardiente del alcohol la escasa calidad del producto. Algunas bebidas destiladas alcanzan hasta 80 °. Este grupo de bebidas no sólo resultan tóxicas por el etanol, sino por otros compuestos que sirven para darles sus especiales características organolépticas, pero también tienen efectos tóxicos específicos.

1.7.1 TOXOCINÉTICA

El alcohol pasa del estomago a la sangre por simple mecanismo de difusión, al cabo de una o media hora y se reparte por todo el organismo.

La defensa del organismo contra la intoxicación, viene en seguida por la oxidación y eliminación de etanol ⁽¹⁾.

1.7.1.1 Absorción

La gran solubilidad del etanol en agua y grasas le permite atravesar fácilmente por difusión pasiva las distintas membranas biológicas, pudiendo ser absorbido por cualquier vía, y distribuyéndose rápidamente en el organismo. La ruta mas importante es la digestiva. Entre los 30-60 minutos siguientes a su ingestión se absorbe aproximadamente el 80-90 % de la dosis.

El contenido gástrico, y las comidas grasas específicas, frenan notablemente la absorción y multiplican por dos o tres el tiempo de la misma. Puesto que las bacterias del lumen del tubo digestivo son capaces de metabolizar el metanol, si el tiempo es prolongado (2-3 horas), hasta un 20% de la dosis ingerida puede ser catabolizada de esta forma.

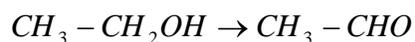
1.7.1.2 Distribución

El etanol se distribuye rápidamente en los tejidos, de acuerdo a su contenido en agua. Los tejidos más perfundidos componen su compartimento superficial. La mayor parte del alcohol circula en agua plasmática, manteniéndose una relación de 1.3/1 en su concentración entre plasma y sangre total.

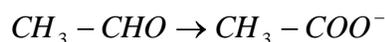
1.7.1.3 Metabolismo

Dependiendo de la velocidad de ingreso, aproximadamente el 80-90 % del etanol absorbido se metaboliza. Puesto que el etanol se produce en numerosos procesos de fermentación, incluso espontáneos, el organismo humano esta bien adaptado a su metabolización en la que se obtiene 7.1 kcal/g. El metabolismo, y por tanto en términos generales la eliminación del etanol sigue un proceso cinético de orden cero a partir de alcoholemias superiores a 0.16 g/L. La velocidad media de disminución de la alcoholemia es de 15-20 mg/dL/h (0.15-0.2 g/L/h). Existen tres grupos de enzimas que oxidan el alcohol, la ADH (alcohol deshidrogenasa), el MAOS (sistema microsomal oxidante de etanol) y las catalasas, las cuales eliminan un átomo de hidrogeno de la molécula produciendo acetaldehído. La mayor parte de su proceso biotransformativo se desarrolla en el hígado, si bien otros tejidos, como el riñón, intestino etc. son también metabólicamente activos.

Etanol → acetaldehído



Acetaldehído → acetato



Efectuado por el sistema enzimático, la combustión completa llega a bióxido de carbono y agua con desprendimiento de 7.1 cal/g de alcohol. La eliminación de alcohol se hace

por medio de los pulmones y riñones pasa a la orina por difusión a una concentración próxima a la de la sangre. La desintoxicación por vía pulmonar y renal, no representa mas que el 1 al 5 % .

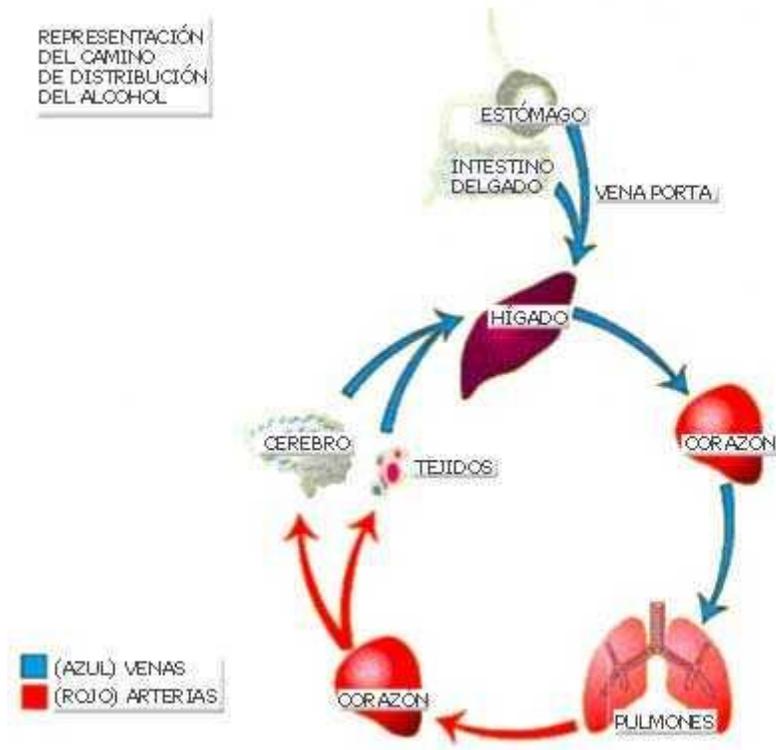


Fig. 1.7.1 Distribución del Alcohol en el Cuerpo

1.7.2 FACTORES QUE MODIFICAN LA CINÉTICA DEL ETANOL

El comportamiento cinético del alcohol etílico varía en los consumidores en dependencia de los factores que a continuación se describen.

1.7.2.1 Edad

Los mayores tienen, en general un volumen de distribución menor que los de mediana edad por acúmulo de tejido adiposo y ello facilita que se incremente la alcoholemia respecto al grupo de sujetos jóvenes.

1.7.2.2 Consumo Crónico de Alcohol (Alcohólicos)

Aquellos que tienen una severa afectación funcional hepática disminuyen el metabolismo del etanol y tienden a incrementar la alcoholemia.

1.7.2.3 Ayuno

La ingesta alcohólica en ayunas origina una alcoholemia superior a la que se produce con el estomago lleno por una mayor absorción en el intestino, al facilitar la evacuación gástrica y permanecer menos tiempo que en el estomago.

1.7.2.4 Sexo

Los niveles de alcohol sanguíneos en mujeres son superiores a los más alcanzados por varones a causa de que tiene una mejor absorción porque presentan escasos metabolismos gástricos, además por su mayor proporción relativa de tejido adiposo.

1.7.2.5 Tabaquismo

El consumo de cigarrillos disminuye el nivel de alcoholemia al facilitar el metabolismo del etanol.

1.7.2.6 Peso

La presencia de abundante tejido adiposo origina una disminución en el volumen de distribución del sujeto lo que conlleva aun incremento de la alcoholemia en comparación con sujetos delgados , de poca grasa que tienen un volumen de distribución relativo mas amplio y por tanto la alcoholemia en iguales condiciones de consumo será menor en estos últimos.

1.7.2.7 La Interacción con Fármacos

Incrementa la alcoholemia, en el caso de anestésico se incrementa el nivel de anestesia, en barbitúricos aumenta la depresión, en las benzodiazepinas actúa similar a los barbitúricos, y en caso contrario hay algunos que bloquean el metabolismo del etanol.

1.7.3 TIPOS DE MUESTRAS PARA ANÁLISIS DE ALCOHOLEMIA

La posibilidad de que la intoxicación etílica coexista con otras intoxicaciones y/o estados patológicos justifica que en todo enfermo en que se sospeche esta intoxicación se practique una determinación de alcoholemia. De esta forma, no solo se confirma el diagnóstico, sino que a la vista de las concentraciones de etanol en sangre, puede establecerse con cierta seguridad, si el cuadro puede ser debido sólo a la impregnación alcohólica, o por el contrario intervienen factores intercurrentes. Las muestras mas frecuentemente empleadas en el diagnostico de la intoxicación por etanol son: sangre, orina, y aire exhalado.

Las determinaciones en sangre son, evidentemente, las más eficaces, y mediante el análisis del resto de los biofluidos, lo que en realidad se intenta es calcular las concentraciones de etanol en sangre. Las determinaciones en sangre requieren que se tome sangre venenosa, previo lavado de la piel con una solución desinfectante exenta de alcohol. Debe emplearse un anticoagulante de los que el mas indicado es el fluoruro sódico (NaF), que no solo actúa como anticoagulante al secuestrar el calcio, sino que además inhibe el metabolismo de las células sanguíneas y otros microorganismos, que como contaminantes, pueden hallarse en la muestra. Esto tiene la doble ventaja de que impide el metabolismo del alcohol presente en la muestra, así como la fermentación alcohólica de los azúcares, lo que evita errores en la determinación por defecto o exceso, respectivamente.

El recipiente en el que se guarde la muestra debe permanecer herméticamente cerrado hasta su procesamiento en el laboratorio, y la cámara de aire ha de ser mínima, al igual que ocurre con los otros tóxicos volátiles. Si es necesario hacer la determinación en suero o plasma, debe hacerse en la relación de etanol suero/sangre total es 1.3/1. Debe tenerse en cuenta que las muestras muy contaminadas, o aquellas en que ha llegado a producirse fermentación (putrefacción), los niveles de etanol pueden ser alterados, tanto por defecto (consumo de alcohol por las bacterias), o exceso (producción de alcohol por fermentación alcohólica de los azúcares), por los que los niveles obtenidos son tan solo orientados, y carecen de valor judicial. Hasta su llegada al laboratorio de criminalista, si las muestras han de permanecer almacenadas más de 10 horas, conviene mantenerlas refrigeradas a 4 °C.

Las determinaciones de alcohol en orina no son útiles, en la práctica, para conocer el grado de impregnación alcohólica, pues tan solo la orina uretral es válida para ello. Sin embargo, pueden ser útiles en el diagnóstico de la ingesta crónica de alcohol, especialmente como control de sustancias de abuso, y en la orientación rápida de enfermos en quienes se sospecha la intoxicación aguda.

Las determinaciones en aire espirado son extraordinariamente útiles como diagnóstico orientativo de la intoxicación, y de hecho, se han impuesto en la práctica, como elemento de prueba en los controles de embriaguez en conductores, e incluso encuentran interés en la práctica clínica. El aire útil para el análisis es solamente el aire alveolar, por lo que los dispositivos de medida han de desechar la primera porción del aire exhalado, que proviene de las vías aéreas superiores. Si el paciente ha ingerido alcohol u otro compuesto que interfiera en la determinación, durante los 10-15 minutos previos a la determinación, los resultados pueden falsearse, al pasar al aire parte de la sustancia disuelta en la saliva. Generalmente se considera como límite de tiempo para hacer este tipo de análisis desde la última ingesta de alcohol 15 minutos, durante los cuales solo puede beberse agua ⁽³⁾.

El método de cromatografía de gas permite cuantificar la concentración de alcohol etílico en la sangre, que indican el grado de intoxicación de la persona como se puede observar en la Tabla 1.7.1

3. <http://www.etanolemia y etilometria.prc.ds/008/cologica/.pdf>

TABLA 1.7.1 CONCENTRACION Y EFECTO POR LAS DIFERENTES ALCOHOLEMIAS

CONCENTRACIÓN % (mg/L)	EFFECTOS
0	Negativo
50	Ausencia de Intoxicación, no hay síntomas que afecten la conducción de un vehículo
100	Se observan trastornos pérdida de equilibrio, mala coordinación así como variaciones en el pulso.
150	Síntomas de embriaguez
200	Embriaguez bien definida, no apto para conducir
300	Posibilidad de coma, embriaguez completa
400	Coma, posible muerte

Fuente: Ladron J. Toxicología Medica. McGraw-Hill-Interamericana de España. Madrid. 1995.

1.7.4 CROMATOGRAFIA DE GAS

La cromatografía es un método físico de separación basado en la distribución de los componentes de una mezcla entre dos fases inmiscibles, una fija y otra móvil. En cromatografía gaseosa, la fase móvil es un gas que fluye a través de una columna que contiene a la fase fija. Esta fase fija puede ser un sólido poroso (cromatografía gas-sólido o CGS), o bien una película líquida delgada que recubre un sólido particulado o las paredes de la columna (cromatografía gas-líquido o CGL). En el primer caso, el proceso que produce la separación es la adsorción de los componentes de la mezcla sobre la superficie sólida y en el segundo, la partición de los mismos entre las fases líquida y gaseosa.⁽⁴⁾

1.7.4.1 Representación del Cromatógrafo de Gas

Un instrumento para cromatografía gaseosa puede representarse por el siguiente esquema (Fig. 1.7.2):

3. http://www.ataonline.org.ar/002/acta_toxicologica/ATA11-2.pdf

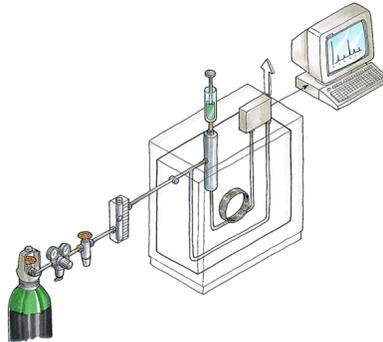


Fig. 1.7.2 Esquema del Cromatógrafo de Gas.

El gas portador (fase móvil) proviene de cilindros provistos con válvulas reductoras de presión. La muestra se introduce en el inyector con una microjeringa a través de un septum de goma. Allí se produce la vaporización instantánea de la misma y su introducción en la corriente de gas. La columna se halla dentro de un horno de temperatura variable, lugar donde se realiza la separación de los componentes de la muestra. El detector produce una señal eléctrica proporcional a la cantidad de materia a medida que cada componente separado fluye a través de él. Esa señal es enviada al registrador que realiza un gráfico de intensidad en función del tiempo (cromatograma); idealmente, se trata de picos gaussianos y cada pico corresponde a un componente de la muestra original. El integrador calcula además el área correspondiente a cada pico, la cual es proporcional a la cantidad de sustancia.⁽⁴⁾

1.7.4.2 Parámetros Relevantes en un Cromatógrama

Los parámetros que a continuación se presentan son los resultados de un análisis de cromatografía de gas ⁽⁵⁾.

1.7.4.2.1 Tiempo de Retención (t_r)

Es el tiempo transcurrido desde la inyección de la muestra hasta la aparición del máximo correspondiente al pico de ese componente. Un caso especial lo constituye un componente que no es retenido por la fase fija (no se reparte entre fases), el cual saldrá de la columna antes que cualquier sustancia a un tiempo llamado tiempo muerto (t_0). De esta manera, es posible definir t'_r como el tiempo que un cierto componente permanece en la fase estacionaria:

5. http://www.ataonline.org.ar/002/acta_toxicologica/ATA11-2.pdf

$$t_r = t_0 + t'_r$$

(Ecc. 1.7.1)

1.7.4.2.2 Área del Pico

Existen varias técnicas para la determinación de esta área de un pico cromatográfico:

- **Integración manual.** Se realiza con los métodos siguientes:

- **Método geométrico**

- ✓ Triangulación : en esta técnica se trazan líneas tangentes a cada lado del pico. La altura se mide desde la línea base hasta la intersección de las dos tangentes. El ancho se mide tomando la intersección de las dos líneas tangentes con la línea base. Utilizando la fórmula $A = \frac{1}{2} \cdot \text{altura del pico} \cdot \text{la base del pico}$. Las limitaciones de esta técnica están en el trazado de las líneas tangentes, un pequeño error al trazar las tangentes puede afectar las medidas de la altura.
- ✓ Altura por ancho a la mitad de la altura.

– **Método mecánico**

✓ **Planimétricos**

- ✓ **Corte y pesada:** esta técnica requiere recortar el pico del Cromatógrama, luego pesar en una balanza analítica. El recorte y pesada depende de mucho de la habilidad del operador. Puede introducirse errores por cambio del papel, la grasa de la mano del operador, homogeneidad del papel. Generalmente se recomienda utilizar una fotocopia del Cromatógrama para no destruir el original.

• **Integración automática**

- ✓ Electromecánica
✓ Electrónica.

La siguiente figura (1.7.3), es la de un cromatógrafo típico donde se puede ilustrar los resultados que se obtienen en un análisis de CG ⁽⁵⁾.

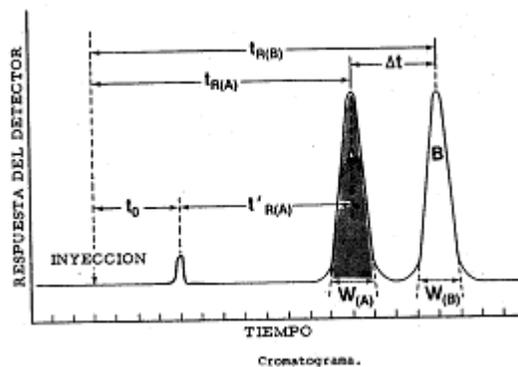


Fig. 1.7.3 Ilustración de un Cromatograma

1.7.4.2.3 Factor de Capacidad (k')

Se define como:

$$k' = \frac{\text{moles del componente en la fase estacionaria}}{\text{moles del componente en la fase gaseosa}} \quad (\text{Ecc. 1.7.2})$$

que, en función de la constante de partición (K), del volumen de la fase fija (V_L) y del volumen de la fase móvil (V_G) se puede escribir como:

$$k' = K \frac{V_L}{V_G} \quad (\text{Ecc. 1.7.3})$$

y en función de los tiempos de retención:

$$k' = \frac{(t_r - t_0)}{t_0} = \frac{t_r'}{t_0} \quad (\text{Ecc. 1.7.4})$$

1.7.4.2.4 Plato Teórico

Con respecto a la columna, se define como **plato teórico** a una capa estrecha de la misma en donde se produce el equilibrio de partición de un compuesto entre la fase fija y la móvil. Para una columna de longitud L , el número de platos teóricos (N) es:

$$N = \frac{L}{H} = 16 \left(\frac{t_r}{W} \right)^2 \quad (\text{Ecc. 1.7.5})$$

siendo H la altura de plato teórico, uno de los parámetros que determina la capacidad del proceso cromatográfico para separar dos compuestos dados, y W el ancho de los picos a la altura de la línea de base.

A partir de las definiciones anteriores, es posible definir parámetros asociados a la separación de dos sustancias A y B que caracterizan la eficiencia de una separación. Siendo B la sustancia con mayor t_r estos parámetros son:

1.7.4.2.5 Factor de Selectividad

Se define como:

$$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A} = \frac{t'_r(B)}{t'_r(A)}$$

(Ecc. 1.7.6)

1.7.4.2.6 Resolución

Se define como:

$$R = \frac{1}{4} \frac{(\alpha - 1)}{\alpha} \frac{k'}{(1 + k')} \sqrt{N} = \frac{1}{4} \frac{(\alpha - 1)}{\alpha} \frac{k'}{(1 + k')} \sqrt{\frac{L}{H}}$$

(Ecc.1.7.7)

Teniendo en cuenta que k' , α , L y H dependen de la temperatura, tipo de fase fija, longitud de columna y flujo de fase móvil, es posible mejorar una separación optimizando estos parámetros experimentales (5).

1.7.4.3 Calibración del Cromatógrafo de Gas

Se entiende por calibración al conjunto de operaciones que establece, bajo condiciones específicas, la relación entre las señales producidas por un instrumento analítico y los correspondientes valores de concentración o masa del juego de patrones de calibrado.

Los factores que determinan la calidad de una calibración son:

- ✓ **La precisión de las medidas:** estimada a través de la **repetitividad** y la **reproducibilidad** de las medidas. La repetitividad se evalúa a través del cálculo de la desviación estándar relativa (RSD%) de la medida de los patrones de calibrado. En la práctica puede ocurrir que la repetitividad para los patrones sea más pequeña que para las muestras, por lo que será necesario fabricar patrones similares a las muestras o agregar el analito a las mismas.

- ✓ **Exactitud de los Patrones.** El valor de concentración o masa asignado a cada patrón trae aparejado un error pequeño si es preparado a partir de reactivos puros (grado analítico) con estequiometría bien definida. Este error en general se desprecia, frente al error en las medidas de las señales producidas por el instrumento.
- ✓ **Validez de la Calibración.** Generalmente es el factor más importante. Cuando se calibra un instrumento se debe tener una razonable certeza de que éste responderá de igual manera a los patrones así como a las muestras, aunque estas tengan una matriz relativamente diferente. Si estas diferencias son muy grandes, pueden llegar a invalidar el proceso de calibración. Es necesario estar completamente seguro de que el calibrado es válido antes de utilizarlo para obtener el valor de concentración

de muestras incógnita. En caso contrario, pueden cometerse serios errores en la determinación.

1.7.4.3.1 Modelos de Calibración

La forma de calibración más sencilla es la que utiliza un solo patrón. Este modelo es útil sólo cuando el patrón es absolutamente confiable. Además, se supone que la señal cero del instrumento corresponde al cero de concentración de la especie que se quiere determinar. Entre el cero y valor obtenido para el patrón se realiza una interpolación lineal, pero la extrapolación más allá de la concentración de patrón no es recomendada. El modelo correspondiente es:

$$\begin{aligned} \text{señal} &= \text{constante} \times \text{concentración} \\ y &= m \times x \end{aligned}$$

(Ecc.1.7.8)

La constante m es llamada **sensibilidad** y corresponde a la constante de proporcionalidad entre la señal y la concentración. Esta proporcionalidad es útil sobre un restringido intervalo de valores.

A valores muy bajos de concentración la señal es demasiado pequeña y está sujeta a una gran incertidumbre. A valores muy altos la proporcionalidad dada en ecuación (1.7.8) puede dejar de ser válida. Este modelo es utilizado en muy pocos casos.

Si la respuesta a concentración cero de analito no es conocida de antemano, es necesaria una calibración con un mínimo de dos puntos. Para esta calibración se utiliza un modelo lineal con un término constante:

señal = señal del blanco + constante x concentración

$$y = b + m x$$

(Ecc.1.7.9)

El término b indica la magnitud de la señal estimada del blanco, mientras que m es la pendiente de la recta de calibrado e indica nuevamente la sensibilidad.

Estadísticamente, una calibración realizada a partir de dos puntos es muy pobre y su construcción a partir de un número mayor de patrones es obligatoria. El procedimiento estadístico para determinar los coeficientes b y m de la ecuación (1.7.9) se denomina regresión por mínimos cuadrados. La regresión por mínimos cuadrados es una herramienta muy útil, sin embargo, deben conocerse sus limitaciones. Además de la regresión por mínimos cuadrados siempre debe hacerse una inspección gráfica de los datos obtenidos, para detectar puntos anómalos o **fallas en la linealidad**.

Para aplicar el método de mínimos cuadrados en la calibración instrumental se realizan las siguientes suposiciones:

a.- La incertidumbre en la concentración de los patrones es despreciable frente a la desviación estándar de la señal medida. Para ello los patrones de calibrado deben ser preparados con una precisión superior a la de la medición de la señal.

b.- Todas las medidas son estadísticamente independientes unas de otras. Cualquier tendencia de las señales a través del tiempo (derivadas de la línea de base o contaminaciones secuenciales) invalida el calibrado.

c.- Todas las medidas tienen igual desviación estándar, la cual no depende del valor de la señal observada, por lo tanto las señales altas tendrán igual desviación estándar que las pequeñas. Esta suposición es particularmente discutible si se trabaja en un amplio intervalo de concentraciones. Si no se cumple, es necesario utilizar un método de calibración ponderado por las desviaciones estándar de las medidas.

d.- Las medidas están normalmente distribuidas. En general, el error en una medida analítica es una suma de errores independientes provenientes de distintas partes del

instrumento. Aunque el error de cada fuente individual no sea normalmente distribuido, la suma de esas contribuciones, producirá una distribución normal.

1.7.4.4 Protocolos de calibración

Para la determinación de la concentración pueden ser utilizados distintos modos de calibración dependiendo del analito que son:

1.7.4.4.1 Calibración Externa

Se preparan muestras de patrones de concentración conocida que se analizan y permiten construir una curva de calibración para cada componente a cuantificar. Con este método es necesario medir exactamente los volúmenes inyectados tanto de los patrones como de la muestra incógnita.

Otros modos también son utilizados: **calibración interna, método del agregado patrón y técnicas de dilución isotópica.**

1.7.4.4.2 Calibración Interna

Si antes de la determinación se le agrega a la muestra una cantidad fija de una sustancia con características químicas similares a las de la especie a determinar, esta sustancia es llamada **estándar interno** y el método se denomina de **calibración interna** o **método del estándar interno**. El agregado sirve para calibrar un paso crítico que de otra manera introduce una gran incerteza, por ejemplo el volumen de muestra inyectado en una corrida de Cromatografía Gaseosa. La señal producida por este estándar interno es producida en las mismas condiciones que la de los analitos, porque se encuentran juntos en la muestra. Para averiguar la concentración de los analitos, se aplica alguno de los modelos lineales vistos anteriormente utilizando como señal del patrón, la señal producida por el estándar interno. La concentración del estándar interno puede variarse para comprobar la linealidad y construir una curva de calibrado, o puede usarse un modelo de un único patrón. Hay que tener en cuenta que si el estándar

interno no tiene la misma sensibilidad en el detector que los analitos, hay que corregir las señales de estos con un factor de respuesta. Estos factores de respuesta se calculan a priori mediante estándares de los compuestos a determinar (ver Willett, J. E., Gas Chromatography, Analytical Chemistry by Open Learning, Wiley, 1987).

1.7.4.4.3 Método de Dilución Isotópica

La forma más sofisticada del método del estándar interno es el **método de dilución isotópica**. Aquí se opta por agregar a la muestra una sustancia que es químicamente igual a la sustancia a determinar pero aún así discernible de la original. Este método utiliza la misma sustancia como patrón pero con al menos un átomo de su estructura reemplazado por un isótopo. Para este método debe utilizarse un técnica selectiva a isótopos, generalmente espectrometría de masa.

1.7.4.4.4 Agregado patrón

En el **método del agregado patrón** se le agrega a la muestra, concentraciones crecientes del analito de interés. La señal obtenida se deberá a la cantidad de analito originalmente presente en la muestra sumados a la cantidad agregada. El propósito de este método es generalmente corregir efectos de interferencias multiplicativas debidas a la matriz de la muestra. ⁽⁵⁾

1.7.5 VERIFICACIÓN DE LA LINEALIDAD

Para verificar la linealidad de un método se siguen los siguientes procedimientos ⁽⁶⁾:

- ✓ Preparar soluciones de muestra al menos a cinco niveles de concentración, los cuales deben encontrarse dentro de los intervalos establecidos para cada tipo de análisis, y que fueron verificados previamente al llevar a cabo la determinación de la linealidad del sistema.
- ✓ Este procedimiento debe repetirse en forma independiente por lo menos 3 veces, para evaluar estadísticamente la regresión lineal del método.
- ✓ Con estos datos se grafica la respuesta de la medición, contra la concentración del analito. Se verifican datos con comportamiento atípico mediante mediciones adicionales.
- ✓ Realizar un análisis de varianza de la regresión lineal.
- ✓ Calcular el coeficiente de regresión con la totalidad de los datos (por los menos dos curvas independientes).
- ✓ Calcular y graficar los residuos (valor real de la concentración – el calculado por la ecuación de regresión para cada valor de X)

6. Guzmán, Silka. Procedimiento General para Validación de Métodos y Manipulación de Items de Ensayo, según la Norma 17025:2005, sección 5.4 y 5.8. 2006.

2. DISEÑO METODOLÓGICO

En este capítulo se explica la metodología a seguir para cumplir con cada uno de los objetivos de este trabajo investigativo.

2.1 TIPO DE ESTUDIO

Se realizó un estudio experimental que según su orientación en el tiempo es de tipo transversal, ya que se determinó la linealidad del método para determinar alcoholemia por cromatografía de gas, a través de datos obtenidos en el momento del estudio (relación Área de etanol versus Área de Propanol); este estudio no se había realizado en el Laboratorio Central de Criminalística de la Policía Nacional.

2.2 UNIVERSO

Se prepararon seis disoluciones de etanol de 100 ml, con concentraciones de 1g/L, 2 g/L, 3 g/L, 4 g/L, 5 g/L y 6 g/L, de cada una de estas disoluciones se prepararon cinco muestras, para un total de 30, que se inyectaron al cromatógrafo de gas.

2.3 INSTRUMENTOS DE RECOLECCION DE LA INFORMACIÓN

Una vez que se prepararon las muestras, estas se inyectaron en el cromatógrafo de gas, obteniéndose a través del cromatograma los datos de áreas de etanol y propanol, esta información se registró en una hoja de cálculo de Microsoft Excel para su procesamiento.

2.4 MONTAJE DEL MÉTODO DE DETERMINACION DE ALCOHOL EN SANGRE POR CROMATOGRAFIA DE GASES.

Montar el método requirió de los siguientes materiales, reactivos y procedimientos:

2.4.1 Materiales

1 Micropipeta de 0.5 ml.	1 Bureta de 100 ml.
1 Micropipeta de 0.1 ml.	2 Beaker de 1000 ml.
100 Puntas de Pipetas de 0.5 ml.	1 Beaker de 100 ml.
1 Jeringa de 5 ml para cromatografía de gas. por espacio de cabeza y seis agujas.	1 Pizeta de 50 ml.
50 Puntas de Pipetas de 0.1 ml.	1 Soporte Universal
50 Tubos de ensayos de 5 ml.	1 Gradilla.
1 Balón de 1000 ml con su tapa.	Papel toalla.
6 Balones de 100 ml con sus tapas.	Cinta de Parafina.
	Una caja de Guantes.

2.4.2 Reactivos

Solución de Etanol (C_2H_5OH) [7.9 g/L]

Standards externos de etanol en el rango de concentración de 1 g/L hasta 6 g/L.

N-Propanol (C_3H_7OH)

Sulfato de Amonio ($(NH_4)_2SO_4$)

Agua destilada

2.4.3 Equipos

Cromatógrafo de Gas Perkin Elmer, modelo AUTOSYSTEMXL.

Refrigerador.

Destilador de agua.

2.4.4 Preparación del Reactivo Patrón (ETANOL)

Se Tomó 12.7 ml de etanol absoluto y se aforó a 1000 ml, para tener una concentración aproximada a 7.9 g/L, a partir de dicha disolución se prepararon los siguientes estándares:

Tabla 2.1 Patrones Standards para Calibrar el Método “Determinación de Alcholemia”

Patrón	Volumen a tomar (ml)	Concentración (g/l)	Volumen Total (ml)
0	-	7.90	-
1	60	6	100
2	50	5	100
3	40	4	100
4	30	3	100
5	20	2	100
6	10	1	100

Fuente: Pérez García, A. Folleto del Curso de Cromatografía de Gas. Managua, Nicaragua, 2005.

Nota: conservamos los standards a 4° C. Los cálculos sobre la preparación del reactivo patrón se presentan en el capítulo I, de la presentación y discusión de resultados.

2.4.5 Preparación del Patrón Interno

Al utilizar esta técnica y un equipo GC-FID fue imprescindible utilizar un patrón interno, como es el N- Propanol.

Dicho patrón se preparó de la forma siguiente, se tomó 5 ml de N- propanol y se aforó hasta 1000 ml con agua desionizada.

Para la preparación de la muestra estándares se le adicionó 0.1 ml del patrón interno.

2.4.6 Preparación del Reactivo Iónico

Se utilizó H₂SO₄ 1M, saturado con (NH₄)₂SO₄ anhidro, para preparar el H₂SO₄ 1M, se tomó 5.32 ml de ácido concentrado y se aforó hasta 100 ml con agua desionizada.

2.4.7 Procedimiento para la Preparación de las Muestras

- En tubos de ensayos de 5 ml, se tomó con micropipeta de boca desechable 0.5 ml, de la muestra (patrón de cualquier concentración).
- Se añadió 0.1 ml de patrón interno (N – Propanol disuelto).
- Se añadió 0.5 ml del reactivo iónico.
- Se Agitó suavemente durante dos minutos y se dejó en reposo durante 10 min. a temperatura ambiente.
- Con la jeringa de gases se tomó 2 ml de gas del espacio de cabeza que se inyectó en el cromatógrafo.

2.5 CONSTRUCCION DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN

Se construyó la curva de calibración a través de patrones de concentraciones conocidas de: 1 g/L, 2 g/L, 3g/L, 4 g/L, 5 g/L y 6 g/L. De cada una de estas disoluciones se hicieron dos inyecciones, para un total de 12. Una vez calibrado el método cromatográfico de alcoholemia, se prepararon e inyectaron las muestras.

2.6 VERIFICACION DE LA LINEALIDAD DEL METODO

Para la verificación de la linealidad se utilizó un modelo lineal con un término constante que se define con la ecuación punto-pendiente:

señal = señal del blanco + constante x concentración

$$y = b + m x$$

(Ecc. 2.1.1)

El término b indica la magnitud de la señal estimada del blanco, mientras que m es la pendiente de la recta de calibrado e indica la sensibilidad.

La ecuación punto- pendiente, se obtuvo por medio del método de regresión por mínimos cuadrados.

2.6.1 Regresión por Mínimos Cuadrados.

Para la ecuación 2.1.1, la pendiente de la recta puede ser calculada de la siguiente manera:

$$m = \frac{\sum_{i=1}^N \left(x_i - \bar{x} \right) \left(y_i - \bar{y} \right)}{\sum_{i=1}^N \left(x_i - \bar{x} \right)^2}$$

(Ecc. 2.1.2)

Los coeficientes de la ecuación 2.1.1, se pueden calcular con las siguientes ecuaciones:

$$b = \bar{y} - m \bar{x}$$

(Ecc. 2.1.3)

Donde \bar{x}, \bar{y} son los promedios aritméticos de los valores de x (patrones de concentración) y valores y (señales). En la ecuación (2.1.2), el numerador es simbolizado S_{xy} y el denominador S_{xx}

La expresión

$$\sum_{i=1}^N \left(y_i - \bar{y} \right)^2$$

(Ecc. 2.1.4)

se denota con el símbolo S_{yy} .

Las diferencias entre las señales observadas y las predichas se denominan residuos. A partir de estos valores se calcula:

$$S_Y = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \bar{y}_i)^2}{N-2}} = \sqrt{\frac{S_{yy} - m^2 S_{xx}}{N-2}}$$

(Ecc. 2.1.5)

S_Y es llamada desviación estándar y tiene unidades correspondientes a la señal Observada.

La siguiente ecuación puede ser usada para calcular la concentración de una muestra incógnita:

$$x = \frac{y - b}{m}$$

(Ecc. 2.1.6)

Nota: Para la determinación del coeficiente de linealidad no se utilizó ninguna de las ecuaciones planteadas anteriormente, ya que los cálculos se elaboraron en el programa de Microsoft Excel, que ya trae programada la metodología de calculo de cada una de estas ecuaciones, y esto nos permitió obtener resultados directos.

3 PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En esta sección se presentan las ecuaciones, cálculos para la preparación de disoluciones, procesamiento de la información, a la vez que la discusión de los resultados.

CAPITULO 3.1: CÁLCULOS PARA LA PREPARACIÓN DEL REACTIVO PATRÓN (ETANOL)

$$M = \frac{n}{L} = \frac{10\text{g}}{46.07\text{g/mol}} = \frac{0.2170609\text{g}}{1\text{L}}$$

(Ecc. 3.1)

Los cálculos de la preparación de las seis disoluciones de etanol de las que se hacen referencia en acápite 2.2, del diseño metodológico, se hicieron en base a la ecuación de la ley de las concentraciones $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$, siendo la $C_1 = 10 \text{ g/L}$; $C_2 = 1 \text{ g/L}$, 2 g/L , 3 g/L , 4 g/L , 5 g/L , y 6 g/L ; $V_2 = 100 \text{ ml} \approx 0.1 \text{ L}$, $V_1 = ?$

Cálculo de la concentración de 1 g/L:

$$10 \frac{\text{g}}{\text{L}} \times V_1 = 1 \frac{\text{g}}{\text{L}} \times 0.1\text{L}$$

$$V_1 = 0.01\text{L}$$

Cálculo de la concentración de 2 g/L:

$$10 \frac{\text{g}}{\text{L}} \times V_1 = 2 \frac{\text{g}}{\text{L}} \times 0.1\text{L}$$

$$V_1 = 0.02\text{L}$$

Cálculo de la concentración de 3 g/L:

$$10 \frac{\text{g}}{\text{L}} \times V_1 = 3 \frac{\text{g}}{\text{L}} \times 0.1\text{L}$$
$$V_1 = 0.03\text{L}$$

Cálculo de la concentración de 4 g/L:

$$10 \frac{\text{g}}{\text{L}} \times V_1 = 4 \frac{\text{g}}{\text{L}} \times 0.1\text{L}$$
$$V_1 = 0.04\text{L}$$

Cálculo de la concentración de 5 g/L:

$$10 \frac{\text{g}}{\text{L}} \times V_1 = 5 \frac{\text{g}}{\text{L}} \times 0.1\text{L}$$
$$V_1 = 0.05\text{L}$$

Cálculo de la concentración de 6 g/L:

$$10 \frac{\text{g}}{\text{L}} \times V_1 = 6 \frac{\text{g}}{\text{L}} \times 0.1\text{L}$$
$$V_1 = 0.06\text{L}$$

El V_1 , es la cantidad de alcohol etílico, disuelto en 100 ml de agua desionizada.

CAPITULO 3.2 AREAS DE ETANOL Y PROPANOL LEIDAS EN EL CROMATOGRAMA

Las lecturas de las áreas de etanol y propanol de las concentraciones de 1 g/L, 2 g/L, 3 g/L, 4 g/L, 5 g/L y 6 g/L preparadas con el procedimiento descrito en el acápite 2.4.7 del diseño metodológico, se presentan a continuación en la siguiente tabla:

TABLA 3.1 AREAS DE ETANOL Y N - PROPANOL LEÍDAS EN LOS CROMATOGRAMAS.

C_i (g/L)	AREA ETANOL	AREA PROPANOL
1	2266.48	3172.29
	2247.22	3507.92
	2424.39	3656.32
	2431.98	3894.41
	2051.68	3806.91
2	4855.36	4369.75
	4748.71	3799.72
	5118.85	3349.2
	5323.76	2617.21
	4025.02	3122.03
3	5148.93	2608
	6319.77	2246.94
	6206.47	2935.71
	5944.36	2995.91
	5618.53	2797.26
4	9484.9	3193.76
	9526.22	3302.46
	9299.32	3066.4
	9845.87	3134.42
	8438.27	2739.51
5	9945.4	2239.61
	9928.96	2891.77
	9706.04	2898.98
	10106.75	2928.57
	9626.55	2803.92
6	11049.33	2378.69
	10443.36	2253.33
	10923.51	2326.37
	11964.02	2762.04
	11860.25	2523.1

CAPITULO 3.3 PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN EN MICROSOFT EXCEL

La determinación del coeficiente de linealidad se obtuvo por el método de regresión lineal, a partir del cálculo de las medias de las desviaciones estándares y las medias de las relaciones (R_i): Áreas de Etanol / Áreas de Propanol, de cada una de las concentraciones de las disoluciones preparadas, los resultados según la hoja de cálculo de Microsoft Excel son los siguientes:

TABLA 3.2 DATOS PROCESADOS EN MICROSOFT EXCEL

C_i (g/L)	R_i	\bar{R}_i	\bar{S}	$\frac{1}{\bar{S}^2}$	W
1	0.71446179	0.63631177	0.06415591	242.955446	3.58089454
	0.64061324				
	0.66306833				
	0.6244797				
	0.53893578				
2	1.11112993	1.44252595	0.3632688	7.57781162	0.11168856
	1.24975261				
	1.52837991				
	2.03413559				
	1.28923169				
3	1.97428298	2.17875314	0.35867325	7.77323923	0.11456895
	2.81261182				
	2.11412912				
	1.9841584				
	2.0085834				
4	2.9698224	3.02169541	0.09914432	101.733571	1.4994403
	2.88458301				
	3.03265067				
	3.14120954				
	3.08021142				
5	4.44068387	3.62132586	0.45979103	4.73019465	0.06971784
	3.43352341				
	3.34808795				
	3.45108705				
	3.43324703				
6	4.6451324	4.60150752	0.15372628	42.3159166	0.62368981
	4.63463407				
	4.69551705				
	4.33158825				
	4.70066585				
					$\sum w = 6$

Las desviaciones estándares de los R_i de etanol y propanol no varían significativamente con respecto a la media, indicando precisión en la preparación de muestras e inyección de las mismas en el cromatógrafo de gas.

El coeficiente de ponderación W , es igual a seis (6) que es el número de concentraciones de las muestras en las cuales se fundamentó el estudio, lo cual indica que el procesamiento estadístico de los datos es exacto.

La determinación del coeficiente de linealidad, a través del modelo de regresión lineal integrado en el programa de Microsoft Excel, da un resultado de 0.9976, que no es mas que la confiabilidad con que pueden emitirse los resultados periciales relacionados con intoxicación por consumo de alcohol.

La grafica siguiente presenta los resultados obtenidos:

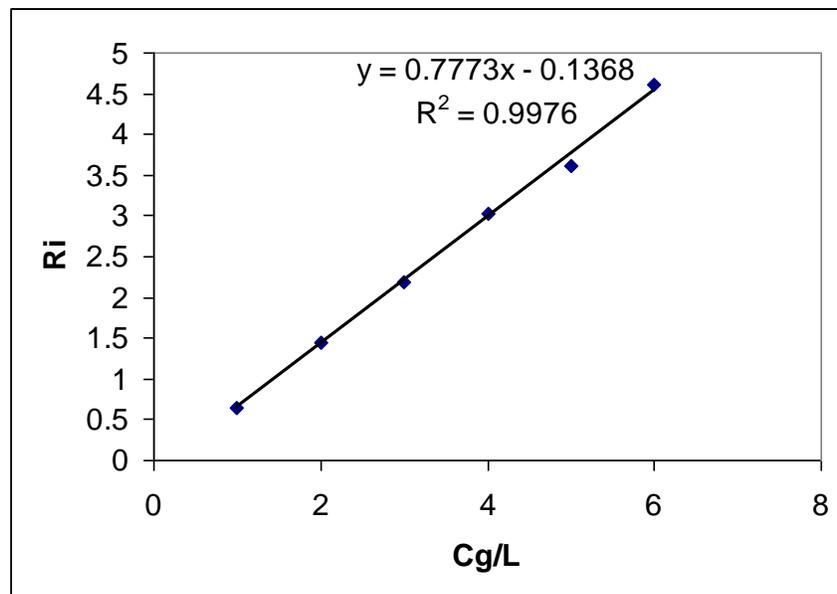


Figura 3.1. R_i Vs. Concentraciones (g/L)

4. CONCLUSIONES

La linealidad del método para determinar alcoholemia es de 0.9976, este parámetro indica, que el método es adecuado para la determinación de alcoholemia.

Se cuenta con los materiales instrumentales necesarios para calibrar el cromatógrafo de gas, para el método de alcoholemia.

No hay factores externos que afectan la cuantificación de alcohol en sangre, sin embargo se podría obtener un coeficiente de linealidad mayor que 0.9976, utilizando viales ámbar de 5 ml los que se han agotados en el laboratorio.

En este estudio se plantea con claridad el procedimiento para programar el método de determinación de alcoholemia por cromatografía de gas.

A través del cálculo del coeficiente de linealidad se logró demostrar la capacidad del método de producir resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra.

5. RECOMENDACIONES

Se recomienda la calibración y verificación del método para determinar alcoholemia por cromatografía de gas utilizando patrones de referencia debidamente certificados para obtener resultados mas exactos.

Debido a que al equipo cromatográfico, se le da mantenimiento cuatro veces al año se recomienda la verificación del coeficiente de linealidad cada tres meses, de esta manera se ajustaría el método a las condiciones de funcionamiento del equipo.

Se recomienda validar el método con su procedimiento actual de trabajo ya que el calculo del coeficiente de linealidad de 0.9976, indica que es capaz de producir resultados confiables.

Los Parámetros que recomendamos partiendo del estudio de la verificación de la linealidad, para una futura validación del método son: Recuperación, Sensibilidad, Selectividad, Robustez, Limite de Detección, Limite de Cuantificación, Reproducibilidad, Repetibilidad, Sesgo, e Incertidumbre.

Es necesario crear un sistema de registro o base de datos sobre la calibración del método.

6 BIBLIOGRAFIA

1. Ladron J. Toxicología Medica. McGraw-Hill-Interamericana de España. Madrid. 1995.
2. Belitz H.D. Química de los Alimentos. ACRIBIA, S.A. Zaragoza, España. 1988.
3. Instructivo para la realización del trabajo de diploma en la Facultad de Ingeniería Química. Managua, Nicaragua. 2000
4. Macias Pilar. Alcoholes, bebidas alcohólicas y alcoholemia. Managua, Nicaragua. 1984.
5. Normas de procedimiento para la determinación de alcohol etílico en sangre. laboratorio de criminalista. Managua 2003.
6. Velázquez. McGraw-Hill-Interamericana de España. Madrid. 1996.
7. D.C. Harris. Análisis Químico Cuantitativo, II edición española, Reverté, 2001.
8. Piura López, Julio; INTRODUCCIÓN A LA METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA. 2da Edición; Publicación Científica de la Escuela de Salud Pública de Nicaragua;1995.

9. Esquema Básico para la realización de un protocolo e informe final. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Facultad de Ciencias Medicas.

10. [http://www.eqi/utuli_cromatografia de gas/edu.pdf](http://www.eqi/utuli_cromatografia_de_gas/edu.pdf)

11. http://www.ataonline.org.ar/002/acta_toxicologica/ATA11-2.pdf.

12. http://www.ataonline.org.ar/002/acta_toxicologica/ATA11-2.pdf

7. GLOSARIO

COEFICIENTE DE CORRELACIÓN: Estadístico que cuantifica la correlación. Sus valores están comprendidos entre -1 y 1

COEFICIENTES DE REGRESIÓN: En un modelo de regresión lineal son los valores de a y b que determinan la expresión de la recta de regresión $y=a + b \cdot x$.

CORRELACIÓN: Expresa la concordancia entre dos variables según el sentido de la relación de estas en términos de aumento ó disminución.

DESVIACIÓN ESTANDAR (TÍPICA): Característica de una muestra o población que cuantifica su dispersión o variabilidad. Tiene las mismas unidades que la variable. la desviación típica es invariante con respecto al origen de la distribución. Su cuadrado es la varianza.

EXACTITUD: (VERACIDAD): Expresa la cercanía entre el valor que es aceptado, sea como un valor convencional verdadero (material de referencia interno de la firma), sea como un valor de referencia aceptado (material de referencia certificado o estándar de una farmacopea) y el valor encontrado (valor promedio) obtenido al aplicar el procedimiento de análisis un cierto número de veces.

LINEALIDAD: Habilidad (dentro de un ámbito dado) del procedimiento analítico de obtener resultados de prueba que sean directamente proporcionales a la concentración de analito en la muestra.

MEDIA: Es una medida de centralización para una variable continua. Se obtiene sumado todos los valores muestrales y dividiendo por el tamaño muestral.

PRECISION: expresa la cercanía de coincidencia (grado de dispersión) entre una serie de mediciones obtenidas de múltiples muestreos de una misma muestra homogénea bajo condiciones establecidas.

REPETIBILIDAD (REPETITIVIDAD): Precisión obtenida bajo las mismas condiciones de operación en un intervalo corto de tiempo (mismo día), por un mismo analista, en la misma muestra homogénea y en el mismo equipo.

REPRODUCIBILIDAD: Expresa la precisión entre laboratorios como resultado de estudios interlaboratoriales diseñados para estandarizar la metodología.

ROBUSTEZ: Medida de la capacidad de un procedimiento analítico de permanecer inafectado por pequeñas pero deliberadas variaciones en los parámetros del método y provee una indicación de su fiabilidad en condiciones de uso normales.

SELECTIVIDAD: Describe la habilidad de un procedimiento analítico para diferenciar entre varias sustancias en la muestra y es aplicable a métodos en los que dos o más componentes son separados y cuantificados en una matriz compleja.

SESGO: Se usa en el sentido de exactitud de un promedio a largo plazo (valor esperado) de una serie de promedios. Es la diferencia en el valor esperado (teóricamente igual al promedio de un número infinito de valores individuales independientes) del valor verdadero, correcto o asumido.

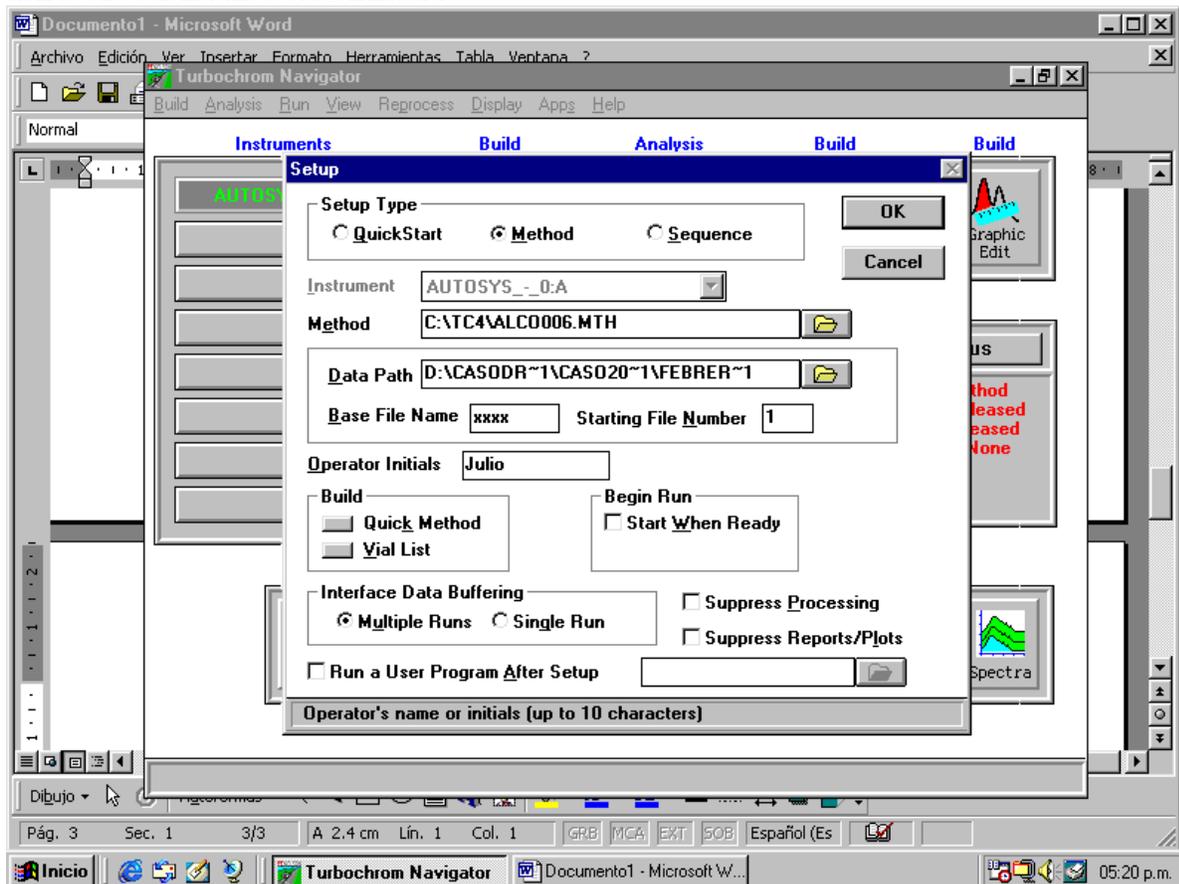
UNIVERSO: Conjunto infinito de elementos o unidades generado por un modelo teórico. Conjunto real de todos los elementos que comparten unas condiciones de admisión en el conjunto.

VALIDACIÓN: Confirmación que se da por la recopilación y análisis de la evidencia objetiva de que se cumplen los requisitos particulares para el uso específico propuesto.

ANEXO 1
PROGRAMACION DEL CROMATOGRAFO DE GAS
PARA LA VERIFICACION DE LA LINEALIDAD
DEL METODO DE ALCOHOLEMIA

PROGRAMACION DEL CROMATOGRAFO DE GAS PARA LA VERIFICACION DE LA LINEALIDAD DEL METODO DE ALCOHOLEMIA.

PANTALLA # 1: PROGRAMACIÓN DEL CROMATÓGRAFO DE GAS PARA EL MÉTODO DE ALCOHOLEMIA



PANTALLA # 2: RESUMEN DE LAS CONDICIONES DEL METODO DE ALCOHOLEMIA

Method Editor - C:\TC4\ALC0006.MTH [_ 5 X]

File Instrument Process Calibration Review Other Setup Help

Data Acquisition and Instrument Control

Instrument Name : AUTOSYS_-_0.A	Injection : MANUAL	Inlet A : CAP
Experiment Time : 20.00 min	Injection Volume :	Inlet B : CAP
Delay Time : 0.00 min	Sampling Rate : 1.56250 pts/s	Detector A : FID
Run Time : 20.00 min	Channel : A	Detector B : NPD

Oven Temperature Program :

Initial Temperature : 40 deg for 20.00 min

Data Processing and Reporting

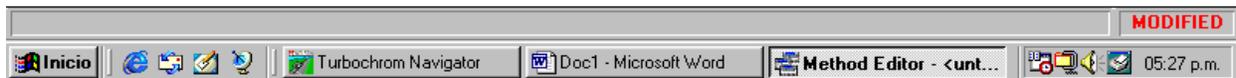
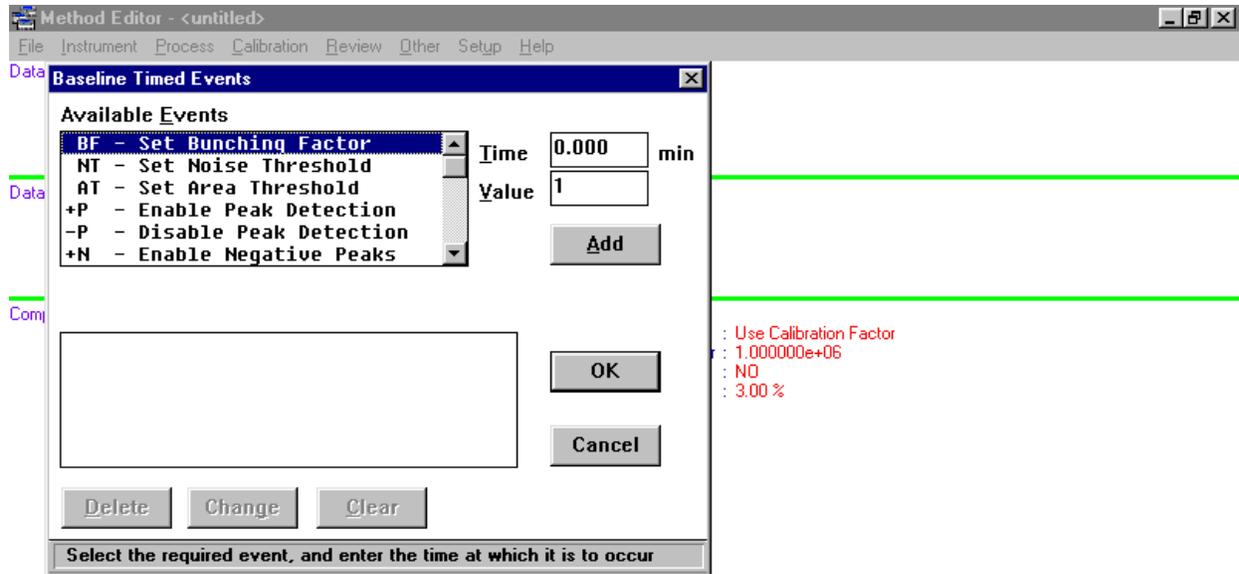
Replot Pages : 1	BF : 2	User Programs : 0
Scale Factor : 100.000000	NT : 1 μ V	Report Files : 0
Offset : 0.000 mV	AT : 100.00 μ V	
Scale : 1000.000 mV	Timed Events : 0	

Component List and Calibration

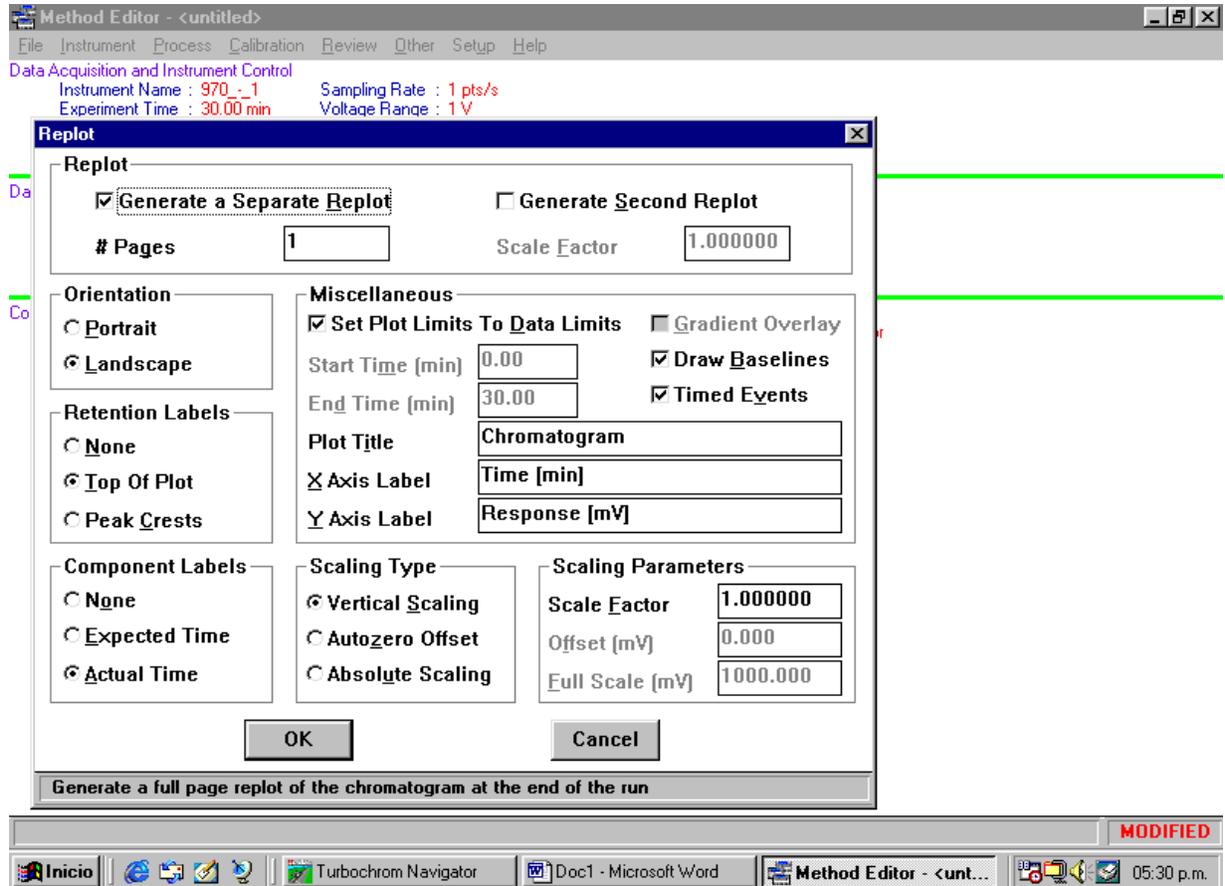
Components : 0	Volume Units : ml	Unidentified Peaks : Use Nearest Component
Named Groups : 0	Sample Volume : 2.000	Global Calibration Factor : 1.000000e+06
Timed Groups : 0	Quant Units : g/L	Reject Outliers : NO
Calibration : EXTD	Void Time : 0.000 min	Outlier Tolerance : 3.00 %

Windows taskbar showing: Inicio, Turbochrom Navigator, Documento1 - Microsoft..., Method Editor - C:\TC..., 05:22 p.m.

PANTALLA # 3: PROGRAMACIÓN DE LOS TIEMPOS DE EVENTOS



PANTALLA # 4: PROGRAMACIÓN DE DATOS QUE SE REFLEJAN EN EL REPORTE GRAFICO



PANTALLA # 5: DATOS DEL CROMATOGRAFO Y ACCESORIOS

The screenshot displays the 'Method Editor' window for a file named 'C:\ALC.MTH'. The 'Instrument Notes' dialog box is open, showing the following configuration details:

- Header Text:**
 - Packed Column GC -
 - Instrument : autosystem xl
 - Column : Rtx1
 - Column Length : 15 m
 - Carrier Gas : N2
 - Flow Rate : 40
- Template:** GC

Buttons for 'OK', 'Cancel', and 'Reset' are visible. A status bar at the bottom of the dialog reads 'Enter text - Use Ctrl+M to start a new line'. In the background, the main window shows parameters for Inlet A (CAP), Inlet B (CAP), Detector A (FID), and Detector B (NPD), along with numerical values for flow rate and calibration factor.

The Windows taskbar is visible at the bottom of the screen. It includes the Start button, several icons, and the following open applications: 'Turbochrom Navigator', 'Doc1 - Microsoft Word', and 'Method Editor - C:\A...'. The system tray on the right shows the time as 05:38 p.m. and a 'MODIFIED' status indicator.

PANTALLA # 6: SELECCIÓN DEL CANAL A (DETECTOR A)

Method Editor - C:\ALC.MTH

File Instrument Process Calibration Review Other Setup Help

Data Channels

Data Channel

- A
- B
- Dual

Source

Channel A: DetA

Channel B: DetB

Set Data Rate

By Peak Width at Base (s): 12.80

By Sampling Rate (pts/s): 1.5625

Store All Data From Run Data Points: 187

Delay Time (min): 0.00

Run Time (min): 2.00

OK Cancel

Collect data from channel A only

Inlet A : CAP
Inlet B : CAP
Detector A : FID
Detector B : NPD

ams : 0
s : 0

peaks : Use Calibration Factor
tion Factor : 1.000000e+06
s : NO
nce : 3.00 %

MODIFIED

Inicio Turbochrom Navigator Doc1 - Microsoft Word Method Editor - C:\VA... 05:41 p.m.

PANTALLA # 7: PROGRAMACIÓN DE LOS FLUJOS DE LOS GASES

Method Editor - C:\ALC.MTH

File Instrument Process Calibration Review Other Setup Help

Data Acquisition and Instrument Control

Carrier

Carrier A Ramp	Rate	Setpoint	Hold
Initial	0.0	6.0	2.00
1	0.0	0.0	0.00
2	0.0	0.0	0.00
3	0.0	0.0	0.00

Program

A: Press - N2

B: Press - N2

Oven Time: 2.00 min

Carrier A Time: 2.00 min

Column

Length: 15.00 m

Diameter: 320 um

Vacuum Comp: OFF

Inlet Split Controls

Mode: FLOW Ratio: 14.0 :1 Flow: 40.0 ml/m

Buttons: OK, Cancel

Select to edit pressure/flow program for Carrier A

MODIFIED

Inicio | Turbochrom Navigator | Doc1 - Microsoft Word | Method Editor - C:\A... | 05:44 p.m.

PANTALLA # 8: PROGRAMACIÓN DE LA TEMPERATURA DEL HORNO

Method Editor - C:\ALC.MTH

File Instrument Process Calibration Review Other Setup Help

Data Acquisition and Instrument Control

Oven/Zones

Oven Ramp	Rate	Temp	Hold
Initial	0.0	40	2.00
1	0.0	0	0.00
2	0.0	0	0.00
3	0.0	0	0.00

Temp. Program

Oven

Inj A: CAP

Inj B: CAP

Oven Time **2.00** min

Cryo

Coolant **OFF**

Cut-In **60** °C

Timeout **999** min

Heated Zone Setpoints

Inj A **180** °C Det A **200** °C Aux

Inj B **0** °C Det B **0** °C

Oven

Max Temp **320** °C

Equil Time **0.0** min

Final temperature for this program step [-99 to 320]

MODIFIED

Inicio Turbochrom Navigator Doc1 - Microsoft Word Method Editor - C:\A... 05:44 p.m.

PANTALLA # 9: PROGRAMACIÓN DE LAS CONDICIONES DEL DETECTOR

Method Editor - C:\ALC.MTH

File Instrument Process Calibration Review Other Setup Help

Data Acquisition and Instrument Control

Instrument Name : AUTOSYS_-_0:A Injection : MANUAL Inlet A : CAP

Detectors

A - Detector FID

Range **1** Time constant **200** PMT% **0**

Polarity: (+) Positive (-) Negative

Autozero: ON OFF Value **1**

INT

Attenuation **0** Offset **5.0** mV

Gases

H2 **45.0** mL/m

Air **450.0** mL/m

B - Detector NPD

Range **1** Time constant **200** PMT% **0**

Polarity: (+) Positive (-) Negative

Autozero: ON OFF Value **1**

INT

Attenuation **0** Offset **5.0** mV

Gases

H2 **2** mL/m

Air **100** mL/m

OK Cancel

Sensitivity setting of detector A

MODIFIED

Inicio Turbochrom Navigator Doc1 - Microsoft Word Method Editor - C:\A... 05:45 p.m.

PANTALLA # 10: PROGRAMACIÓN DE LAS ESCALAS PARA LA PRESENTACIÓN DEL REPORTE GRÁFICO EN TIEMPO REAL.

The screenshot displays the 'Method Editor' software interface. The main window title is 'Method Editor - C:\ALC.MTH'. The menu bar includes 'File', 'Instrument', 'Process', 'Calibration', 'Review', 'Other', 'Setup', and 'Help'. The left sidebar shows a tree view with categories like 'Data Acquisition and Instrument Control', 'Data Processing and I', and 'Component List and C'. The main area shows experimental parameters: Instrument Name: AUTOSYS_-_0:A, Injection: MANUAL, Inlet A: CAP, Experiment Time: 2.00 min, Injection Volume: , Inlet B: CAP, Delay Time: , Run Time: , FID, and NPD. A 'Real-Time Plot Scale' dialog box is open, allowing configuration for Channel A and Channel B. Channel A settings are Offset (mV): 4.000, Full Scale (mV): 15.000, and # of Pages: 1. Channel B settings are Offset (mV): 0.000, Full Scale (mV): 1000.000, and # of Pages: 1. The dialog includes 'OK', 'Cancel', and 'Reset' buttons. A status bar at the bottom of the dialog indicates 'Signal level at the Y-axis minimum [-1.0e+04 to 10000.000]'. The Windows taskbar at the bottom shows the 'Inicio' button, several icons, and open applications: 'Turbochrom Navigator', 'Doc1 - Microsoft Word', and 'Method Editor - C:\A...'. The system clock shows '05:46 p.m.' and a 'MODIFIED' indicator is visible in the top right of the application window.

ANEXO 2

FOTOGRAFÍAS



FOTOGRAFIA 1. AREA FISICOQUÍMICA. MATERIALES Y REACTIVOS NECESARIOS PARA LA PREPARACIÓN DE LAS DISOLUCIONES.



FOTOGRAFIA 2 Y 3: ETAPA DE PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES STANDARS



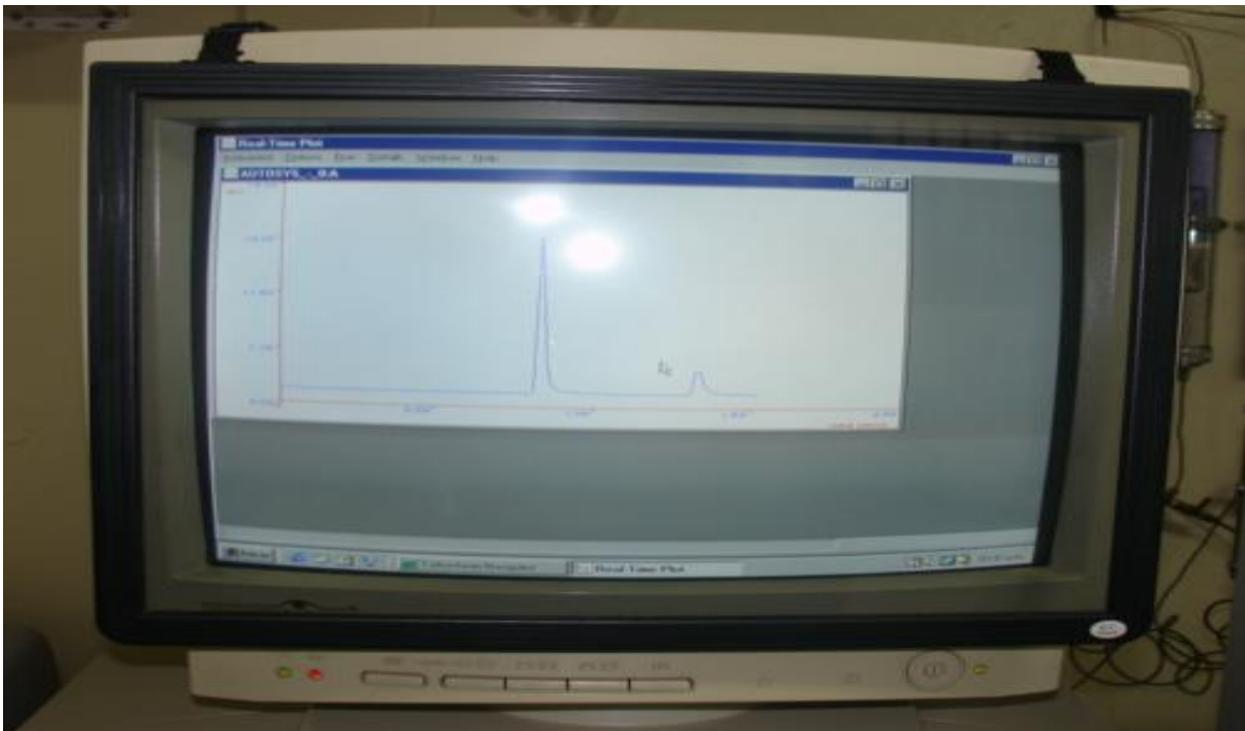
FOTOGRAFIA 4 Y 5: PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS A INYECTAR



FOTOGRAFIA 6: PROGRAMACIÓN DEL METODO EN EL CROMATOGRAFO DE GAS.



FOTOGRAFIA 7: INYECCIÓN DE LAS MUESTRAS EN EL CROMATOGRFO DE GAS



FOTOGRAFIA 8: A LA IZQUIERDA EL PICO CROMATOGRAFICO DE ETANOL Y A LA DERECHA EL PICO DEL N-PROPANAOL.