



**FACULTAD DE MEDICINA
Y ODONTOLOGÍA**
Departamento de Anatomía Patológica
y Ciencias Forenses

UTILIZACIÓN DE LA ENERGÍA DE MICROONDAS PARA LA EXTRACCIÓN DE DROGAS DE ABUSO A PARTIR DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

Memoria presentada por:

Cristina Vázquez López

Para optar al grado de
Doctor por la Universidad
de Santiago de Compostela

Santiago de Compostela, Diciembre 2010

ISBN 978-84-9887-762-5 (Edición digital PDF)



**FACULTAD DE MEDICINA
Y ODONTOLOGÍA**
Departamento de Anatomía Patológica
y Ciencias Forenses

Dña. Purificación Fernández Gómez, Catedrática de Toxicología y **Dña. Ana María Bermejo Barrera**, Catedrática de Toxicología de la Universidad de Santiago de Compostela

Certifican:

Que la presente memoria, titulada *UTILIZACIÓN DE LA ENERGÍA DE MICROONDAS PARA LA EXTRACCIÓN DE DROGAS DE ABUSO A PARTIR DE MUESTRAS BIOLÓGICAS* que presenta la Licenciada en Farmacia **Cristina Vázquez López** para optar al grado de Doctor ha sido realizada bajo su dirección en este Departamento y, a su juicio, reúne todos los requisitos exigidos por la normativa vigente para la elaboración y presentación de Tesis Doctorales.

Y para que así conste, firman el presente informe en Santiago de Compostela, a 22 de Diciembre de 2010.

Purificación Fernández Gómez

Ana María Bermejo Barrera

AGRADECIMIENTOS

A la Doctora Purificación Fernández Gómez, Catedrática de Toxicología de la Universidad de Santiago de Compostela, por su dirección, ayuda, apoyo fundamental e insustituible y paciencia constante prestada durante estos años, sin la cual nunca hubiera podido concluir esta tesis.

A la profesora Ana Bermejo y a la doctora María Jesús Tabernero, por su interés y por crear un agradable ambiente de trabajo.

A Lorena por su colaboración en el trabajo diario de esta tesis. A Santy, Marta Lago, Ana, Marta Concheiro, Iván, Dani, Oscar y todos los demás compañeros del departamento por su gran acogida y colaboración.

A mis padres y a Julio por su apoyo incondicional y por aguantarme en estos días de estrés final.

ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO 1:	
CONSUMO DE DROGAS	19
CAPÍTULO 2.	
COCAÍNA Y METABOLITOS	37
CAPÍTULO 3.	
OPIÁCEOS	59
CAPÍTULO 4.	
MUESTRAS BIOLÓGICAS	85
CAPÍTULO 5.	
METODOLOGÍA ANALÍTICA	97
CAPÍTULO 6.	
ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	113
CAPÍTULO 7.	
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	133
CAPÍTULO 8.	
MATERIAL Y MÉTODOS	139
CAPÍTULO 9.	
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	161
CAPÍTULO 10.	
CONCLUSIONES	241

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tendencias de la prevalencia del consumo de cocaína durante el último año entre la población adulta joven (15-34 años) [2].....	22
Figura 2. Estimaciones de la prevalencia anual del consumo problemático de opiáceos (tasa por cada 1000 habitantes entre 15 y 64 años) 2003-2008 [2].....	23
Figura 3. Prevalencias de consumo de cocaína según forma de presentación (base y polvo) en la población de 15-64 años. 2007, España [1]	25
Figura 4. Prevalencia de consumo de heroína en la población de 15-64 años (%). España, 1995-2007 [1].....	26
Figura 5. Evaluación de los consumos de drogas ilícitas, hipnóticos y tranquilizantes en los últimos seis meses (%). Galicia, 2000-2004 [5]	27
Figura 6. Evolución de la mortalidad por reacción aguda tras el consumo de sustancias psicoactivas en Galicia según año de defunción, 1995-2008 [5]	30
Figura 7. Hojas de Erytroxylon coca	39
Figura 8. Hojas de cocaína	41
Figura 9. Pasta de coca	41
Figura 10. Clorhidrato de cocaína.....	41
Figura 11. Cocaína-Crack.....	41
Figura 12. Estructura química de la Cocaína.....	42
Figura 13. Niveles plasmáticos para cada una de las vías de administración [5]	43
Figura 14. Metabolismo de la Cocaína [13]	45
Figura 15. Mecanismo de acción de la cocaína.....	47
Figura 16. Hemorragia cerebral con afectación de los núcleos basales	48
Figura 17. Cápsula de adormidera	61
Figura 18. Papaver somniferum.....	61
Figura 19. Heroína en sus distintas formas: marrón, blanca, papelinás	62
Figura 20. Estructura química de Morfina, Codeína, Heroína y 6AM	63
Figura 21. Estructura química de la Metadona.....	64
Figura 22. Metabolismo de Heroína y Morfina	67
Figura 23. Metabolismo de la Codeína.....	68

Figura 24. Metabolismo de la Metadona	68
Figura 25. Mecanismo de acción de los opiáceos	70
Figura 26. Edema pulmonar no cardiogénico.....	71
Figura 27. Unidad funcional del riñón: Nefrona [1].....	87
Figura 28. Partes del ojo humano [8]	89
Figura 29. Sistema de SPE utilizado en este trabajo.....	100
Figura 30. Sistema de microondas utilizado en el trabajo.....	102
Figura 31. Esquema de un equipo de HPLC [7].....	103
Figura 32. Esquema básico de un detector de red de diodos.....	105
Figura 33. Sistema HPLC-DAD empleado para la realización del trabajo.....	142
Figura 34. Esquema de la SPE para la orina	148
Figura 35. Esquema de la MAE para la orina	149
Figura 36. Esquema de la SPE para el humor vítreo.....	151
Figura 37. Esquema de la MAE para el humor vítreo	152
Figura 38. Espectros de Morfina (rojo), Codeína (azul) y 6AM (verde)	165
Figura 39. Espectros de Cocaína (azul), Cocaetileno (verde) y BEG (rojo)	165
Figura 40. Espectros de Metadona (azul) y EDDP (rojo).....	165
Figura 41. Cromatograma tridimensional de una disolución patrón (Conc.=10 µg/mL) (1: Morfina; 2: Codeína; 3: BEG; 4: 6AM; 5: Cocaína; 6: Cocaetileno; 7: EDDP; 8: Metadona).....	166
Figura 42. Cromatogramas de dos orinas blanco	167
Figura 43. Cromatograma de Morfina, Codeína y 6AM	169
Figura 44. Cromatograma de BEG, Cocaína y Cocaetileno	169
Figura 45 Cromatograma de EDDP y Metadona.....	169
Figura 46. Recta de calibrado de Morfina en orina (SPE).....	171
Figura 47. Recta de calibrado de Codeína en orina (SPE).....	171
Figura 48. Recta de calibrado de 6AM en orina (SPE)	171
Figura 49. Recta de calibrado de Cocaína en orina (SPE)	172
Figura 50. Recta de calibrado de BEG en orina (SPE).....	172
Figura 51. Recta de calibrado de Cocaetileno en orina (SPE).....	172

Figura 52. Recta de calibrado de EDDP en orina (SPE).....	173
Figura 53. Recta de calibrado de Metadona en orina (SPE).....	173
Figura 54. Cromatogramas de un blanco de orina (a) y de un estándar (b) ($\lambda = 233 \text{ nm}$).....	175
Figura 55. Recuperaciones en orina para conc: 2 $\mu\text{g/mL}$ y 10 $\mu\text{g/mL}$	178
Figura 56. Número de casos positivos para cada sustancia en orina.....	181
Figura 57. Cromatograma del caso número 20 (orina diluida 1:25).....	181
Figura 58. Comparación de los límites de detección	183
Figura 59. Comparación de las recuperaciones medias en orina	186
Figura 60. Cromatogramas de diferentes lavados	188
Figura 61. Optimización del eluyente	189
Figura 62. Cromatogramas obtenidos para cada longitud de onda en humor vítreo.....	190
Figura 63. Recta de calibrado de Morfina en humor vítreo (SPE)	192
Figura 64. Recta de calibrado de Codeína en humor vítreo (SPE).....	192
Figura 65. Recta de calibrado de 6AM en humor vítreo (SPE)	192
Figura 66. Recta de calibrado de BEG en humor vítreo (SPE).....	193
Figura 67. Recta de calibrado de Cocaína en humor vítreo (SPE).....	193
Figura 68. Recta de calibrado de Cocaetileno en humor vítreo (SPE)	193
Figura 69. Recta de calibrado de EDDP en humor vítreo (SPE)	194
Figura 70. Recta de calibrado de Metadona en humor vítreo (SPE)	194
Figura 71. Cromatogramas de humor vítreo blanco (a) y de un estándar (b).....	196
Figura 72. Recuperaciones en humor vítreo (SPE)	201
Figura 73. Número de casos positivos para cada sustancia.....	203
Figura 74. Cromatogramas del caso número 4	203
Figura 75. Respuestas de las drogas extraídas con distintos disolventes (MAE)	205
Figura 76. Variación de la respuesta de la morfina en el plano: temperatura-volumen disolvente.....	207
Figura 77. Variación de la respuesta de la morfina en el plano: tiempo-volumen disolvente.....	207
Figura 78. Función de deseabilidad de la morfina	208
Figura 79. Variación de la deseabilidad en el plano: temperatura-volumen disolvente.....	209
Figura 80. Variación de la deseabilidad en el plano: tiempo-volumen disolvente.....	209

Figura 81. Variación de la deseabilidad en el plano: tiempo-temperatura	209
Figura 82. Cromatograma de Morfina, Codeína y 6AM	211
Figura 83. Cromatograma de BEG, Cocaína y Cocaetileno	211
Figura 84. Cromatograma de EDDP y Metadona.....	211
Figura 85. Recta de calibrado de Morfina en humor vítreo (MAE).....	213
Figura 86. Recta de calibrado de Codeína en humor vítreo (MAE).....	213
Figura 87. Recta de calibrado de 6AM en humor vítreo (MAE)	213
Figura 88. Recta de calibrado de BEG en humor vítreo (MAE)	214
Figura 89. Recta de calibrado de Cocaína en humor vítreo (MAE)	214
Figura 90. Recta de calibrado de Cocaetileno en humor vítreo (MAE).....	214
Figura 91. Recta de calibrado de EDDP en humor vítreo (MAE).....	215
Figura 92. Recta de calibrado de Metadona en humor vítreo (MAE).....	215
Figura 93. Cromatogramas de un blanco de humor vítreo (a) y un estándar (b).....	217
Figura 94. Recuperaciones obtenidas en humor vítreo usando MAE.....	222
Figura 95. Número de casos positivos para cada droga en humor vítreo	223
Figura 96. Cromatograma del caso número 8.....	224
Figura 97. Comparación de los límites de detección en humor vítreo (SPE-MAE)	227
Figura 98. Comparación de las recuperaciones en humor vítreo (SPE-MAE).....	230

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Sustancias detectadas en los fallecidos por reacción aguda al consumo de drogas confirmados toxicológicamente. Galicia 2005 [5]	31
Tabla 2. Formas de abuso de la cocaína.....	42
Tabla 3. Criterios para el diagnóstico de intoxicación por cocaína (DSM-IV)	50
Tabla 4. Criterios diagnósticos de intoxicación por opiáceos (DSM-IV).....	73
Tabla 5. Revisión bibliográfica para la determinación de drogas por HPLC	117
Tabla 6. Preparación de las disoluciones para el calibrado en orina.	144
Tabla 7. Preparación de las disoluciones para el calibrado en humor vítreo	144
Tabla 8. Gradiente utilizado en orina (SPE)	145
Tabla 9. Gradiente utilizado en humor vítreo (SPE).....	146
Tabla 10. Gradiente utilizado en humor vítreo (MAE)	146
Tabla 11. Longitudes de onda de trabajo para cada compuesto	147
Tabla 12. Tiempos de retención y longitudes de onda de trabajo.....	166
Tabla 13. Análisis de regresión en orina (SPE). Rango: 0,2-10 µg/mL.....	170
Tabla 14. Análisis de la varianza en orina (SPE). Rango: 0,2-10 µg/mL	170
Tabla 15. Límites de detección en orina (SPE)	174
Tabla 16. Valores de la precisión y la exactitud en orina (SPE).....	176
Tabla 17. Recuperaciones obtenidas en orina (SPE).....	177
Tabla 18. Niveles en orina (µg/mL) para 23 casos mortales, relacionados con consumo de heroína, cocaína y/o metadona	179
Tabla 19. Comparación de los coeficientes de correlación en orina (SPE-MAE)	182
Tabla 20. Comparación de los límites de detección y cuantificación en orina (SPE-MAE)	183
Tabla 21. Comparación de la precisión y la exactitud en orina (SPE-MAE)	184
Tabla 22. Comparación de las recuperaciones medias en orina (SPE-MAE).....	186
Tabla 23. Proporción de metanol en la fase de lavado	188
Tabla 24. Análisis de regresión en humor vítreo (SPE). Rango: 0,1-4 µg/mL.....	191
Tabla 25. Análisis de la varianza en humor vítreo (SPE). Rango: 0,1-4 µg/mL	191
Tabla 26. Límites de detección en humor vítreo (SPE).....	195

Tabla 27. Precisión y exactitud intra-día en humor vítreo (SPE).....	197
Tabla 28. Precisión y exactitud inter-día en humor vítreo (SPE).....	198
Tabla 29. Recuperaciones en humor vítreo (SPE).....	200
Tabla 30. Concentraciones en muestras reales de humor vítreo (SPE)	202
Tabla 31. Dominio experimental	205
Tabla 32. Matriz de experiencias	206
Tabla 33. Plan de experimentación	206
Tabla 34. Condiciones finales del proceso de extracción.....	210
Tabla 35. Análisis de regresión en humor vítreo (MAE). Rango: 0,1 – 4 µg/mL	212
Tabla 36. Análisis de la varianza en humor vítreo (MAE). Rango: 0,1 – 4 µg/mL.....	212
Tabla 37. Límites de detección en humor vítreo (MAE)	216
Tabla 38. Precisión y exactitud intra-día en humor vítreo (MAE)	218
Tabla 39. Precisión y exactitud inter-día en humor vítreo (MAE)	219
Tabla 40. Recuperaciones en humor vítreo (MAE)	221
Tabla 41. Concentraciones en muestras reales de humor vítreo (MAE).....	223
Tabla 42. -Comparación de los coeficientes de correlación en humor vítreo (SPE-MAE).....	226
Tabla 43. Comparación de los límites de detección y cuantificación en humor vítreo (SPE-MAE) ..	227
Tabla 44. Comparación de la precisión y la exactitud en humor vítreo (SPE-MAE)	228
Tabla 45. Comparación de las recuperaciones en humor vítreo (SPE-MAE)	230

ABREVIATURAS

ADVPs	Adictos a drogas por vía parenteral
AMP	Adenosin monofosfato
6AM	6-Acetil morfina
BEG	Benzoilecgonina
DCM	Diclorometano
CET	Cocaetileno
C-LM	Castilla la Mancha
COC	Cocaína
COD	Codeína
CV	Coefficiente de variación
DAD	Detector de array de diodos
DSM-IV	Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales, cuarta edición
E_r	Error medio relativo
EDDP	2-etilen-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina
EMDP	2-etil-5-metil-3,3-difenilpirrolidina
EME	Ecgonina metil ester
FDA	Food and Drug Administration
FID	Detector de ionización de llama
GC	Cromatografía de gases
HIV	Virus inmunodeficiencia humana
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
ICH	International Conference of Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
LLE	Extracción líquido-líquido
LLOQ	Límite inferior de cuantificación
LOD	Límite de detección
MAE	Extracción asistida por microondas
MTD	Metadona
M3G	Morfina 3-glucurónido
M6G	Morfina 6-glucurónido
MRF	Morfina
MS	Espectrómetro de masas
MS-MS	Espectrómetro de masas en tandem
OED	Observatorio Español sobre Drogas
OEDT	Observatorio Europeo de Drogas y Toxicomanías
OGD	Observatorio sobre Drogas en Galicia
OMS	Organización Mundial de la Salud

PAH	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
PCB	Policlorobifenilos
PMM	Programas de mantenimiento con metadona
PNSD	Plan Nacional sobre Drogas
QP	Quality pressure
RSD	Desviación estándar relativa
SAFA	Asociación de ayuda al drogodependiente
SNC	Sistema Nervioso Central
SPE	Extracción en fase sólida
UV	Ultravioleta
VLM EC1	Termostato de bloque metálico, con suministro múltiple de Nitrógeno
IUML	Instituto Universitario de Medicina Legal de Santiago de Compostela

Capítulo

1

**Consumo
de drogas**

CAPÍTULO 1: CONSUMO DE DROGAS

1. Evolución del consumo de drogas
 - 1.1.- Situación actual del consumo de drogas en Europa
 - 1.2.- Situación actual del consumo de drogas en España
 - 1.3.- Situación actual del consumo de drogas en Galicia
2. Problemas derivados del consumo de drogas
3. Referencias bibliográficas

1. EVOLUCIÓN DEL CONSUMO DE DROGAS

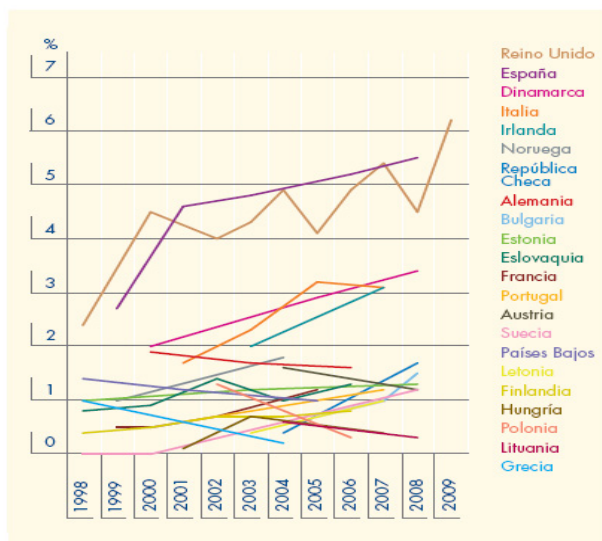
La Organización Mundial de la Salud (OMS) define *droga* como “aquella sustancia química, de origen natural o sintético, que, introducida en el organismo por cualquier vía de administración, produce una alteración del funcionamiento natural del sistema nervioso central del individuo y es además susceptible de crear dependencia psíquica y/o física”.

Según datos del Observatorio Español sobre Drogas (OED) [1], entre las drogas de comercio ilegal, las sustancias más extendidas entre la población española, son los derivados cannábicos, la cocaína y el éxtasis, todas con prevalencias de consumo en los últimos 12 meses que superan el 1% (10,1% cannabis, 3,0% cocaína y 1,1% éxtasis). En la mayor parte de los países europeos, el primer lugar lo ocupa el cannabis, y el segundo las anfetaminas [2].

1.1. SITUACIÓN ACTUAL DEL CONSUMO DE DROGAS EN EUROPA

Según el Observatorio Europeo de Drogas y Toxicomanías (OEDT, 2009), la cocaína comenzó a usarse regularmente en la década de los años setenta y constituye en la actualidad, después del cannabis, la droga ilegal de mayor tráfico en el mundo y la más consumida en la Unión Europea. Se estima que en 2008 se incautaron alrededor de 711 toneladas mundiales, con 95.700 operaciones de cocaína en Europa. El principal proveedor es Colombia y los puntos de entrada más frecuentes en Europa son la Península Ibérica, especialmente España y los Países Bajos.

Se calcula que han consumido cocaína al menos una vez en su vida alrededor de 14 millones de europeos (4,1% de la población adulta), durante el último año más de 4 millones, y durante el último mes 2 millones de personas [2]. En los países que presentan una prevalencia elevada (Dinamarca, España, Italia y Reino Unido), ésta se concentra entre los adultos de 15-34 años, que además suelen ser consumidores habituales de otras sustancias como alcohol, cannabis y otros estimulantes (Figura 1). El consumo de crack en Europa sigue siendo relativamente poco frecuente y se concentra en las subpoblaciones marginadas de algunas ciudades.



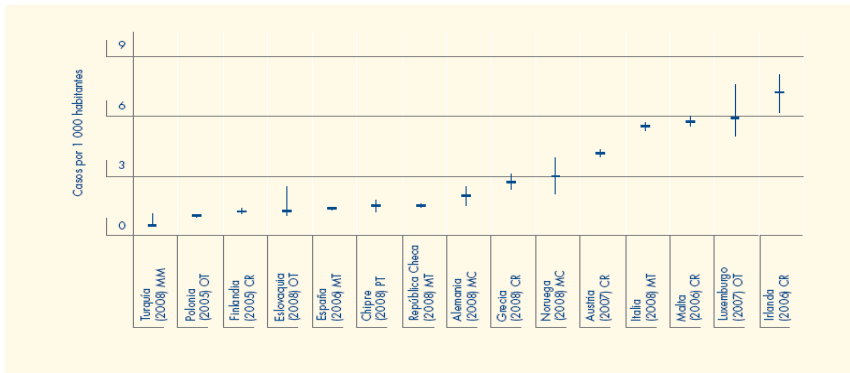
N.B.: Para mayor información, véase el gráfico GPS-14 (parte i) en el boletín estadístico de 2010.
 Fuente: Puntos focales nacionales de la red Reitox.

Figura 1. Tendencias de la prevalencia del consumo de cocaína durante el último año entre la población adulta joven (15-34 años) [2]

Se ha observado que la mayoría de las muertes por cocaína están relacionadas con el consumo crónico de esta droga que conlleva problemas cardiovasculares y neurológicos, así como la presencia de otras sustancias como alcohol y opiáceos. Cada año se informa de unas 400 muertes relacionadas con la cocaína en Europa, pero se sospecha que buena parte de las muertes ocasionadas por problemas cardiovasculares inducidos por la cocaína no se detectan.

La heroína que se consume en Europa se produce principalmente en Afganistán que continúa siendo el líder mundial del suministro de opio ilegal y sus drogas derivadas, morfina y heroína. Existen dos rutas principales de entrada a Europa: la ruta de los Balcanes, por Pakistán, Irán y Turquía, y la ruta de la seda, a través de Asia Central y Rusia. Las incautaciones mundiales de opio han disminuido tras el máximo alcanzado en el 2007. La estimación de la incautación mundial en el último año es de 92 toneladas, realizándose en Europa 54.400 incautaciones que permitieron aprehender unas 22 toneladas de heroína.

Dada la prevalencia relativamente reducida y la naturaleza oculta de este tipo de consumo de droga se hacen estimaciones de prevalencia de consumidores problemáticos de opiáceos en los países europeos (Figura 2).



N.B.: Una marca horizontal indica una estimación de punto; la marca vertical indica una estimación del intervalo de incertidumbre; un intervalo de confianza del 95 % o un intervalo basado en un análisis de sensibilidad. Los grupos destinatarios pueden variar ligeramente debido a la utilización de métodos de estimación y fuentes de datos diferentes, por lo que las comparaciones deben realizarse con cautela. Se utilizaron franjas de edad no normalizadas en los estudios de Finlandia (15-54), Malta (12-64) y Polonia (todas las edades). Las tres tasas se ajustaron a la población de 15 a 64 años de edad. En el caso de Alemania, el intervalo representa los valores máximo y mínimo de todas las estimaciones realizadas, y la estimación de punto, una media sencilla de los puntos medios. Los métodos de estimación se representan con las siguientes siglas: CR = captura-recaptura de datos; MT = multiplicador de tratamiento; MM = multiplicador de mortalidad; MC = métodos combinados; PT = Poisson truncado; OT = otros métodos. Para más información, véase el gráfico PDU-1 (parte ii) y tabla PDU-102 en el boletín estadístico de 2010.

Fuente: Puntos focales nacionales de la red Reitox.

Figura 2. Estimaciones de la prevalencia anual del consumo problemático de opiáceos (tasa por cada 1000 habitantes entre 15 y 64 años) 2003-2008 [2]

Los informes procedentes de algunos países revelan que el consumo de heroína podría haberse estabilizado durante el período 2003-2008 pero no es posible prever un descenso significativo en un futuro inmediato por el nivel record de opio producido en Afganistán en 2007, la incorporación de nuevos jóvenes drogodependientes y el aumento de los problemas relacionados con los opiáceos sintéticos.

La heroína o sus metabolitos están presentes en la mayoría de las muertes súbitas causadas por drogas ilegales y representan el 35% de los casos en 2007; el perfil medio se corresponde con un hombre de 35 años, consumidor por vía parenteral, que vive en zonas urbanas [3].

1.2. SITUACIÓN ACTUAL DEL CONSUMO DE DROGAS EN ESPAÑA

El consumo de drogas en nuestro país y su evolución y cambios de paradigmas comprende cuatro períodos distintos [4].

El primer período se extiende desde finales de los años 60 a finales de los 70. Aunque de la primera mitad de este período no existen datos epidemiológicos fiables, ya era conocido el consumo de tabaco, alcohol y cannabis, así como de ciertos psicoestimulantes como las anfetaminas y la cocaína en sectores de élite culturales y sociales, y/o el abuso de hipnosedantes.

Durante toda la década de los 80, el consumo de drogas genera una intensa alarma social y un fuerte rechazo por la población, que piensa que las drogas crean problemas de “delincuencia e inseguridad ciudadana”. En este clima de preocupación se produce una fuerte implicación de las autoridades públicas, y se realizan estudios sobre las drogas dentro del recién constituido Plan Nacional sobre Drogas (PNSD, 1986). En este momento, al protagonismo de la heroína se añade el consumo creciente pero enmascarado de la cocaína, dado que esta droga tiene un período de “silencio clínico” de 3-5 años. A partir de esta etapa aparecen los problemas de salud, la polémica en torno a la peligrosidad del cannabis y la extensión del problema de la toxicomanía desde los jóvenes a todos los grupos sociales. Las tasas de mortalidad y atención hospitalaria urgente se disparan y surge una nueva pandemia: el contagio por HIV (virus inmunodeficiencia humana) en la población drogodependiente.

En la década de los 90 se observa una progresiva incorporación de las mujeres y se consolidan una serie de cambios en el consumo de drogas:

- Estancamiento y reducción del consumo de heroína, aunque sigue teniendo gran importancia desde el punto de vista epidemiológico.
- Incremento de consumidores de cannabis y de cocaína en polvo.
- Liderazgo de los psicoestimulantes, como principal modelo de policonsumo, desplazando al de los narcóticos.

Entre los años 2000 y 2008, los elementos más destacados son:

- Continúa disminuyendo progresivamente el número de usuarios de drogas por vía parenteral.
- Se estabiliza el consumo de cannabis y cocaína.

- Desciende lentamente la mortalidad relacionada con drogas ilegales, aunque persiste un número apreciable de muertes por esta causa.
- Después de muchos años de descenso continuado del consumo de heroína, algunos datos parecen apuntar a una estabilización del mismo o a un cierto incremento en el caso de la heroína fumada.

Según el *Observatorio Español sobre Drogas (OED, 2009)*, la cocaína es actualmente la droga ilegal de mayor consumo y la que genera un mayor número de problemas en España. El clorhidrato de cocaína o “cocaína en polvo” es la segunda droga psicoactiva ilegal en cuanto a prevalencia: un 8% de la población de 15-64 años la ha consumido alguna vez, un 3% lo ha hecho durante el último año, y un 1,6% el último mes. La prevalencia más elevada se dio en hombres de 15-34 años y la edad media de primer consumo se situó en 20,9 años. Las cifras son bastante menores para el consumo de cocaína base o “crack” (Figura 3).

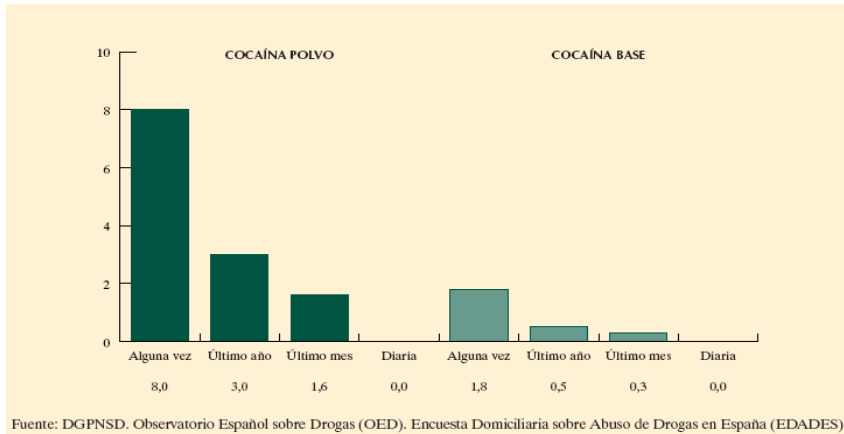


Figura 3. Prevalencias de consumo de cocaína según forma de presentación (base y polvo) en la población de 15-64 años. 2007, España [1]

Por lo que respecta a las tendencias temporales, la prevalencia de cocaína en polvo se ha mantenido estabilizada. De hecho la prevalencia de consumo en los últimos 12 meses aumentó entre 1995 (1,8%) y 2005 (3%), y en 2007 continúa en el 3%. Sin embargo se ha producido un incremento en la prevalencia de cocaína base, pasando de 0,1% en 2003 a 0,2% en 2005 y a 0,5% en 2007.

El resto de sustancias psicoactivas, incluyendo la heroína, se consumen con una frecuencia bastante menor, siendo la prevalencia de experimentadores (han probado alguna vez en la vida) del 0,8%. Como en los casos anteriores, el consumo está bastante más extendido entre los hombres de 15-34 años. Con respecto a las tendencias temporales, se aprecia una tendencia al descenso hasta 1999 y a partir de ese año una tendencia a la estabilización o al ascenso (Figura 4).

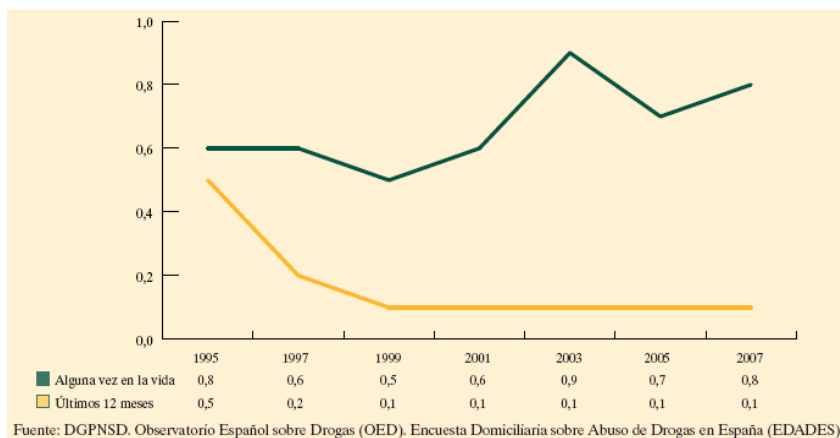
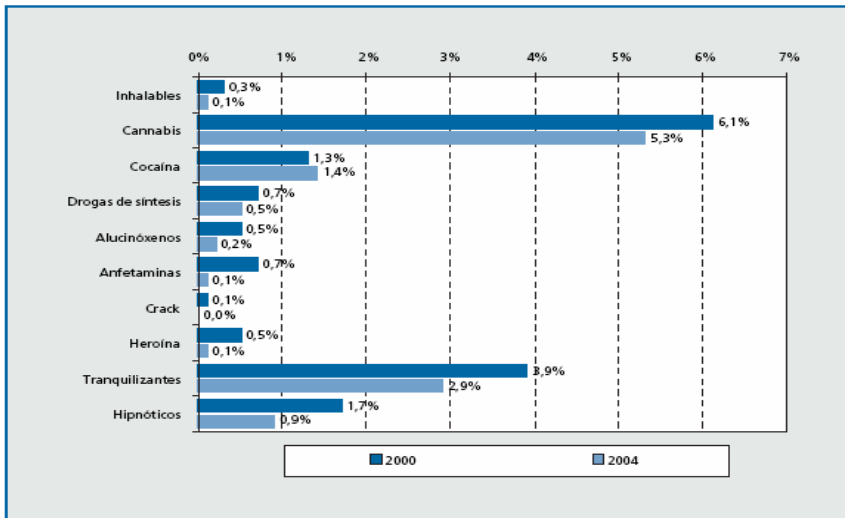


Figura 4. Prevalencia de consumo de heroína en la población de 15-64 años (%). España, 1995-2007 [1]

1.3. SITUACIÓN ACTUAL DEL CONSUMO DE DROGAS EN GALICIA

Según el Observatorio sobre Drogas en Galicia (OGD, 2006) [5], la evolución reciente del consumo de drogas resulta globalmente positiva, y debe destacarse que son precisamente las sustancias con un impacto más negativo sobre la salud las que registraron mayores retrocesos. En el período 2000-2004 se observa una tendencia descendente en el consumo de todas las drogas a excepción de la cocaína, que se mantiene en situación casi estacionaria. Sin embargo, no es posible asegurar una consolidación de estas mejoras pues se observa un dinamismo constante de los hábitos de consumo, debido a los esfuerzos de los traficantes de drogas para fomentar su uso y atraer nuevos consumidores (Figura 5).



FONTE: O consumo de drogas en Galicia, 2000-2004

Figura 5. Evaluación de los consumos de drogas ilícitas, hipnóticos y tranquilizantes en los últimos seis meses (%). Galicia, 2000-2004 [5]

Existen diferencias relevantes en la evolución mantenida entre 1992 y 2004: los adolescentes de 12-18 años incrementaron los consumos de todas las drogas hasta 2002 y luego disminuyeron; los jóvenes de 19-24 años redujeron el consumo de heroína, mientras que aumentaron el de cocaína; los adultos de 25-39 años redujeron el consumo de cocaína y heroína; y entre los adultos de 40-54 años aumentaron los consumidores de cocaína y heroína, descendiendo el consumo abusivo de alcohol y otras drogas.

La disponibilidad de cocaína en Galicia se puede observar directamente por la cantidad incautada. En el período 1995-2003, las incautaciones se multiplicaron por 2,7 veces, en tanto que disminuyeron entre 2003 y 2005. La tendencia del consumo de cocaína en Galicia en el período 1998-2004 difiere según el indicador seleccionado: mientras que aumenta el porcentaje de personas que consumieron alguna vez esta sustancia, se reducen los consumos en los últimos 6 meses y en el último mes; predomina pues el consumo esporádico y así se mantiene desde hace más de una década. En 2004, el consumo de cocaína es, después del cannabis, el de mayor prevalencia, si bien en niveles claramente más bajos que en el conjunto

del Estado: un 3,9% de la población gallega ha consumido alguna vez cocaína, un 1,4% mantenía consumos ocasionales (últimos seis meses) y un 1,0% consumos habituales (últimos treinta días). La edad media de inicio al consumo de cocaína se situaba en 20,2 años en 2004 y en 19,9 años en 1988, siendo este atraso coherente con el descenso observado en el uso de cocaína entre los adolescentes gallegos de 12 a 18 años. El consumo de cocaína, como el de las restantes drogas ilícitas, continúa siendo un comportamiento eminentemente masculino y vinculado a sectores juveniles (19-24 años) que viven en poblaciones urbanas de más de 50.000 habitantes. Las pautas de consumo de cocaína varían enormemente, desde la vía intranasal a la parenteral (junto con heroína).

En el período 2001-2005 el porcentaje de tratamientos por abuso de cocaína se cuadruplicó. Así, de las 3.687 admisiones a tratamiento registradas en 2005, el 25,2% estuvo motivado por el consumo de cocaína como droga principal y, por primera vez, la heroína fue la responsable de menos del 50% de las admisiones.

El consumo de crack en Galicia es tan minoritario y marginal que no permite un análisis tan detallado como en el caso anterior. Esta sustancia se introdujo por primera vez en Galicia en un estudio de 1998, en el cual se observó un consumo de un 0.1%, que se mantiene hasta el año 2000, de forma similar a lo observado en España. La prevalencia máxima se da en hombres de 25 a 39 años que también consumen narcóticos.

Las incautaciones de heroína fueron tradicionalmente reducidas en Galicia; solo en 2001 se produjo un record histórico (118,1 kg), que luego disminuyó hasta 9,7 kg en 2005. La evolución del consumo de heroína entre 1988 y 2004 registró un claro retroceso según todos los indicadores disponibles; en algunos casos esto puede ser debido a tratamiento con metadona en sustitución de heroína. Las prevalencias de uso en los últimos seis meses pasaron del 1,0% al 0,1%, mientras que los consumos en los últimos treinta días cayeron del 0,9% al 0,1%. Los consumos experimentales fueron mayoritarios en hombres de 19-39 años que viven en poblaciones costeras de más de 50.000 habitantes y se redujeron, desde 1996 a 2004, del 1,2% al 0,4% de la población. La edad media de inicio al consumo de heroína aumentó desde 18,4 años en 1988 hasta 19,2 años en 2004, lo que explicaría el envejecimiento de consumidores crónicos y la disminución de nuevos consumidores adolescentes. Sin

embargo, existen indicadores de tipo asistencial y/o policial que indican un posible repunte del uso de heroína tras años de continuado retroceso, debido a la comercialización de esta sustancia mezclada con cocaína.

2. PROBLEMAS DERIVADOS DEL CONSUMO DE DROGAS

Los problemas derivados del consumo de drogas son múltiples y de diversa naturaleza, siendo más graves cuanto más prolongado y más frecuente sea el uso de estas sustancias. Para analizar el impacto social y sanitario que perciben los ciudadanos gallegos que consumieron alguna droga, se seleccionan tres indicadores [5]:

- * Consecuencias adversas: problemas de salud, económicos, familiares, etc
- * Grado de dependencia subjetiva
- * Necesidad de ayuda y tratamiento

Dentro del primer grupo se encuentra la mortalidad por sobredosis, que supera en diez veces la mortalidad de la población en general. En la Unión Europea las tasas de mortalidad por reacción aguda a drogas [3] son muy diversas en los distintos países europeos y oscilan entre 3 y 85 muertes por millón de habitantes. La sobredosis por heroína, sola o con alcohol, benzodiazepinas y/o cocaína, es una de las causas principales de muerte entre los jóvenes y representa el 35% de los casos. Las muertes provocadas por la cocaína resultan más difíciles de identificar y suelen atribuirse a un consumo crónico de la droga, que puede desencadenar problemas cardiovasculares y neurológicos.

En España las muertes por reacción aguda a drogas aumentaron muchísimo, desde 266 en 1983 a 1800 en 1992. Luego descendieron hasta 1100 en 1995 y hasta 475 en 2007 [1], probablemente debido al menor número de inyectores, a la expansión de los tratamientos con metadona y a otros programas de reducción del daño. Como en años anteriores, también en 2006 y 2007 en la mayor parte de los fallecidos se encontraron varias drogas, predominando los opioides (72,8%) y la cocaína (67%) [1].

En Galicia la evolución de la mortalidad en el período 1994-2006 muestra una tendencia descendente. Sin embargo, en 2007 se produce un incremento de la mortalidad (Figura 6) [5].

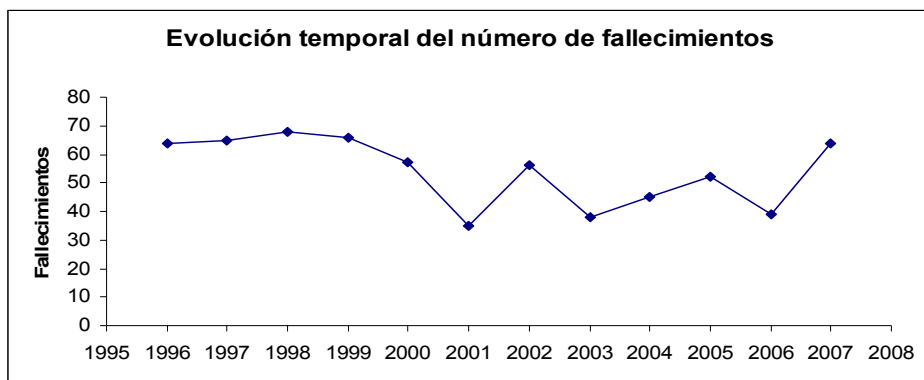


Figura 6. Evolución de la mortalidad por reacción aguda tras el consumo de sustancias psicoactivas en Galicia según año de defunción, 1995-2008 [5]

El perfil medio de un sujeto muerto por sobredosis en Galicia es un hombre de 35,9 años, que presenta un patrón de policonsumo. Se debe destacar que en 23 de las 54 muertes confirmadas toxicológicamente, se detectó la presencia de metadona, sola (7 casos) o combinada con otras drogas (16 casos), lo que evidencia que la participación en tratamientos con esta droga no excluye el consumo de otras (Tabla 1). Aunque la heroína continúa siendo la sustancia que causa un mayor número de muertes, desde 1996 su presencia se reduce drásticamente a favor de la cocaína o la mezcla heroína-cocaína.

Tabla 1. Sustancias detectadas en los fallecidos por reacción aguda al consumo de drogas confirmados toxicológicamente. Galicia 2005 [5]

SUSTANCIAS DETECTADAS	HRN*	COC*	H+C*	MTD*
Só a droga que aparece en cabeceira	3	3	7	0
Metadona	3	8	5	0
Alcohol	2	2	5	0
Benzodiazepinas	1	0	3	6
Alcohol + Benzodiazepinas	2	1	3	1
Alcohol + Outras	0	0	0	0
Benzodiazepinas + outras	0	0	0	0
Total	11 (20,4%)	14 (25,9%)	22 (40,7%)	7 (13,0%)

FONTE: Indicador de Mortalidade por reacción aguda ao consumo de drogas, 1996-2005.

También los consumidores de drogas fallecen por otras causas como el sida, hepatitis, violencia, suicidio o accidentes. Entre 1993 y 1996 el sida fue la primera causa de muerte en Galicia entre los jóvenes de 25-34 años; fue desplazada a la segunda posición en 1997-1999, por detrás de los accidentes de tráfico, y ocupó el tercer lugar en el período 2002-2003, por detrás de los accidentes de tráfico y/o suicidios/lesiones. Los tratamientos antiretrovirales han conseguido reducir drásticamente el número de muertes por sida, pasando de 36,3 en 1996 a 3,7 por cada 100 000 habitantes en 2003.

En el período 1988-2004 se produjo un notable descenso en el porcentaje de individuos que dicen sufrir algún tipo de problema causado por el uso de las drogas, que pasó del 48,4% al 12,0%. Esto apuntaría a un cierto “aprendizaje social” en el manejo de estas sustancias.

Un segundo indicador es el grado de dependencia subjetiva, que se refiere a un conjunto de fenómenos comportamentales cognitivos y fisiológicos, que se desarrollan tras el consumo reiterado de una sustancia, y que incluyen deseo intenso de consumir la droga, dificultades para controlar el consumo, aumento de la tolerancia y a veces un cuadro de abstinencia física. De modo que estos individuos no pueden prescindir de la droga sin que aparezcan trastornos de conducta y/o una serie de signos y síntomas clínicos que desaparecen con la administración de la sustancia. Los mayores niveles de dependencia subjetiva se registran entre los

consumidores de heroína y cocaína y los menores entre los consumidores de inhalables y cannabis. La evolución seguida durante el período 1988-2004 se caracteriza por la reducción de las situaciones de dependencia severa, debido a menores prevalencias de consumo y a una creciente aceptación social de ciertos patrones de consumo.

Para completar el análisis del impacto social y sanitario que los propios consumidores atribuyen a las drogas, se estudiaron tres indicadores: consultas a personal sanitario por problemas de salud derivados del consumo, consejos recibidos para realizar tratamiento, y participación en tratamientos para abandonar el consumo. La existencia de un 12% de consumidores que afirma tener problemas de salud y de un 4,7% que reconoce una dependencia subjetiva en 2004 resulta coherente con el hecho de que uno de cada cinco consumidores realizase consultas médicas por problemas de salud derivados del consumo fundamentalmente de heroína y otros opiáceos. Un significativo porcentaje de consumidores (17,1%), también de heroína y otros opiáceos, afirmaba en 2004 que recibía consejo, sobre todo de personal sanitario, para realizar algún tratamiento rehabilitador. A pesar de los datos anteriores, sólo un 7% está realizando un tratamiento para abandonar el consumo de drogas; esto evidencia las resistencias que aún presentan muchas drogodependientes para incorporarse a una terapia. La evolución seguida por los tres indicadores durante el período 1988-2004 es bastante similar e indica una tendencia ascendente hasta 1996, comenzando después un descenso continuado.

3. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Observatorio Español sobre Drogas (OED). Informe 2009. Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas. <http://www.unad.org/>

[2] Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías (OEDT). Informe Anual 2009. <http://www.emcdda.europa.eu>

[3] Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías (OEDT). Informe Anual 2007. <http://www.emcdda.europa.eu>

[4] Estrategia Nacional sobre Drogas 2009-2016. Ministerio de Sanidad y Política Social. <http://www.pnsd.msc.es/>

[5] Observatorio de Galicia sobre Drogas (OGD). Informe General 2006. Xunta de Galicia. <http://www.lasdrogas.net/>

Capítulo

2

**Cocaína y
metabolitos**

CAPÍTULO 2. COCAÍNA Y METABOLITOS

1. Aspectos generales
2. Formas de abuso y patrones de consumo
3. Estructura química y propiedades
4. Farmacocinética
 - 4.1. Absorción
 - 4.2. Distribución
 - 4.3. Metabolismo
 - 4.4. Excreción
5. Mecanismo de acción
6. Toxicidad
7. Tolerancia y Dependencia
8. Referencias bibliográficas

1. ASPECTOS GENERALES

La cocaína está presente en las hojas de la planta *Erythroxylon Coca* (Figura 7), arbusto que se cultiva sobre todo en Perú, Bolivia, Brasil y Chile. Es una planta pequeña leñosa de color pardo rojizo que alcanza hasta 120-160 cm y contiene 14-17 alcaloides, siendo la cocaína el más conocido.



Figura 7. Hojas de *Erythroxylon coca*

La palabra coca deriva de la lengua aymara y significa planta ó árbol. Las hojas de coca han sido masticadas ritualmente por los incas durante miles de años, ya que era considerada como una ofrenda mágica de los dioses. También se utilizaba como estimulante para soportar el hambre y la fatiga. En 1530, Pizarro se encontró con el imperio inca, donde la corte usaba la coca de forma liberal, como un privilegio. Es entonces cuando la Iglesia intenta suprimir su consumo al considerar que iba unido a rituales religiosos profanos, pero la medida no surtió efecto debido a las grandes sumas de dinero que estaba dejando entre los colonos españoles que la usaban para explotar a los indígenas. En el resto del mundo, no se conoció esta droga hasta 1860, año en el que Albert Niemann la aisló por primera vez, dándole el nombre de cocaína. En los años ochenta del siglo XIX Sigmund Freud se hizo consumidor de cocaína por interés científico y probablemente como automedicación de sus depresiones y dolores, y publicó su principal obra sobre la cocaína, *Über Coca*, en la cual aconseja su uso no sólo en el tratamiento de la depresión, sino del alcoholismo, de la adicción a la morfina, del asma y de problemas gastrointestinales. También observó que al aplicarla por vía oronasal producía insensibilidad de la lengua y la mucosa orofaríngea, preludio de su utilización clínica como anestésico local. Su consumo con fines recreativos fue introducido con la preparación de licores y

bebidas. Así, el químico Mariani elaboró un vino dulce con extractos de coca, utilizado como tónico y reconstituyente, y Pemberton elaboró un elixir a base de cafeína y cocaína, de nombre coca-cola.

En los comienzos del siglo XX se decidió controlar el cultivo de coca ya que empezaron a surgir los primeros cuadros psicóticos importantes. Después del convenio de La Haya (1912), se restringe el uso de cocaína al ámbito meramente terapéutico y el Harrison Narcotic Act (1914) es el primer documento que declara la ilegalidad de la droga cuando se utiliza con fines no médicos. Entre 1920 y 1970, el uso de la cocaína se limitaba a ambientes artísticos y gente de vanguardia, pero en la década de los 70, resurge el consumo como speedball (inyección de cocaína y heroína) y se detecta una mayor prevalencia de su uso intranasal o pulmonar. En los años 80, con la aparición del “crack” se reduce su coste y se incrementa el número de jóvenes usuarios, pero se observa una mayor adicción y efectos mucho más graves. A partir de los años 90 el consumo de cocaína se extiende a todas las clases sociales y la dependencia cocaínica se convierte en uno de los problemas sanitarios más graves en el mundo occidental.

2. FORMAS DE ABUSO Y PATRONES DE CONSUMO

Las formas de abuso de cocaína son de gran interés toxicológico, ya que condicionan la farmacocinética, la actividad farmacológica, la toxicidad y el grado de adicción a la droga (Tabla 2):

- Hojas de coca: es la forma de consumo habitual en Sudamérica, masticándolas con sustancias alcalinizantes. Se suele masticar una media de 12-15 g de hoja, 3 o 4 veces al día, siendo la cantidad total consumida una sola vez inferior a 75 mg (Figura 8).
- Pasta de coca, también llamada *basuco* o pasta base: se obtiene macerando las hojas de coca con ácido sulfúrico, álcalis, disolventes orgánicos y/o amoníaco. Se consume fumada con tabaco y/o marihuana (Figura 9).
- Clorhidrato de cocaína: se obtiene tratando la pasta de coca con ácido clorhídrico; es la forma habitual de consumo en España, con diversos excipientes, a concentraciones variables del 15-30% [1]. Se consume por vía

intranasal o intravenosa, mezclada con heroína para evitar los efectos rebote (Figura 10).

- Cocaína base: Se obtiene mezclando el clorhidrato de cocaína con una disolución básica, extracción posterior con éter, evaporación y obtención de un precipitado en forma de cristales. El “crack” es la segunda forma de consumo y es una mezcla de cocaína, bicarbonato de sodio y amoníaco. El crack se inhala en recipientes calentados o se fuma en pipas de cristal mezclado con tabaco, marihuana y/o fenciclidina (Figura 11).



Figura 8. Hojas de cocaína



Figura 9. Pasta de coca



Figura 10. Clorhidrato de cocaína



Figura 11. Cocaína-Crack

Estas formas de abuso pueden contener estimulantes (anfetaminas, cafeína), anestésicos locales (lidocaína, benzocaína), azúcares (lactosa, glucosa) y otras sustancias inertes [2].

Tabla 2. Formas de abuso de la cocaína

Forma de Consumo	Riqueza cocaína	Vía de administración	Aparición de efectos
Hojas Coca	0,5-1,5%	Mascado, Infusión oral	Lenta (60 min)
Pasta Coca	40-85% (sulfato cocaína)	Fumada	Muy rápida (8-10 seg.)
Clorhidrato Cocaína	12-75%	Tópica: genital, ocular, Nasal	Relativamente rápida
Clorhidrato Cocaína	12-75%	Parenteral: Endovenosa Subcutánea Intramuscular	Rápida
Cocaína base, Crack	30-80%	Intrapulmonar: - Inhalada - Fumada	Muy rápida

3. ESTRUCTURA QUÍMICA Y PROPIEDADES

La cocaína tiene como estructura base el tropano, del que deriva la ecgonina con un radical hidroxilo (OH) en el carbono 3 y un grupo carboxílico (COOH) en la posición 2, siendo por tanto, el 3-hidroxi-2-carboxi-tropano. La cocaína ó metil-benzoil-ecgonina es el éster benzoico del éster metílico del 3-hidroxi-2-carboxi-tropano (Figura 12). La unión tipo éster es importante porque este enlace se hidroliza fácilmente durante la degradación metabólica y su inactivación en el organismo.

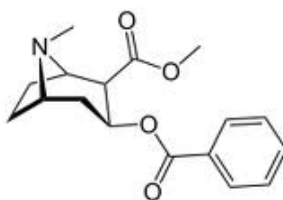


Figura 12. Estructura química de la Cocaína

La cocaína se presenta como un polvo cristalino, blanco, inodoro y de sabor amargo; es una base débil con un pKa de 8,6, un peso molecular de 303,35 g/mol, un alto porcentaje de unión a proteínas (90%) y un elevado volumen de distribución (2,7 L/Kg) [3]. Estas propiedades hacen que atraviese las membranas celulares de forma rápida y eficaz.

4. FARMACOCINÉTICA

La farmacocinética estudia los procesos de absorción de la droga, su distribución en los tejidos del organismo, su metabolismo y su excreción. La farmacocinética nos sirve para conocer la duración de acción de una droga y la velocidad de su inactivación y eliminación [4].

4.1. ABSORCIÓN

La cocaína se absorbe por todas las vías de administración. Alcanza el torrente sanguíneo rápidamente tras su administración por vía intravenosa o pulmonar, (10-60 segundos y 3-5 segundos respectivamente) siendo su absorción más limitada cuando se utilizan otras vías (5 min en el caso de la vía oral). Así, cuando se ingiere por vía oral está sometida a hidrólisis por las secreciones gastrointestinales, y la absorción a través de las mucosas nasal y genital puede ser lenta debido a la vasoconstricción que produce. La comparación de los niveles plasmáticos obtenidos para cada una de las vías de administración puede observarse en la figura 13 [5].

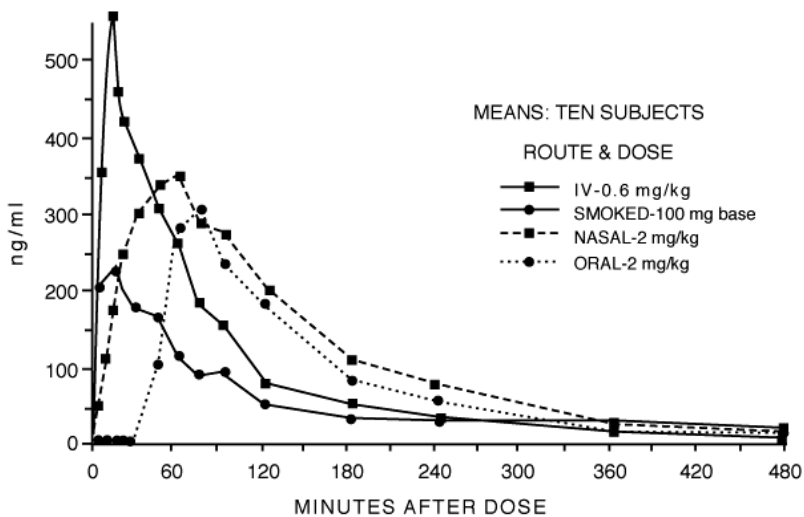


Figura 13. Niveles plasmáticos para cada una de las vías de administración [5]

La biodisponibilidad, duración de efectos y pico de efecto máximo alcanzado después de las diferentes vías de administración varía enormemente. Así la biodisponibilidad de la cocaína por vía oral es sensiblemente inferior a la obtenida por vía intrapulmonar (30% oral vs 60-70% intrapulmonar). La vía de acción más rápida es la inhada o fumada (vía intrapulmonar) ya que la cocaína se difunde muy rápidamente de pulmones a cerebro, sus efectos son inmediatos y muy intensos, sin embargo la duración de efecto es más corta (5-15 min.) [3].

4.2. DISTRIBUCIÓN

La cocaína es distribuida ampliamente por todo el organismo. Difunde fácilmente a través de las membranas celulares y barrera hematoencefálica, alcanzándose concentraciones mayores a nivel cerebral [6], lo que explica sus importantes efectos a nivel del SNC. El volumen de distribución varía entre 1.5 y 2 L/Kg, siendo de un 90% la unión a proteínas plasmáticas. Después de administrar, cocaína por vía intravenosa o inhalatoria, las concentraciones de cocaína arterial superan en gran medida a las concentraciones venosas indicando la rápida distribución en los tejidos [7]. Estudios experimentales han identificado receptores de cocaína de distinta afinidad en cerebro, hígado [8], corazón [9], pulmón, intestino, riñón [10] y testículos.

4.3. METABOLISMO

La cocaína es metabolizada por colinesterasas plasmáticas y hepáticas que hidrolizan cada uno de sus dos grupos ésteres para producir benzoilecgonina (BEG), ecgonina metil ester (EME) y posteriormente ecgonina [11]. La desmetilación por enzimas microsomales hepáticos da lugar a norcocaína la cual sufre un metabolismo posterior, produciendo N-hidroxinorcocaína y norcocaína nitróxido [12]. Las rutas metabólicas de cocaína (Figura 14) son:

- Pseudocolinesterasas plasmáticas y esterasas hepáticas (32 - 49%). Se convierte en EME
- Hidrólisis espontánea y acción de una carboxiesterasa presente en plasma y microsomas hepáticos (35 - 45%) se transforma en BEG

- Desmetilación en el hígado (2,6 - 6,2%). Se forma norcocaína

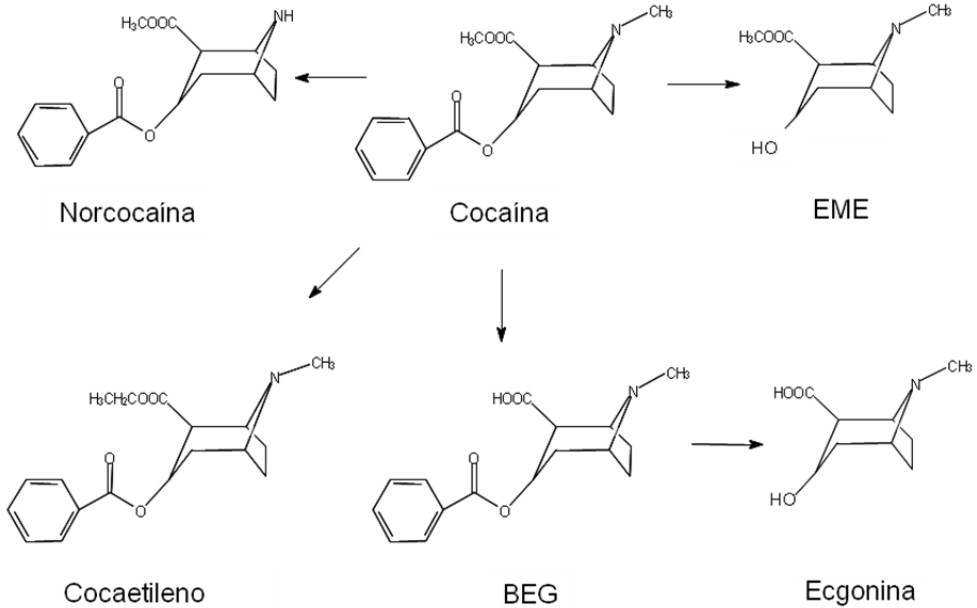


Figura 14. Metabolismo de la Cocaína [13]

Su administración por vía oral y una disminución en la actividad de estos enzimas puede provocar un aumento en los niveles de cocaína y por tanto en su toxicidad. Cone et al [14] encontraron que las concentraciones plasmáticas de benzoilecgonina después del esnifado de cocaína eran un 50% más altas que tras su inhalación o inyección intravenosa.

Aunque la mayoría de las muestras contienen más BEG que EME [15], cambios en la acidez pueden hacer inversa esta relación en sangre postmortem. En sujetos vivos, a partir de EME y BEG se produce ecgonina [16]. Sin embargo, después de la muerte el metabolismo anaerobio continúa, disminuyendo progresivamente el pH del suero, de forma que se interrumpe la conversión de cocaína a BEG y de EME a ecgonina; al mismo tiempo la hidrólisis enzimática continúa a una velocidad más baja y se produce una acumulación de EME, que llega a alcanzar concentraciones más altas que la BEG, pudiendo dar una falsa impresión de la situación antes de la muerte [17].

En presencia de etanol, la cocaína es transesterificada por esterasas hepáticas a etilcocaína o cocaetileno [18, 19] y se incrementa la N-demetilación a norcocaína. El cocaetileno produce toxicidad a nivel cardíaco y hepático, eliminándose más lentamente que la cocaína, por lo que tiende a acumularse en concentraciones cuatro veces mayores que la droga [20]; también se encuentra en cerebro ya que atraviesa la barrera hematoencefálica fácilmente [21]. Distintos estudios sugieren que el cocaetileno contribuye a los efectos psicológicos producidos por la cocaína y a su toxicidad [22, 23].

Dado que la cocaína es una base débil y una molécula pequeña, difunde libremente a través de la placenta; lo mismo sucede con la norcocaína y el cocaetileno [13]. Sin embargo la BEG está altamente ionizada en el rango del pH fisiológico y cruza la placenta con dificultad, por lo que toda la BEG en el feto deriva de la cocaína que éste metaboliza [24].

4.4. EXCRECIÓN

Solamente un 1-5% de la dosis se excreta inalterada en la orina, aunque este porcentaje puede aumentar cuando el pH de la orina se acidifica [20]. Su vida media de eliminación está en torno a 60 minutos [25, 26, 27] y es generalmente detectada después de 8 horas y durante un máximo de 24 horas, mientras que sus metabolitos, benzoilecgonina y ecgonina metil ester, con vidas medias de eliminación mayores, son detectados hasta 96-144 horas después de la última dosis administrada, según la dosis, frecuencia de uso, pH urinario y aclaramiento [28, 29]. Hay pacientes en tratamiento de desintoxicación que continúan excretando metabolitos semanas después de la última dosis [30]. La cocaína también se excreta en la leche materna y puede causar una intoxicación en recién nacidos cuyas madres consumen la droga durante la lactancia [31].

5. MECANISMO DE ACCIÓN

La cocaína se comporta como una amina simpaticomimética de acción indirecta. Es un inhibidor de los procesos de recaptación tipo I, lo que facilita el incremento de la concentración de adrenalina, noradrenalina, dopamina y serotonina en la hendidura sináptica (Figura 15).

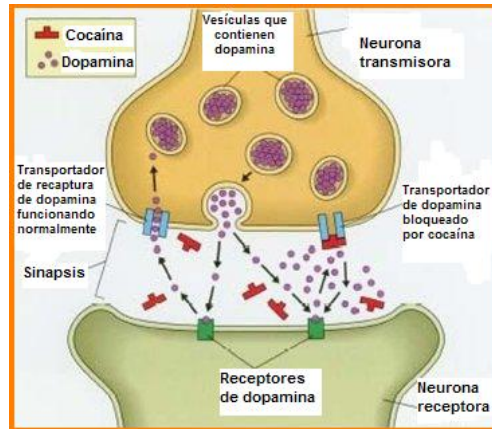


Figura 15. Mecanismo de acción de la cocaína

Este exceso de noradrenalina es el responsable de la mayoría de los efectos farmacológicos y de las complicaciones agudas de la cocaína. Así, la estimulación de los receptores α y β adrenérgicos provoca la contracción del músculo liso en los vasos sanguíneos, aumentando la resistencia periférica y la presión sanguínea. La activación de los receptores β adrenérgicos en el corazón aumenta el ritmo cardíaco y la fuerza de contracción [4]. El incremento de la biodisponibilidad de dopamina es causante de la euforia y parece que está implicada en su mecanismo de adicción. El consumo crónico de cocaína produce cambios en la disponibilidad de la dopamina.

6. TOXICIDAD

El grado de toxicidad depende de la estimulación difusa sobre el sistema nervioso central y periférico. Los órganos diana de su toxicidad son principalmente el cerebro y el corazón [32]. La intoxicación aguda por cocaína se caracteriza por

manifestaciones de hiperactividad noradrenérgica y dopaminérgica fundamentalmente, que afecta a los distintos aparatos y sistemas.

La dosis letal mínima estimada es de 1,2 g, pero personas susceptibles han muerto con dosis tan bajas como 30 mg y personas adictas han tolerado hasta 5 g/día [33].

Las complicaciones clínicas más comunes son:

-*Complicaciones cardíacas*: abarcan un amplio espectro incluyendo hipertensión, taquicardia, hiperpirexia, taquipnea, arritmias, isquemia cerebral e infarto agudo de miocardio; dosis muy elevadas pueden precipitar a la muerte por fibrilación ventricular o hemorragias cerebrales (Figura 16).

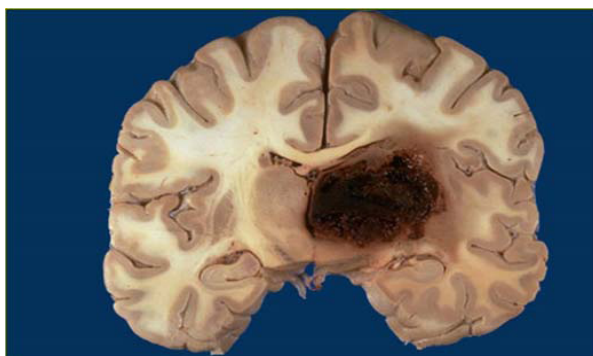


Figura 16. Hemorragia cerebral con afectación de los núcleos basales

Estudios in vitro sugieren que la alteración producida por la cocaína en la disponibilidad del calcio a nivel celular estaría directamente implicada en su toxicidad a nivel de la musculatura cardíaca y vascular [34, 35]. En ocasiones se han detectado miocarditis en pacientes cocainómanos muertos por causas derivadas del abuso de droga y se ha descrito una clara asociación entre uso de cocaína por vía endovenosa y endocarditis [36].

-*Complicaciones neurológicas*: cefalea, ictus cerebral en personas jóvenes [37], hemorragia cerebral y convulsiones [38, 39]. El crack, de nuevo, es el que más se asocia a la mayoría de estos trastornos agudos.

-*Complicaciones psiquiátricas*: se produce ansiedad a medida que desaparecen los efectos euforizantes, confusión, irritabilidad, euforia, alucinaciones visuales y táctiles, alteraciones de la percepción, reacciones paranoides y convulsiones tónico-clónicas.

-*Complicaciones respiratorias*: taquipnea y respiración irregular. El crack fumado es el responsable de la mayoría de las complicaciones agudas que produce la cocaína; tales como el edema agudo de pulmón, exacerbación de cuadros asmáticos, neumotórax y parada respiratoria, que es excepcional y sucede solo tras administración intravenosa.

-*Complicaciones gastrointestinales*: anorexia, náuseas, vómitos, diarreas y úlceras gastro-duodenales con hemorragia y perforación [40].

-*Complicaciones hepáticas*: la relación entre cocaína y hepatopatía es aún poco clara. En estudios con animales se ha demostrado la aparición de inflamación y necrosis periportal. La toxicidad hepática se verá aumentada por un consumo simultáneo de alcohol u otras drogas.

-*Otras complicaciones*: midriasis, vasoconstricción conjuntival y nistagmus vertical. También se producen alteraciones en el equilibrio ácido-base, tanto metabólicas como respiratorias. Los usuarios de la vía parenteral presentan ulceraciones isquémicas de la piel, que tienden a confluir e infectarse.

En general, la toxicidad de la cocaína depende de diversas circunstancias:

- *Policonsumo*: Su uso combinado con el alcohol es muy común y altamente peligroso porque el organismo forma cocaetileno, un metabolito activo que puede aumentar la cardiotoxicidad y la frecuencia de muerte súbita.
- *Adolescencia*: los riesgos y la posibilidad de generar dependencia son mayores cuanto menor es la edad de la persona consumidora.
- *Embarazo*: la cocaína atraviesa la barrera placentaria, por lo que afecta directamente al feto y puede provocar daños en su desarrollo o incluso abortos espontáneos [41].
- *Vulnerabilidad genética*: la rapidez con que se llega a la adicción y su intensidad son distintas en cada persona, dependiendo, entre otras cosas, de factores genéticos.

Algunos autores [42, 43] reconocen tres estilos de consumo: 1) El *consumidor elitista*, que se desenvuelve en el mundo de los negocios, arte, diseño, etc. y hace un uso instrumental de la cocaína; 2) El *consumidor recreativo*, para el cual el

consumo es relativamente periférico en su vida; lo hace por diversión y no lo percibe como peligroso; y 3) El *policonsumidor* que consume cocaína y cuya vida gira en torno a las drogas [44].

Los criterios diagnósticos de la intoxicación aguda por cocaína se especifican en la tabla 3 [45].

Tabla 3. Criterios para el diagnóstico de intoxicación por cocaína (DSM-IV)

- A. Consumo reciente de cocaína
- B. Cambios desadaptativos clínicamente significativos
- C. Dos o más de los siguientes signos que aparecen durante o después del consumo:
 - 1. taquicardia
 - 2. midriasis
 - 3. hiper o hipotensión
 - 4. sudoración o escalofríos
 - 5. náuseas o vómitos
 - 6. pérdida de peso
 - 7. agitación o retardo motriz
 - 8. debilidad muscular, depresión respiratoria, dolor en pecho, arritmias
 - 9. confusión, crisis comiciales, discinesias, distonías o coma
- D. Los síntomas no se deben a enfermedad médica ni a otro trastorno mental

No existe tratamiento farmacológico específico para la intoxicación aguda por cocaína, ya que los síntomas conductuales pueden ser totalmente diferentes a los fisiológicos. Dado que las complicaciones inducidas por cocaína suelen ocurrir en las primeras horas posteriores al consumo, es importante ingresar y monitorizar al paciente. El tratamiento de la intoxicación por cocaína debería incluir: medidas de soporte, lavado gástrico y carbón activado vía oral, monitorización electrocardiográfica y tratamiento sintomático: diacepan si se presentan convulsiones, neurolépticos para los cuadros psicóticos, y sueroterapia para evitar la deshidratación y el fallo renal agudo.

7. TOLERANCIA Y DEPENDENCIA

Hoy en día, la cocaína está incluida en un grupo de drogas con alto potencial de abuso, que se define como la capacidad de un compuesto de producir dependencia

después de un consumo repetitivo [31]. Algunos consumidores son incapaces de controlar el deseo patológico de la droga, instaurando un círculo de atracones de cocaína, interrupción del consumo, síndrome de abstinencia, y reanudación del consumo compulsivo, con efectos perjudiciales para el usuario [46]. Entre los factores que predisponen al consumo problemático destacan las pautas de consumo y la disponibilidad de la sustancia: el cambio de la forma de administración, de vía intranasal a vía pulmonar o intravenosa, condiciona la progresión hacia el abuso de la droga.

La cocaína actúa en el cerebro modificando los circuitos responsables de la gratificación y del placer. Normalmente la dependencia y el abuso de la cocaína van asociados a una tolerancia progresiva, sobre todo a los efectos estimulantes, lo que conduce a un incremento de la dosis. Con el consumo continuado, hay una disminución progresiva de los efectos placenteros y un aumento de efectos disfóricos; se trata de un cuadro ante todo psicológico con una sintomatología que reúne las condiciones fijadas por la Asociación Americana de Psiquiatría para ser considerada como síndrome de abstinencia. Es un síndrome benigno, que sigue un modelo de tres fases [47].

1. *Crash* o fase de bajada: dura de 9 horas a 5 días y predomina la depresión, anorexia, irritabilidad, insomnio y deseo de consumo, seguidos de agotamiento y somnolencia, que se interrumpen por períodos de hiperfagia.
2. Abstinencia: dura de 1 a 10 semanas y comienza con una normalización del ritmo del sueño y del estado de ánimo, seguida de hiperactividad y un fuerte deseo de volver a experimentar la euforia inicial.
3. Extinción: durante meses, el deseo se repite episódicamente según estímulos condicionados y disminuye gradualmente siempre que se mantenga la abstinencia.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Luna A, Osuna E. *Drogas de abuso*. En: Villanueva E (Ed) Medicina Legal y Toxicología. 6ª Edición. Masson. Barcelona (2004) 1014-1034.

- [2] Wootton J, Miller SI. Cocaine: A review. *Pediatrics* 15 (3) (1994) 89-92.
- [3] Leikin J, Paloucek F. *Poisoning and Toxicology Handbook*. Nueva York, CRC Press (2008) 213.
- [4]. Drummer OH, Odell M. *The forensic pharmacology of drugs of abuse*. Arnold. London, 2001.
- [5] Ellenhorn MJ. *Ellenhorn's Medical Toxicology: diagnosis and treatment of human poisoning*. Williams&Wilkins. Baltimore (1997) 356-386.
- [6] Hernández A, Andollo W, Hearn L. Analysis of cocaine and metabolites in brain using solid phase extraction and full-scanning gas chromatography / ion trap mass spectrometry. *Forensic Sci Int* 65 (1994) 149-156.
- [7] Evans SM, Cone EJ, Henningfield JE. Arterial and venous cocaine plasma concentrations in humans: relationship to route of administration, cardiovascular effects and subjective effects. *J Pharmacol Exp Ther* 279(3) (1996) 1345-1356.
- [8] Calligaro D, Eldefrawi M. Central and peripheral cocaine receptors. *J Pharm Exp Ther* 243(1) (1987) 61-68.
- [9] Jones L, Tackett R. Differential routes of cocaine administration indicate a peripheral cardiotoxic action. *Pharmacol Biochem Behav* 38 (1992) 601-603.
- [10] Volkow ND, Fowler JS, Wolf AP, Wang GJ, Logan J, MacGregor R, Dewey SL, Schlyer D, Hitzemann R. Distribution and kinetics of carbon-11-cocaine in the human body measured with PET. *J Nucl Med* 33 (1992) 521-525.
- [11] Sukbuntherng J, Walters A, Chow HH, Mayerson M. Quantitative determination of cocaine, cocaethylene (ethylcocaine), and metabolites in plasma and urine by high performance liquid chromatography. *J Pharm Sci*, 84(7) (1995) 799-804.

- [12] Schuster L, Casey E, Welankiwar S. Metabolism of cocaine and norcocaine to N-hydroxynorcocaine. *Biochem Pharmacol* 32 (1983) 3045-3051.
- [13] Shenker S, Yang Y, Johnson RF, Downing JW, Schenken RS, Henderson GI, King TS. The transfer of cocaine and metabolites across the term human placenta. *Clin Pharmacol Ther* 53 (1993) 329-339.
- [14] Cone EJ, Hillsgrove M, Darwin WD. Simultaneous measurement of cocaine, cocaethylene, their metabolites and crack pyrolysis products by gas chromatography-mass spectrometry. *Clin Chem* 40(7) (1994) 1299-1305.
- [15] Howell S, Ezell A. An example of cocaine tolerance in a gunshot wound fatality. *J Anal Toxicol* 14 (1990) 60-61.
- [16] Hornsbeck CL, Barton KM, Czarny RJ. Urine concentrations of ecgonine from specimens with low benzoylecgonine levels using a new ecgonine assay. *J Anal Toxicol* 19 (1995) 133-136.
- [17] Logan BK, Peterson KL. The origin of significance of ecgonine methyl ester in blood samples. *J Anal Toxicol* 18 (1994) 124-125.
- [18] De la Torre R, Farré M, Ortuño J, Camí J, Segura J. The relevance of urinary cocaethylene as a metabolite of cocaine under the simultaneous administration of alcohol. *J Anal Toxicol* 15 (1991) 223.
- [19] Jatlow P, Elsworth JD, Bradberry C, Winger G, Taylor JR, Russell R, Roth RH. Cocaethylene: a neuropharmacologically active metabolite associated with concurrent cocaine-ethanol ingestion. *Life Sci.* 48(18) (1991) 1787-1794.
- [20] Quinn DI, Wodak A, Day RO. Pharmacokinetic and pharmacodynamic principles of illicit drug use and treatment of illicit drug users. *Clin Pharmacokinet* 33 (1997) 344-400.

[21] Hearn WL, Rose S, Wagner J, Ciarleglio A, Mash DC. Cocaethylene is more potent than cocaine in mediating lethality. *Pharmacol Biochem Behav* 39 (1991) 531-533.

[22] Foltin RW, Fischman MW. Ethanol and cocaine interactions in humans: cardiovascular consequences. *Pharmacol Biochem Behav* 31(4) (1989) 877-883.

[23] Woodward J, Mansbach R, Carrol F, Balster R. Cocaethylene inhibits dopamine uptake and produces cocaine-like actions in drug discrimination studies. *Eur J Pharm* 197(2-3) (1991) 235-236.

[24] Meeker JE, Reynolds PC. Fetal and newborn death associated with maternal cocaine use. *J Anal Toxicol* 14(6) (1990) 379-382.

[25] Chow NJ, Ambre JJ, Ruo TI, Atkinson AJ, Bowsher DJ, Fischmann MW. Kinetics of cocaine distribution, elimination and chronotropic effects. *Clin Pharmacol Ther* 38 (1985) 318-324.

[26] Jatlow P. Drug abuse profile: cocaine. *Clin Chem* 33 (11B) (1987) 66B-71B.

[27] Kumor K, Sherer M, Thompson L, Cone E, Mahaffey J, Jaffe JH. Lack of cardiovascular tolerance during intravenous cocaine infusions in human volunteers. *Life Sci* 42 (1988) 2063-2071.

[28] Hamilton HE, Wallace JE, Shimek EL, Pam L, Harris SC, Chirstenson JG. Cocaine and Benzoylcegonine Excretion in Humans. *J Forensic Sci* 22 (1977) 697-707.

[29] Ambre JJ, Ruo IT, Nelson J, Belknap S. Urinary excretion of cocaine, benzoylcegonine and ecgonine methyl ester in humans. *J Anal Toxicol* 12 (1988) 301-306.

[30] Burke WM, Ravi NV, Dhopes V, Vandegrift B, Maany I. Prolonged presence of metabolite in urine after compulsive cocaine use. *J Clin Psychiatr* 51 (1990) 145-148.

[31] Chasnoff IJ, Lewis DE, Squires L. Cocaine intoxication in a breast fed infant. *Pediatrics* 80 (1987) 836-838.

[32] Lobl JK, Carbone LD. Emergency management of cocaine intoxication. Counteracting the effects of today's "favorite drug". *Postgrad Med*. 91(1) (1992) 161-166.

[33] Moffat AC, Osselton MD, Widdop B. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material. Pharmaceutical Press, London, 2004.

[34] Wang JF, Ren X, DeAngelis J, Min J, Zhang Y, Hampton TG, Amende I, Morgan JP. Differential patterns of cocaine-induced organ toxicity in murine heart versus liver. *Exp Biol Med* 226(1) (2001) 52-60.

[35] Mouhaffel AH, Mouhaffel AH, Madu EC, Satmary WA, Fraker TD Jr. Cardiovascular complications of cocaine. *Chest*. 107(5) (1995) 1426-34.

[36] Rezkalla SH, Hale S, Kloner RA. Cocaine-induced heart disease. *Am Heart J* 120 (1990) 1403-1408.

[37] Blanco M, Diez-Tejedor E, Vivancos F, Barreiro P. Cocaine and cerebrovascular disease in young adults. *Rev Neurol* 29(9) (1999) 796-800.

[38] Dhuna A, Pascual-Leone A, Langendorf F. Chronic habitual cocaine abuse and kindling-induced epilepsy: a case report. *Epilepsia* 32(6) (1991) 890-894.

[39] Gasior M, Ungard JT, Witkin JM. Preclinical evaluation of newly approved and potential antiepileptic drugs against cocaine-induced seizures. *J Pharmacol Exp Ther* 290(3) (1999) 1148-56.

[40] Muniz AE, Evans T. Acute gastrointestinal manifestations associated with use of crack. *Am J Emerg Med.* 19(1) (2001) 61-3.

[41] Esmer MC, Rodriguez-Soto G, Carrasco-Daza D, Iracheta ML, Del Castillo V. Cloverleaf skull and multiple congenital anomalies in a girl exposed to cocaine in utero: case report and review of the literature. *Childs Nerv Syst* 16(3) (2000) 176-179.

[42] Green A, Pickering H, Foster R, Power R, Stimson GV. Who uses cocaine? Social profiles of cocaine users. *Addiction Research* 2(1) (1994) 141-154.

[43] Ditton J, Hammersley R. The typical cocaine user. *Druglink* 9(6) (1994) 11-14.

[44] Díaz A, Barruti M, Doncel C. Les línies de l'èxit? Estudi sobre la naturalesa i l'extensió del consum de cocaïna a Barcelona. Ajuntament de Barcelona, 1992.

[45] DSM-IV: Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales© Masson S.A., Barcelona, 1995.

[46] Washton AM. La adicción a la cocaína. Tratamiento, recuperación y prevención. Ed. Paidós. Barcelona, 1995.

[47] Gawin FH, Kleber HD. Abstinence symptomatology and psychiatric diagnosis in cocaine abusers: clinical observations. *Arch Gen Psychiatry* 43(2) (1986) 107-113.

Capítulo

3

Opiáceos

CAPÍTULO 3. OPIÁCEOS

1. Aspectos generales
2. Formas de abuso y patrones de consumo
3. Estructura química y propiedades
4. Farmacocinética
 - 4.1. Absorción
 - 4.2. Distribución
 - 4.3. Metabolismo
 - 4.4. Excreción
5. Mecanismo de acción
6. Toxicidad
7. Tolerancia y Dependencia
8. Referencias bibliográficas

1. ASPECTOS GENERALES

El opio se extrae de las cápsulas verdes de la adormidera (*Papaver somniferum*), realizando incisiones superficiales que exudan un látex blanco y lechoso (Figuras 17 y 18). Al secarse se convierte en una resina pegajosa marrón que contiene más de 20 alcaloides activos, incluyendo opiáceos naturales como la morfina (9-17%), codeína (0,5-4%) y noscapina (0,5-4%), además de papaverina y tebaína en menores proporciones [1, 2, 3].



Figura 17. Cápsula de adormidera

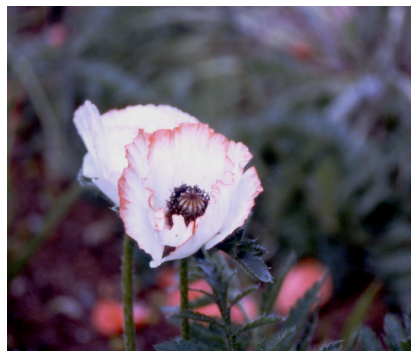


Figura 18. *Papaver somniferum*

El conocimiento de los efectos del opio y su uso con fines médicos data de tiempos prehistóricos, donde muchos jeroglíficos mencionan el jugo que se extraía de estas cabezas y lo recomiendan como analgésico y calmante, aunque las referencias más claras tienen lugar a partir de los siglos III y IV, ya que el opio aparece incluido en todas las farmacopeas. Hipócrates (460-376 a.C.) se refiere a sus propiedades analgésicas con la frase *Divinum opus est sedare dolorem*. Durante muchos años se utilizó como medicamento la tintura de opio o láudano elaborada por Sydenham (1660). El hito más importante tuvo lugar cuando Sertürner (1803) aisló la sustancia a la que denominó *morphium* (en referencia a Morfeo, dios griego del sueño). A partir de entonces, la morfina fue recomendada como analgésico, pero su uso fue ampliado con el descubrimiento de la jeringa hipodérmica, apareciendo una variedad más grave de adicción opiácea. En 1874, Wright sintetiza la heroína buscando un fármaco con la potencia analgésica de la morfina, pero sin su capacidad adictiva, aunque pronto se comprobó que sus efectos negativos eran superiores a los de la

morfina y la mayoría de los países occidentales suspendió su uso médico. En 1920 se prohíbe en USA la importación, producción y venta de heroína y poco después lo adoptó la Sociedad de Naciones, prohibiéndola en la mayoría de los países. En 2003, los principales productores de opio ilegal eran Afganistán, Myanmar (Birmania) y Laos, seguidos de Méjico, Colombia, Tailandia y Pakistan [4, 5, 6, 7].

2. FORMAS DE ABUSO Y PATRONES DE CONSUMO

La heroína rara vez se consume pura, lo normal es la administración de preparaciones ilícitas (“papelinas”), con una pureza variable del 10 al 20%, excipientes (lactosa, borax, azúcar, almidón, etc.) y adulterantes, incluyendo fármacos como la quinina, estriquina, cafeína, paracetamol, barbitúricos, procaína, piracetam y otros [8, 9].



Figura 19. Heroína en sus distintas formas: marrón, blanca, papelinas

Las formas de abuso son diferentes según los distintos opiáceos, y dentro de tres patrones básicos [10]:

- En el contexto de un tratamiento médico, obteniendo la droga por canales legales. Es el menos frecuente en la actualidad.
- Utilización experimental o recreativa que deriva hacia un uso más intensivo por vía parenteral; se da entre adolescentes y adultos jóvenes introducidos en la droga por otros consumidores.
- Consumidores de opiáceos por vía oral: metadona, obtenida en programas de tratamiento de deshabitación a la heroína.

Las formas de abuso más frecuentes son la administración de heroína fumada, inhalada, intravenosa y la administración de metadona, codeína y/o buprenorfina por vía oral. En la actualidad, los heroinómanos pueden combinar esta droga con otras sustancias psicoactivas como cocaína o alcohol, que pueden contribuir a la morbilidad y mortalidad [11, 12].

3. ESTRUCTURA QUÍMICA Y PROPIEDADES

El representante principal de los opiáceos es la morfina, alcaloide derivado del fenantreno o de la 4-fenilpiperidina. Los distintos derivados presentan cambios químicos en su molécula como la esterificación de un grupo hidroxilo (codeína, 6-acetilmorfina) o la esterificación de ambos grupos hidroxilo (heroína). Esta relación estructural entre los distintos derivados opioides se observa en la figura 20.

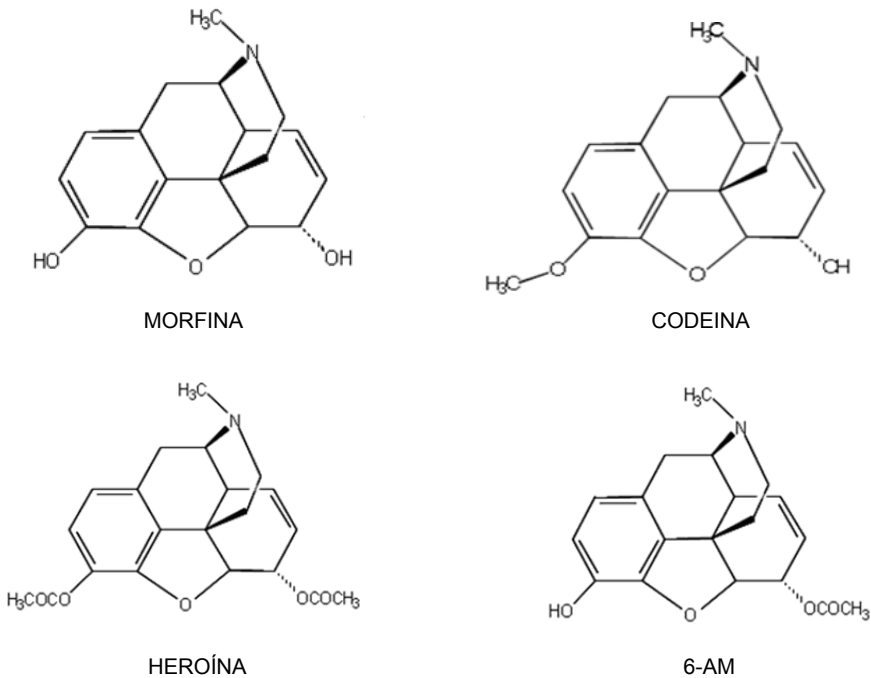


Figura 20. Estructura química de Morfina, Codeína, Heroína y 6AM

Las modificaciones de la molécula, principalmente del grupo 3-hidroxilo son muy importantes en su mecanismo de acción. Así, la esterificación de dicho grupo reduce su capacidad analgésica. Cuando se acetilan los dos grupos hidroxilo se obtiene la heroína, cuya elevada lipofilia incrementa su entrada en el sistema nervioso central [13]. Los opiáceos son sólidos blancos de sabor amargo, de carácter básico (pKa próximo a 8), lipófilos, con pesos moleculares alrededor de 300 g/mol, porcentajes bajos de unión a proteínas (35% para la morfina, 7% para la codeína y 40% para la heroína) y un elevado volumen de distribución (3-4 L/kg para la morfina y 25 L/kg para la heroína)

La molécula de metadona presenta un único átomo quiral de carbono (C₆), lo que la hace poseer un par de estereoisómeros, siendo la l-metadona la principal responsable de las actividades opioides en el hombre [14].

Su fórmula estructural no presenta relación directa con la morfina, pero asume una configuración similar debido a factores estéricos (Figura 21). Así, la metadona simula el anillo piperidínico presente también en la morfina [15,16]. Es una sustancia que en estado natural tiene un sabor amargo, de carácter básico (pka: 8,3) con un peso molecular de 300 g/mol, elevada fijación a proteínas plasmáticas (60-90%) y alto volumen de distribución (4 L/Kg).

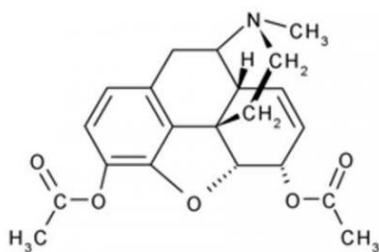


Figura 21. Estructura química de la Metadona

4. FARMACOCINÉTICA

4.1. ABSORCIÓN

Los opiáceos se absorben con facilidad por vía oral, aunque tanto la biodisponibilidad como los efectos farmacológicos varían considerablemente entre los distintos opiáceos, dependiendo del metabolismo de primer paso hepático. La morfina sólo alcanza una biodisponibilidad de un 22-24% [17] y el pico de concentración plasmática se suele alcanzar en la hora siguiente de la administración oral [18,19]. Por el contrario, la codeína y metadona tienen una biodisponibilidad del 60% y 80%, respectivamente [20,21]. La metadona se puede detectar en plasma después de 30 minutos, alcanzando concentraciones máximas a las 2-4 horas postconsumo.

Otras vías de administración son: la vía parenteral (intravenosa, subcutánea e intramuscular), pulmonar (fumada) e intranasal (esnifada). La absorción de morfina tanto por vía subcutánea como intramuscular es buena, con un período de latencia de unos 30 minutos; el efecto máximo se alcanza al cabo de 1 hora, persistiendo durante 3-5 horas [22].

Actualmente la heroína se suele administrar por vía pulmonar, alcanzando una biodisponibilidad entre el 4-90% dependiendo si su administración es inhalada (40-50%) ó fumada (90%) y el pico de efecto máximo se alcanza entre 2-15 min [23].

La administración preferente de la codeína es la oral. La potencia por vía parenteral es 10 veces menor que la de la morfina. Sin embargo, por vía oral tiene el 60% de la eficacia de la vía parenteral, a diferencia de la morfina.

4.2. DISTRIBUCIÓN

La morfina se distribuye rápidamente en el organismo. Su unión a proteínas plasmáticas es de un 20-40% [17], fijándose selectivamente en varios núcleos del SNC. La heroína, con sus dos grupos acetilo, es considerablemente menos hidrófila que la morfina y pasa con mayor rapidez la barrera hematoencefálica. Aunque la heroína se biotransforma totalmente al cabo de veinte minutos en morfina, alcanza el cerebro más rápidamente que la morfina. La heroína y la 6AM tienen una mayor

liposolubilidad que la morfina, por lo que si se administra la heroína por vía parenteral puede llegar antes al cerebro y alcanzar allí mayores concentraciones de morfina [1, 24].

La metadona también es lipófila y está muy unida a proteínas plasmáticas (90%) [25] y tisulares, de forma que alcanza en el plasma una concentración de equilibrio que prolonga sus efectos en los pacientes que reciben una dosis diaria de mantenimiento. Las concentraciones encefálicas máximas aparecen 1-2 horas después de una dosis subcutánea o intramuscular, observándose una buena correlación entre intensidad y duración de los efectos analgésicos.

4.3. METABOLISMO

La morfina se conjuga a dos derivados glucurónidos, uno mayoritario que es la morfina 3-glucurónido (M3G) y un 10% en morfina 6-glucurónido (M6G) (Figura 22). La M6G tiene una semivida de eliminación más prolongada que la morfina (4 horas frente a 2 horas) y posee una acción analgésica mayor que la de la morfina. Por ello, contribuye de manera sustancial a su toxicidad [17,26].

La heroína se desacetila por esterasas plasmáticas y hepáticas en 6AM, y después en morfina [27]. Si se administra por vía oral, no se detectan heroína ni 6AM en plasma, sólo aparece la morfina y sus metabolitos [28,29].

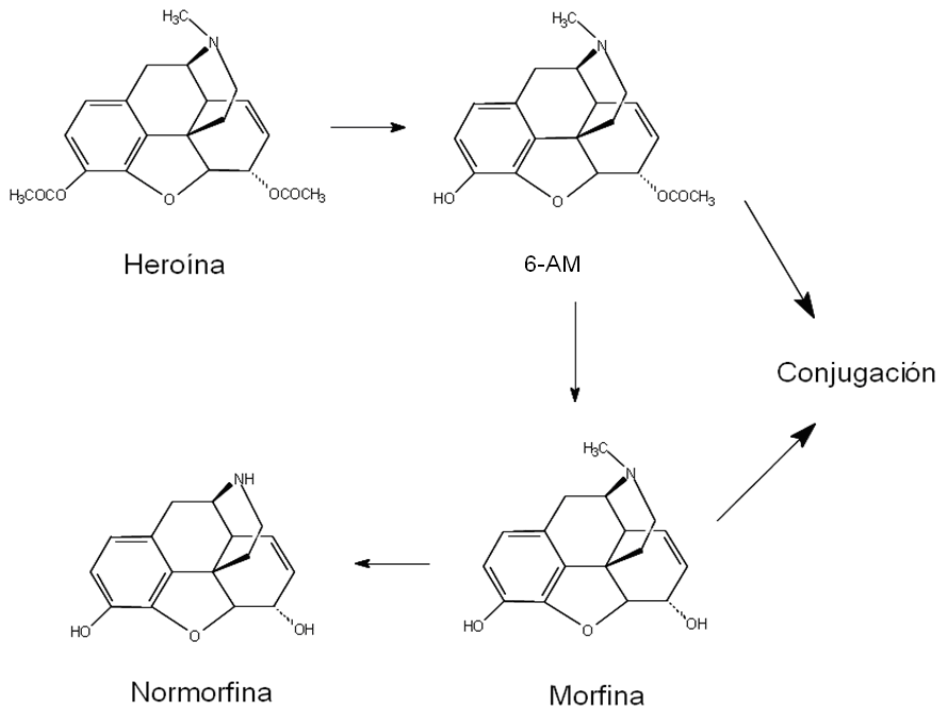


Figura 22. Metabolismo de Heroína y Morfina

La codeína solo es eficaz tras su metabolismo. Aproximadamente el 10% de la codeína absorbida se desmetila a morfina (Figura 23), lo que justifica la mayor parte de su actividad farmacológica [30].

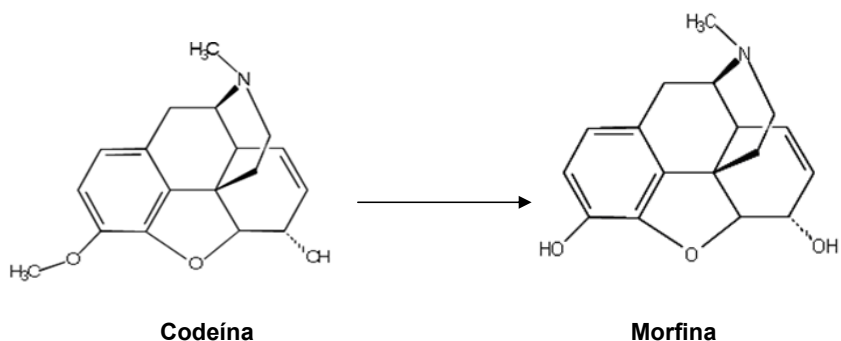


Figura 23. Metabolismo de la Codeína

La metadona es metabolizada, mediante la actuación de enzimas microsomales hepáticas, por N-demetilación seguida de ciclación. Se convierte en su metabolito más importante, 2-etilen-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina o EDDP y minoritariamente a 2-etil-5-metil-3,3-difenilpirrolidina o EMDP (Figura 24). Ambos compuestos no poseen actividad farmacológica y sus niveles plasmáticos son poco significativos durante la terapia [31, 32].

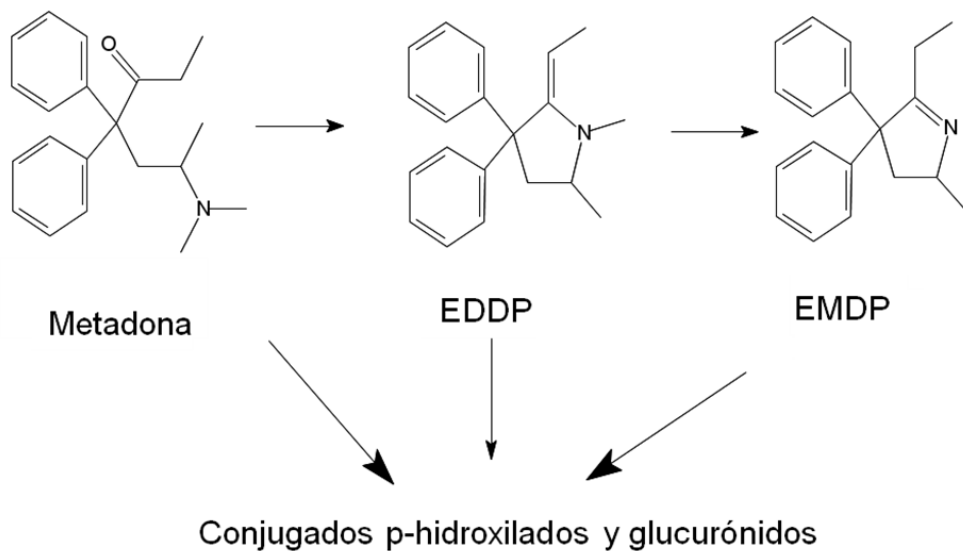


Figura 24. Metabolismo de la Metadona

4.4. EXCRECIÓN

La excreción es fundamentalmente renal (90%) y el resto biliar. La morfina se excreta por filtración glomerular en su mayor parte, principalmente como derivado conjugado y sufre circulación enterohepática, eliminándose por heces un 5-10% en forma conjugada [33].

La conversión de heroína a morfina es tan rápida que la detección de heroína en sangre u orina es muy difícil, de forma que un 70% de la dosis excretada por vía renal se elimina en forma de glucurónidos con pequeñas cantidades de 6AM (1%). Las vidas medias de heroína y 6AM son de 3 y 40 minutos, respectivamente. Un 45% de una dosis intravenosa de heroína se recupera como metabolitos en la orina en un periodo aproximado de 40 horas. En el caso de la codeína, un 95% de la dosis se excreta en las primeras 48 horas.

La cantidad de metadona excretada por la orina es pH dependiente: aumenta cuando esta es acidificada ya que es una base débil y puede llegar hasta un 34%. Diferentes estudios han mostrado que transformando un pH muy ácido en un pH muy alcalino la vida media de la metadona puede pasar de 18 horas a 40 horas. Metadona y EDDP son los principales productos excretados en la orina de las primeras 24 horas, representando un 5% de la dosis administrada.

5. MECANISMO DE ACCIÓN

Los términos opiáceo y opioide se suelen utilizar de forma indistinta, pero desde el punto de vista farmacológico, opiáceo se refiere a los productos derivados del opio (morfina, codeína, tebaína, papaverina, etc.), mientras que la terminología opioide se utiliza para designar aquellas sustancias endógenas o exógenas, con afinidad por receptores opioides, que tienen un efecto análogo al de la morfina (heroína, metadona, buprenorfina) [22].

Los opiáceos producen sus acciones biológicas a través de la fijación reversible y selectiva a unos receptores de membrana que se encuentran localizados fundamentalmente en el sistema nervioso (receptores opioides): mu (μ), delta (δ), kappa (κ) y épsilon (ϵ) [34, 35, 36, 37, 38]. Los opioides preferidos por los adictos y

con un mayor efecto analgésico son los que actúan particularmente sobre los receptores μ [39, 40].

La activación de las proteínas G produce una inhibición de la adenilciclasa con reducción del AMPcíclico, apertura de canales de potasio y cierre de canales de calcio (Figura 25). Como resultado surgen dos acciones directas sobre las neuronas: se reduce la liberación de neurotransmisores y se dificulta la liberación del neurotransmisor presináptico [41, 42].



Figura 25. Mecanismo de acción de los opiáceos

Los opioides pueden actuar como agonistas, agonistas parciales o antagonistas en uno o varios de los receptores opioides. Los agonistas son aquellos que tienen afinidad para unirse a sus receptores, desencadenando unas reacciones que llevan a un efecto (actividad intrínseca). Los antagonistas sólo presentan afinidad, pero carecen de actividad intrínseca [43, 44].

Según estas posibilidades, los opiáceos se dividen en:

-Agonistas puros: se comportan preferentemente como agonistas selectivos sobre los receptores μ , mostrando la máxima actividad intrínseca. Pertenecen a este grupo: morfina, heroína, metadona, petidina, fentanilo y sus derivados

-Agonistas-antagonistas mixtos: actúan sobre más de un tipo de receptor, concretamente el μ y el κ . Actúan como agonistas en un receptor (κ) y

como agonistas parciales o incluso antagonistas en otro (μ). Son la pentazocina, el butorfanol o la nalorfina. En sujetos dependientes de opioides agonistas (heroína) provocan síndrome de abstinencia.

-Agonistas parciales: actúan sobre receptores μ con actividad intrínseca inferior a la de los agonistas puros. Son analgésicos cuando se administran solos, pero en presencia de un agonista puro se comportan como antagonistas. El fármaco más característico es la buprenorfina.

-Antagonistas puros: son afines a los tres tipos de receptores principales, si bien lo son más por los receptores μ . Revierten la acción de los agonistas y carecen de efectos analgésicos. Son la naloxona, naltrexona y diprenorfina.

6. TOXICIDAD

La intoxicación por opioides presenta una tríada clásica de signos: alteración del nivel de conciencia, miosis intensa y depresión respiratoria. También puede darse bradicardia, hipotensión, náuseas, vómitos, cambios en la motilidad intestinal, hipo e hipertermia. La presencia de cianosis es un signo tardío y grave de sobredosis. Las complicaciones de la sobredosis son el edema agudo de pulmón no cardiogénico (Figura 26), convulsiones, rabdomiolisis, arritmias e infecciones (neumonía, endocarditis). El uso concomitante con otras drogas de abuso puede provocar síntomas distintos y de mayor gravedad.



Figura 26. Edema pulmonar no cardiogénico

La sintomatología de la intoxicación por heroína es similar a la que produce cualquier otro opiáceo pero de una forma más rápida y con mayores efectos a nivel del SNC, que desaparecen progresivamente a partir de las dos horas. Produce náuseas, vómitos, sensación de tranquilidad y placer, falta de apetito, miosis, bradipnea y vasodilatación periférica. A dosis altas, somnolencia, coma, edema pulmonar, convulsiones, delirio, y apnea [45]. El pronóstico de la intoxicación por heroína es malo, con baja tasa de deshabitación y alta mortalidad a corto plazo. Su dosis letal mínima es 200 mg. En la mayoría de los casos fatales se han detectado 6AM, y morfina libre ó conjugada, indicando las dos últimas el tiempo transcurrido desde la inyección de heroína [46].

La intoxicación por metadona puede presentarse en dos niveles [47]:

-*Intoxicación leve a moderada*: caracterizada por miosis, letargia, disminución de la presión arterial, del ritmo intestinal y respiratorio;

-*Intoxicación grave*: cursa con coma asociado a depresión respiratoria severa y edema agudo pulmonar no cardiogénico.

La causa de la muerte está mediada por tres efectos: patología respiratoria, problemas cardiacos [48, 49, 50, 51, 52, 53] y fracaso renal. No se puede predecir cual es la dosis mortal de metadona [14], puesto que la droga se redistribuye antes y después de la muerte y suele consumirse junto con otras drogas [54, 55, 56, 57]. Se considera que, en sujetos no habituados, la dosis letal es de 50 mg en adultos y de 10 mg en niños.

Las intoxicaciones por codeína son bastante raras en nuestro ámbito ya que la depresión del SNC es mucho menor y no ocasiona dependencia. Se puede establecer la dosis letal de codeína en 0,5–1 g.

Los criterios diagnósticos de intoxicación por opiáceos aparecen en la tabla 4 [58]

Tabla 4. Criterios diagnósticos de intoxicación por opiáceos (DSM-IV)

A. Consumo reciente de un opiáceo
B. Cambios psicológicos o comportamentales desadaptativos, clínicamente significativos, que aparecen durante o poco tiempo después del consumo: euforia inicial seguida de apatía, disforia, agitación o inhibición psicomotoras, alteración de la capacidad del juicio, deterioro social o laboral
C. Miosis (o midriasis por anoxia en la intoxicación grave) y uno o más de los siguientes signos, que aparecen durante o poco tiempo después del consumo: <ul style="list-style-type: none"> (1) somnolencia o coma (2) lenguaje farfullante (3) deterioro de la atención o de la memoria
D. Los síntomas no se deben a una enfermedad médica ni se explican mejor por la presencia de otro trastorno mental

El tratamiento se basa en el manejo de la vía aérea, soporte circulatorio y empleo del antídoto naloxona [24]. La naloxona se administra preferentemente por vía intravenosa (o subcutánea) a dosis iniciales de 0,4-0,8 mg y se observa la evolución durante unos 2-3 minutos; si no provoca respuesta, se administran nuevas dosis hasta alcanzar un máximo de 10 mg. En casos muy graves puede iniciarse el tratamiento con dosis de 2 mg. En las intoxicaciones por vía oral, puede realizarse un lavado gástrico y administrar carbón activado junto a un catártico. En intoxicaciones por metadona, los efectos depresores pueden durar hasta dos o tres días, por lo que se debe evitar la suspensión prematura del tratamiento con naloxona.

7. TOLERANCIA Y DEPENDENCIA

La adicción a opiáceos en humanos es un proceso crónico caracterizado por el desarrollo de tolerancia y dependencia (física y psíquica) y una sensibilización que induce vulnerabilidad frente a las recaídas. En general, los opiáceos desarrollan tolerancia con relativa rapidez para los efectos depresores como analgesia, sedación e hipotensión, y mucho menos para la miosis y la actividad gastrointestinal. El desarrollo de la adicción a opiáceos implica una serie de cambios adaptativos en los

receptores opioides del cerebro, lo que induce una alteración de diversos sistemas neuroquímicos en regiones específicas del cerebro [59, 60, 61, 62, 63, 64, 65].

Las primeras experiencias con opioides pueden ser desagradables por la presencia de náuseas y vómitos, pero con rapidez se desarrolla tolerancia a la sensación emética, dando paso a la euforia. La inyección intravenosa produce efectos muy placenteros, seguidos de euforia lo que propicia la aparición de dependencia y rápidamente un fenómeno de tolerancia. Con el tiempo, los períodos entre las sucesivas administraciones cursan con una sintomatología cada vez más intensa, que explica la administración de una nueva dosis.

El *síndrome de abstinencia*, generado por la supresión brusca de la droga, se caracteriza por un conjunto de signos y síntomas: ansiedad, irritabilidad, calambres musculares, deseo intenso de consumir la droga, disforia, náuseas o vómitos, midriasis, escalofríos, fiebre, embotamiento mental e hiperactividad motora. Es un síndrome que se percibe como insufrible por muchos heroinómanos pero no reviste gravedad y puede superarse sin riesgo vital. Los primeros síntomas suelen aparecer entre las 8-12 horas de la última dosis; el máximo se alcanza entre las 36-72 horas y la duración es de 7 a 10 días. En el tratamiento del síndrome de abstinencia se suele utilizar la metadona, un agonista de receptores μ , de vida media larga, que se administra por vía oral. Disminuyen los deseos de consumir, los efectos de la inyección de heroína y permite el restablecimiento de los ritmos neuroendocrinos, así como el desarrollo de una actividad laboral o social normal. El tratamiento es complejo por su duración y exige un control adecuado de la dosis para evitar la aparición de dependencia. Su uso clínico se regula a través de los llamados programas de mantenimiento con metadona (PMM) [24].

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Gutstein HB, Akil H. Opioid Analgesics. En: Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG, editors. Goodman and Gilman's. The pharmacological basis of therapeutics. 10th ed. New York: Mc Graw-Hill (2001) 569-619

[2] Drug Enforcement Administration. Opium and heroin cultivation in Southeast Asia. Recuperado de www.usdoj.gov/dea/pubs/intel/20026/20026.html

[3] Goodman-Gilman, A, Rall, TW, Nies, AS, Taylor, P. (Eds.) Las bases farmacológicas de la terapéutica. Atlanta: Mc Graw-Hill Interamericana Press, 1996.

[4] De la Fuente I, Saavedra P, Barrio G, Royuela L, Vicente J. Temporal and geographic variations in the characteristics of heroin seized in Spain and their relation with the route of administration. Spanish Group for the Study of the Purity of Seized Drugs. Drug Alcohol Depend 40 (1996) 185-94.

[5] De la Fuente L, Barrio G, Bravo MJ, Royuela L. Heroin smoking by “chasing the dragon”: its evolution in Spain. Addiction 93 (1998) 444-446.

[6] Camí J. Drogas de diseño: ¿ Un nuevo reto?. En: Laporte JR, ed. Avances en Terapéutica 16. Barcelona: Eds. Científico Técnicas Masson-Salvat (1992) 211-223.

[7] United Nations. Office of drug and crime. World Drug Report. Vienna: United Nations Publications, 2004

[8] Domínguez E, Infante F, Luna, A. Microcontamination of illicit samples of heroin and cocaines as indicador of adulteration. J Forensic Sci 36 (1991) 844-856.

[9] Kaa E. Impurities, adulterants and diluents of illicit heroin. Changes during a 12 - year period. Forensic Sci Int 64 (1994) 171-179.

[10] Lorenzo P, Ladero JM, Leza JC, Lizasoain, I. Drogodependencias: Farmacología. Patología. Psicología. Legislación. Ed Méd. Panamericana, 1999.

[11] Ruttenber AJ, Kalter HD, Santinga P The role of ethanol abuse in the etiology of heroin-related death. J Forensic Sci. 35(4) (1990) 891-900.

[12] Warner-Smith M, Darke S, Lynskey M, Hall W. Heroin overdose: causes and consequences. Addiction 96(8) (2001) 1113-25.

- [13] Gómez R. Aislamiento de la morfina: 200 años de un descubrimiento fundamental para la química moderna. *An Quím* 102(2) (2006) 45-53.
- [14] Karch SB. *Pathology of drug abuse*. 4th edition. CRC Press, 2009.
- [15] Rang HP, Dale MM. *Pharmacology* 4th edition, 1999.
- [16] Ellenhorn MJ. *Ellenhorn's Medical Toxicology: diagnosis and treatment of human poisoning*. Williams &Wilkins. Baltimore (1997) 356-386.
- [17] Glare PA, Walsh TD: Clinical pharmacokinetics of morphine. *The Drug Monit* 13 (1991) 1- 23.
- [18] Hoshn PI, Hanks GW, Aherne GW, Chapman D, Linleton P, Filshie I. The bioavailability and pharmacokinetics of morphine after intravenous, oral and bucal administration in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol* 27 (1989) 499-505.
- [19] Leikin J, Paloucek F. *Poisoning and Toxicology Handbook*. Nueva York, CRC Press (2008) 213.
- [20] Reisine T, Pasternak G: Opioid analgesics and antagonists. In Hardman JG, Limbird LE (eds): *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basics of Therapeutics*, 9th ed. New York, Mc Graw-Hill (1996) 521-555.
- [21] Chan y Matzke, 1987 Chan GL, Matzke GR. Effects of renal insufficiency on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of opioid analgesics. *Drug Intell Clin Pharm.* 21(10) (1987) 773-83.
- [22] Seidenberg A, Honegger U. *Metadona, Heroína y otros opioides*. Ediciones Díaz de Santos, S.A., 2000.

- [23] Rook EJ, Huitema AD, van den Brink W, van Ree JM, Beijnen JH. Pharmacokinetics and pharmacokinetics variability of heroin and its metabolites: review of the literature. *Curr Clin Pharmacol* 1(1) (2006) 109-118.
- [24] Flórez J. Fármacos analgésicos opioides. En: Flórez J, Armijo JA, Mediavilla A *Farmacología humana*. 4ª ed. Barcelona: Masson (2003) 461-478.
- [25] Gourlay GK: Sustained relief of chronic pain. *Clin Pharmacokinet* 35 (1998) 173 - 190.
- [26] Osborne R, Joel S, Trew D, Slevin M: Morphine and metabolite behaviour after different routes of morphine administration: Demonstration of the importance of the active metabolite morphine-6-glucuronide. *Clin Pharmacol Ther* 47 (1990) 12-19.
- [27] Bencharit S, Morton CL, Xue Y, Potter PM, Redinbo MR. Structural basis of heroin and cocaine metabolism by a promiscuous human drug-processing enzyme. *Nat Struct Biol* 2003; 10:349-56. Erratum in: *Nat Struct Biol* 10 (2003) 577.
- [28] Gyr E, Brenneisen R, Bourquin D, Lehmann T, Vonlanthen D, Hug I. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of intravenously, orally and rectally administered diacetylmorphine in opioid dependents, a two-patient pilot study within a heroin-assisted treatment program. *Int J Clin Pharmacol Ther* 38 (2000) 486-91.
- [29] Girardin F, Rentsch KM, Schwab MA, Maggiorini M, Pauli-Magnus C, Kullak-Ublick GA, Meier PJ, Fattinger K. Pharmacokinetics of high doses of intramuscular and oral heroin in narcotic addicts. *Clin Pharmacol Ther* 74 (2003) 341-52.
- [30] Lotsch J, Skarke C, Liefhold J, Geisslinger G. Genetic predictors of the clinical response to opioid analgesics: clinical utility and future perspectives. *Clin Pharmacokinet* 43 (2004) 983-1013.
- [31] Grond S, Radbruch L, Lehmann KA. Clinical pharmacokinetics of transdermal opioids: focus on transdermal fentanyl. *Clin Pharmacokinet* 38 (2000) 59-89.

[32] Eap CB, Buclin T, Baumann P. Interindividual variability of the clinical pharmacokinetics of methadone: implications for the treatment of opioid dependence. *Clin Pharmacokinet* 41 (2002) 1153-93.

[33] Lorenzo P, Ladero J.M., Leza J.C., Lizasoain, I. *Drogodependencias: Farmacología. Patología. Psicología. Legislación.* Ed Méd. Panamericana, 1999.

[34] Pert, C.B. y Zinder, SH. Opiate receptor: demonstration in nervous tissue. *Science*, 179 (1973) 1011-1014.

[35] Simon, EJ, Hiller, J.M., Edelman, I. Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic analgesic [³H] etorphine to rat-brain homogenate. *Proc Natl Acad Sci USA*, 70 (1973) 1947-1949.

[36] Terenius, L. Stereospecific interaction between narcotic analgesics and a synaptic plasma membrane fraction of rat cerebral cortex. *Acta Pharmacol Toxicol*, 32 (1973) 317-320.

[37] Zinder SH, Pasternak GW. Historical review: Opioid receptors. *Trends Pharmacol Sci* 24 (2003) 198-205.

[38] Bloom, FE. Y Kupfer, D.J. *Psychopharmacology: the fourth generation of progress.* New York: Raven Press, 1995.

[39] Waldhoer M, Bartlett S.E., Whistler J.L. Opioid receptors. *Annu Rev Biochem* 73 (2004) 953-90.

[40] Ward HG, Nicklous DM, Aloyo VJ, Simansky KJ. Mu-opioid receptor cellular function in the nucleus accumbens is essential for hedonically driven eating. *Eur J Neurosci*. 23 (6) (2006) 1605-13.

[41] Di Chiara G, North RA. Neurobiology of opiate abuse. Trends Pharmacol Sci. 13 (5) (1992) 185-93.

[42] Hescheler J, Rosenthal W, Trautwein W, Schultz G. The GTP-binding protein, Go, regulates neuronal calcium channels. Nature 4; 325 (6103) (1987) 445-7.

[43] Schumacher MA, Basbaum AI, Way WL. Opioid analgesic and antagonists En Katzung BG (ed) Basic and Clinical Pharmacology. 9th edit. Lange Medical Books / McGraw-Hill. New York. (2004) 497-516.

[44] Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK (ed) Farmacología. 5^a edic. Elsevier. Madrid. (2004) 562-583.

[45] Cabrera Bonet R, Cabrera Forneiro J. Las Drogas de Abuso: Un reto Sanitario. Universidad Pontificia de Comillas. Madrid, 1994.

[46]. Sawynok J. The therapeutic use of heroin: a review of the pharmacological literature. Can J Physiol Pharmacol 64(1) (1986) 1-6.

[47] Olson KR. Poisoning and drug overdose. Lange Medical Books & McGraw Hill, 2004.

[48] Fingerhut IA. Increases in Poisoning and Methadone-Related Deaths: United States, 1999-2005. Health E-Stat. 49 (2008) 2627 -2829

<http://www.cdc.gov/nchs/products/pubs/pubd/hestats/poisoning/poisoning.htm>

[49] Center for Substance Abuse Treatment, Methadone-Associated Mortality: Report of a National Assessment, May 8-9, 2003. SAMHSA Publication No. 04-3904. Rockville, MD: Center for Substance Abuse Treatment, Substance Abuse and Mental Health Services Administration, 2004.

[50] Sánchez-Hernández AM, Atienza F, Arenal A et al. Torsade de pointes durante el tratamiento con metadona. Rev Esp Cardiol. 58 (10) (2005) 1230-2.

[51] Ehret GB, Voide C, Gex-Fabry M, Chabert J, Shah D, Broers B, Piguet V, Musset T, Gaspoz JM, Perrier A, Dayer P, Desmeules JA. Drug induced long QT syndrome in injection drug users receiving methadone: high frequency in hospitalized patients and risk factors. *Arch Intern Med* 26 (2006) 1280.

[52] Fanoë S, Hvidt C, Ege P, Jensen GB. Syncope and QT prolongation among patients treated with metadone in Copenhagen. *Heart* 93(9) (2007) 1051-5.

[53] Hussain T, Ewer AK. Maternal methadone may cause arrhythmias in neonates. *Acta Paediatr* 96 (2007) 768-9.

[54] Wolff K. Characterization of methadone overdose: clinical considerations and the scientific evidence. *Ther Drug Monitor.* 24(4) (2002) 457-470.

[55] Corkery JM, Schifano F, Ghodse AH, Oyefeso A. The effects of methadone and its role in fatalities. *Human Psychopharmacol Clin Exp.*19 (2004) 565-576.

[56] Drummer OH. Postmortem toxicology. *Forensic Sci Int.*165 (2007) 199-203

[57] Mussoff F, Padosch S, Steinborn S, Madea B. Fatal blood and tissue concentrations of more than 200 drugs. *Forensic Sci Int.* 142 (2004) 161-210.

[58] Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales. DSM-IV. Masson. Barcelona, 1995.

[59] Simonato M. The neurochemistry of morphine addiction in the neocortex. *Trends Pharmacol Sci.* 17(11) (1996) 410-5.

[60] Nestler EJ, Aghajanian GK. Molecular and cellular basis of addiction. *Science.* 278 (1997) 58-63.

[61] Law FD, Nutt JD. Maintenance buprenorphine for opioid users. *Lancet*. 361 (2003) 364-5.

[62] Nestler EJ. Molecular neurobiology of addiction. *Am J Addict*. 10(3) (2001) 201-17.

[63] Nestler EJ. Common molecular and cellular substrates of addiction and memory. *Neurobiol Learn Mem* 78(3) (2002) 637-47.

[64] Williams JT, Christie MJ, Manzoni O. Cellular and synaptic adaptations mediating opioid dependence. *Physiol Rev*. 81(1) (2001) 299-343.

[65] Crowley JJ, Oslin DW, Patkar AA, Gottheil E, DeMaria PA Jr, O'Brien CP, Berrettini WH, Grice DE. A genetic association study of the mu opioid receptor and severe opioid dependence *Psychiatric Genet* 13(3) (2003) 169-73.

Capítulo

4

Muestras biológicas

CAPÍTULO 4. MUESTRAS BIOLÓGICAS

1. Orina
2. Humor Vítreo
3. Referencias bibliográficas

1. ORINA

Se produce en el riñón, cuya unidad funcional es la nefrona (Figura 27). Cada riñón posee aproximadamente un millón de nefronas, donde la sangre que llega es filtrada en el glomérulo. El volumen y composición de la orina se modifica a medida que atraviesa los túbulos proximal y distal, en donde puede darse secreción activa de los componentes desde la sangre o reabsorción pasiva desde el ultrafiltrado a la sangre. Solo las moléculas con un peso inferior a 50.000 unidades de masa atómica son filtradas en los glomérulos, lo que significa que moléculas como las proteínas no son filtradas y por tanto tampoco lo serán las drogas unidas a las proteínas plasmáticas.

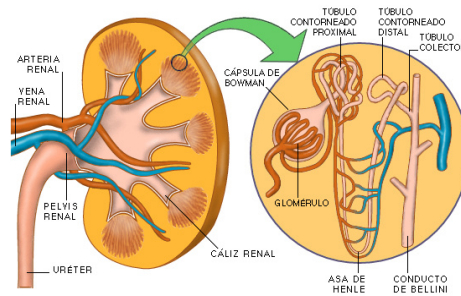


Figura 27. Unidad funcional del riñón: Nefrona [1]

La orina está constituida por un 98% de agua y un 2% de urea, ácido úrico, minerales y materiales fisiológicos regeneradores (hormonas, enzimas). Se trata de un fluido cuya composición química asegura el mantenimiento del balance hídrico entre los electrolitos y la acidez del líquido extracelular corporal hacia la vejiga; esto quiere decir que la orina es tan sólo un filtrado de los componentes químicos de nuestro propio suero, no es tóxica y tampoco es un simple desecho de sustancias no necesarias para nuestro cuerpo. Su densidad es 1,01 a 1,03 y su pH normal está entre 4,5 y 7,5, el pKa de ácidos débiles está entre 3 y 7,5 y el pKa de bases débiles está entre 7,5 y 10. Esto indica que ciertas drogas pueden estar presentes en diferentes proporciones dependiendo del pH urinario; así pues, los compuestos que acidifican la orina como cloruro amónico producen la rápida eliminación de drogas básicas como la cocaína, heroína, metadona y sus metabolitos [2].

La orina es la muestra biológica que con mayor frecuencia es enviada a los laboratorios toxicológicos para realizar un rastreo de drogas de abuso, debido a una serie de ventajas: la concentración de las drogas puede llegar a ser 100 veces mayor que en la sangre; es posible la detección de drogas durante varios días postconsumo, frente a 8-24 horas en la sangre; no contiene proteínas, por lo que las interferencias son mínimas; se obtiene fácilmente y en cantidad suficiente, en contraposición con la sangre, dado el mal estado de las venas en sujetos adictos a drogas por vía parenteral (ADVPs); y no necesita adición de conservantes, solo debe conservarse en frío hasta su análisis. Pero si la muerte se produce rápidamente, la detección de la droga o sus metabolitos en orina será difícil [3, 4].

Los resultados de estos análisis con frecuencia son de ayuda para determinar los efectos fisiológicos del agente tóxico, si bien la correlación existente entre ambos es pobre debido a varios factores que influyen en la velocidad de excreción y en el volumen urinario.

El abuso de heroína es inequívocamente identificado por su metabolito desacetilado, la 6 acetilmorfina, pero su corta vida media de eliminación (40 min) limita el tiempo de detección a 2-8 horas, pues se transforma rápidamente a morfina. Aunque el 90% de la excreción total de morfina (2-12%) ocurre durante el primer día, la droga está presente en orina durante varios días postconsumo, dependiendo del metabolismo, la excreción y la frecuencia de consumo. La presencia de codeína en orina está relacionada con la contaminación de las muestras ilícitas de heroína. Una fracción pequeña (10%) se transforma en morfina, de la cual se pueden encontrar fracciones tanto libre como conjugada. Por esta razón algunas veces no es posible distinguir entre consumo de heroína, morfina o codeína. La presencia de morfina sola en orina indica exposición a heroína o morfina, mientras que la detección de codeína con bajas concentraciones de morfina indica consumo de codeína.

También la orina es una muestra útil para detectar el consumo de cocaína. Solo un 1-5% de la dosis se excreta inalterada en la orina, aunque este porcentaje puede aumentar a pH ácido. La cocaína es generalmente detectada después de 8 horas y durante un máximo de 24 horas, mientras que su metabolito benzoilecgonina (BEG) es detectada hasta 3-5 días postconsumo. En presencia de etanol, la cocaína se metaboliza a cocaetileno, que también es excretado en orina, pero de forma más

lenta. Un resultado positivo de BEG en orina generalmente se considera como evidencia de uso ilegal de cocaína y la presencia de cocaetileno demuestra el consumo de cocaína y alcohol.

La metadona inalterada, junto con sus metabolitos principales (EDDP y EMDP), son excretados en la orina de las primeras 48 horas, aunque se observa una gran variabilidad en función del pH urinario: en orinas básicas el valor puede ser el doble que en orinas ácidas.

2. HUMOR VÍTREO

El humor vítreo es una sustancia gelatinosa de color claro que ocupa la porción central del ojo, con una corteza densa firmemente adherida a la lámina basal de las células circundantes del cristalino y la retina. Su volumen aproximado es de 4 mL y constituye el 80% del globo ocular, siendo, por tanto, la mayor estructura interna del ojo. Es un tejido mesenquimatoso, transparente, que deja pasar la luz a la retina y permite que diferentes sustancias químicas difundan desde el cuerpo ciliar hacia la retina. Su viscosidad cambia con la edad, la especie y el lugar del ojo [5]. Su pH se encuentra entre 7 y 7,8, y está constituido principalmente por agua (99%) y una red de fibras de colágeno embebidas en una sustancia rica en ácido hialurónico, siendo muy escaso el número de células o hialocitos [6,7].

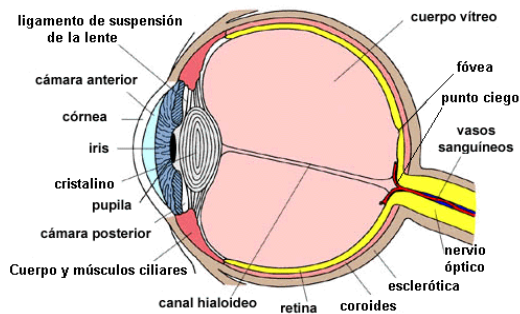


Figura 28. Partes del ojo humano [8]

Wong y McFarlin [9] sugieren que el vítreo sirve como un reservorio metabólico para la retina, los hialocitos y los tejidos vecinos. Estos investigadores refieren la presencia en el vítreo de galactosa, glucosa, manosa, fructosa y ácido hialurónico, precursores del ácido glucurónico y glucosamina.

La oxigenación de los tejidos intraoculares es un aspecto fundamental de la fisiología del ojo, especialmente en el metabolismo que tiene lugar en la retina. El humor vítreo puede servir como depósito de desechos metabólicos, como el ácido láctico. Ya que niveles elevados de esta sustancia podrían ser perjudiciales, el ácido ascórbico del vítreo puede desempeñar un papel protector similar al de un “basurero” de radicales libres resultantes del metabolismo de la retina y del cristalino así como de radicales libres generados en las reacciones fotoquímicas.

La presencia de barreras oculares y la “lentitud” del proceso de difusión son la causa de que las modificaciones transitorias en el torrente sanguíneo se reflejen muy despacio en el cuerpo vítreo total. Las sustancias que llegan al vítreo desde la circulación general lo hacen a partir de la arteria oftálmica, difundiendo sólo la droga libre. El equilibrio entre la concentración en sangre y humor vítreo depende de los siguientes factores [10]: solubilidad de la droga en humor vítreo; liposolubilidad de la droga, pK_a de la droga, y pH de los dos fluidos.

El humor vítreo desempeña un importante papel en el movimiento de solutos y disolventes dentro del ojo [11, 12, 13, 14]. El movimiento del agua en el interior del vítreo es muy activo, con el 50% de la misma circulando cada 10-15 minutos. Esta muestra biológica presenta algunas características: su fácil accesibilidad, volumen suficiente, bajo contenido en proteínas, estar protegido de la circulación general y ser más resistente a la contaminación bacteriana, que la hacen sumamente útil para el análisis de drogas de abuso, sobre todo cuando es imposible disponer de muestras de sangre u orina porque los cuerpos han sufrido un shock hemorrágico o están quemados, embalsamados o afectados por procesos de descomposición.

A la hora de interpretar los resultados de los análisis toxicológicos llevados a cabo hay que tener en cuenta una serie de variables: el tiempo transcurrido desde la muerte del sujeto, la vía de administración, los hábitos de consumo del individuo y la redistribución postmortem [15]. En este sentido muchos han sido los esfuerzos llevados a cabo para intentar determinar la relación existente entre los niveles de

droga presentes en la muestra analizada (orina, vítreo, saliva, etc.) con los correspondientes en sangre, sin poder llegar a una conclusión común. Wyman y Bultman [16] comprobaron que el vítreo es una muestra adecuada para el análisis de drogas de abuso, llegando a discernir si la morfina presente en la muestra deriva de un consumo de heroína o procede del metabolismo de la codeína; si la relación codeína/morfina es mucho menor que 1 se trataría de codeína proveniente del consumo de heroína. Otros autores han encontrado diferentes relaciones entre los niveles determinados en las muestras en estudio y los valores sanguíneos. Así, los resultados en humor vítreo deben servir para confirmar la presencia de drogas de abuso, especialmente en el caso de 6AM, para certificar el consumo de heroína debido a su mayor permanencia en vítreo [17] pero extrapolar estos resultados para evaluar niveles sanguíneos en el momento de la muerte puede dar error.

Se recomienda, para reducir la variabilidad de los resultados y comparar los niveles de los analitos estudiados en diferentes muestras con niveles en sangre, utilizar los valores encontrados en sangre femoral ya que esta muestra es la más fiable a la hora de estimar la concentración en el momento de la muerte [18].

3. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Descargado de recursos.cnice.mec.es/.../contenidos14.htm

[2] Levine B (Ed). Principles of forensic toxicology. Edit. American Association for Clinical Chemistry. USA (1999).

[3] Skopp G. Preanalytic aspects in postmortem toxicology. Forensic Sci Int 142 (2004) 75-100.

[4] Pla Martínez A, Hernández Jerez AF. Investigación toxicológica. En: Villanueva E (Ed) Medicina Legal y Toxicología. 6ª Edición. Masson. Barcelona. (2004) 778-811.

[5] Sebag J, Ophych FC. "El Vítreo" En Hart WK (ed) "Fisiología del ojo". 9ª Edición. Mosby/ Doyma, Madrid, (1994) 270-349.

- [6] Swann DA. Chemistry and Biology of Vitreous Body. *Int Rev Exp Pathol* 22 (1980) 118.
- [7] Comper WD, Laurent TC Physiological function of connective tissue polysaccharides. *Physiol Rev* 58(1) (1978) 255-315.
- [8] Descargado de <http://anatomiadelojohumano.blogspot.com/>
- [9] Wong, V.G.; McFarlin, D.E.: Primary familial amyloidosis. *Arch. Ophthalmol.* 78 (1967) 208-213.
- [10] Ziminski KR, Wemyss CT, Bidanset JH, Manning TJ, Lukash L. Comparative study of post-mortem barbiturates, methadone and morphine in vitreous humor, blood, and tissue. *J Forensic Sci.* 29(3) (1984) 903-909.
- [11] Lin DL, Chen CY, S KP, Havier R, Lin RL. Distribution of Codeine, Morphine, and 6-Acetylmorphine in Vitreous Humor. *J Anal Toxicol* 21 (1997) 258-261.
- [12] Vogel J, Hodnett CN. Detection of Drugs in Vitreous Humor with an Enzyme Immunoassay Technique. *J Anal Toxicol* 5 (1981) 307-309.
- [13] Logan BK, Stafford DT. High-Performance Liquid Chromatography with Column Switching for the Determination of Cocaine and Benzoyllecgonine Concentrations in Vitreous Humor. *J Forensic Sci* 35 (6) (1990) 1303-1309.
- [14] Bermejo AM, Ramos I, Fernández P, López-Rivadulla M, Cruz A, Chiarotti M, Fucci N, Marsilli R Morphine Determination by Gas Chromatography/ Mass Spectroscopy in Human Vitreous Humor and Comparison with Radioimmunoassay. *J Anal Toxicol* 16 (1992) 372-374.

[15] Fernández P, Aldonza M, Bouzas A, Lema M, Bermejo AM, Tabernero MJ. GC-FID determination of cocaine and its metabolites in human bile and vitreous humor. *J Appl Toxicol* 26 (2006) 253-257.

[16] Wyman J, Bultman S. Postmortem distribution of heroin metabolites in femoral blood, liver, cerebrospinal fluid, and vitreous humour. *J Anal Toxicol* 28 (2004) 260-263.

[17] Antonides HM, Kiely ER, Marinetti LJ. Vitreous fluid quantification of opiates, cocaine and benzoylecgonine: comparison of calibration curves in both blood and vitreous matrices with corresponding concentrations in blood. *J Anal Toxicol* 31 (2007) 469-476.

[18] Drummer OH, Gerostamoulos J. Postmortem drug analysis: Analytical and toxicological aspects. *Ther Drug Monitor* 24 (2002) 199-209.

Capítulo

5

Metodología analítica

CAPÍTULO 5. METODOLOGÍA ANALÍTICA

1. Extracción en Fase Sólida
2. Extracción Asistida por Microondas
3. Cromatografía Líquida de Alta Resolución
4. Diseño experimental
5. Referencias bibliográficas

1. EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

La extracción en fase sólida (SPE) es una técnica de preparación de muestra que se basa en la retención de los compuestos de interés sobre fases estacionarias sólidas de diferente naturaleza. Es decir, concentra y purifica analitos presentes en una muestra líquida por adsorción sobre un material sólido (o una fase estacionaria líquida inmovilizada sobre un soporte sólido), seguida de la elución del analito, con un disolvente apropiado, para su posterior análisis. Presenta como ventajas: facilidad de automatización; menor consumo de disolventes orgánicos, si se compara con la extracción líquido-líquido (LLE); y gran variedad de fases estacionarias. Los objetivos que pretende este tipo de extracción son una concentración de grandes volúmenes de muestra con recuperaciones cuantitativas, elución de los analitos retenidos en la fase sólida con la mínima cantidad de disolvente, y selectividad en los procesos de elución y concentración de los analitos.

La aplicación de la muestra sobre los diferentes cartuchos puede llevarse a cabo mediante presión a vacío, gravedad, centrifugación o presión positiva [1]. Cuando el analito se hace pasar a través del adsorbente, aparecen unas fuerzas de interacción entre éste y el analito que originan la retención del mismo. Estas interacciones pueden ser polares, no polares o hidrofóbicas, electrostáticas o de exclusión por tamaños. Independientemente de la naturaleza del adsorbente utilizado éste ha de tener una gran área superficial, una adsorción reversible, una elevada pureza y estabilidad química y permitir un buen contacto superficial con la disolución en la que se encuentran las especies a concentrar. Por tanto, la elección del adsorbente es un parámetro muy importante, ya que afecta al rendimiento de la extracción. Para seleccionar el adsorbente deben considerarse una serie de propiedades tales como:

- Características del analito y de la matriz
- Técnica usada para la determinación posterior de los analitos
- Capacidad de carga: masa total de analito que puede ser retenido por una masa determinada de adsorbente en condiciones óptimas.
- Mecanismos de interacción analito-adsorbente.
- Selectividad: capacidad del eluyente para discriminar entre el analito y el resto de componentes de la matriz.

- Volumen de Rotura: volumen de muestra a partir del cual el analito comienza a ser eluído.

En SPE hay que tener en cuenta, además del adsorbente, la elección adecuada del disolvente, velocidad de flujo y tamaño de partícula. En este tipo de proceso se pueden distinguir cuatro etapas básicas [2]:

1ª Etapa: Acondicionamiento del adsorbente, para que esté solvatado. Se utiliza un disolvente o mezcla de disolventes que eliminen posibles impurezas existentes sobre la superficie del material y que faciliten la interacción entre éste y la muestra en la que se encuentra el analito a concentrar.

2ª Etapa: Carga de la muestra, en donde el analito se concentra, quedando retenidos tanto el analito como las interferencias contenidas en la muestra.

3ª Etapa: Lavado, para eluir las interferencias retenidas, mientras que los analitos permanecen en el adsorbente. Si la matriz de la muestra es acuosa, puede usarse un tampón acuoso o una mezcla agua/disolvente orgánico.

4ª Etapa: Elución del analito, para su recuperación de la fase sólida. Se usa un disolvente orgánico, inmisible con la matriz de la muestra, por lo que se debe realizar un secado previo durante unos minutos.



Figura 29. Sistema de SPE utilizado en este trabajo.

2. EXTRACCIÓN ASISTIDA POR MICROONDAS

La extracción asistida por microondas (MAE) proporciona recuperaciones mejores o similares a las obtenidas en los procesos de extracción convencionales. Además, ofrece otras ventajas:

- ✓ Extracción simultánea de hasta 12 muestras en menos de 15 minutos
- ✓ La agitación de la muestra disminuye el tiempo de extracción, reduce el consumo de disolvente y mejora la recuperación del analito.
- ✓ Menor consumo de energía y en general, menor cantidad de residuos, por lo que puede hablarse de técnicas limpias [2].

Las microondas son ondas electromagnéticas que interactúan con la materia provocando el desplazamiento de iones y tránsitos rotacionales, pero no causa cambios en la estructura molecular. La capacidad de absorber energía de microondas varía con la naturaleza química de la especie sometida a la radiación. Si las moléculas polares o partículas cargadas son libres para moverse causan una corriente en el material; en caso contrario, las partículas sufren una reorientación para colocarse en la dirección del campo eléctrico. Esto se conoce como polarización dieléctrica [3]. En la extracción asistida por microondas (MAE) el calentamiento de la muestra ocurre por distintos mecanismos según se utilice como disolvente: una mezcla de disolventes con alta y baja pérdida dieléctrica, un disolvente con pérdida dieléctrica baja con una muestra de pérdida dieléctrica alta o una mezcla de disolventes polares con pérdida dieléctrica alta [4]. Los parámetros a tener en cuenta son: disolvente y volumen de disolvente [2,5], temperatura, potencia, tiempo de extracción y naturaleza de la matriz.

Los sistemas de microondas constan de dos componentes principales:

- *El generador de microondas o magnetrón*: consiste en un tubo vacío que convierte la energía eléctrica continua en energía de microondas.
- *El aplicador de microondas*: es un instrumento diseñado para asegurar la transferencia de energía electromagnética desde la línea de transmisión hasta el material a tratar. Actualmente están comercializados dos tipos de sistemas de calentamiento por microondas: *el sistema de recipiente abierto*, en el que la extracción tiene lugar a presión atmosférica, por lo que la máxima temperatura posible viene determinada por el punto de ebullición del disolvente a esa presión; y

el sistema de recipiente cerrado, en el que el disolvente puede calentarse a temperaturas superiores a su punto de ebullición, lo que proporciona rapidez y eficacia. Como el campo eléctrico no es homogéneo, los recipientes se colocan en un soporte giratorio [6].

El sistema comercial utilizado en este trabajo es el ETHOS PLUS MPR-300/12S de media presión (Milestone). Este sistema ha sido diseñado para trabajar con disolventes orgánicos y permite que hasta 12 vasos de extracción sean irradiados simultáneamente hasta alcanzar 1000 W de energía de microondas al 100% de potencia. El sistema está formado por:

- *Vasos de extracción*: son vasos de teflón que resisten temperaturas máximas de trabajo de 260°C (períodos largos) o 300°C (períodos cortos) y una presión máxima de 35 bar (500 psi). Durante la extracción se encuentran presurizados y por ello incorporan un mecanismo de cierre que es al mismo tiempo un sistema de alivio de presión (“tapa muelle”).
- *Sistemas de control de presión y temperatura*, además de un sensor QP (Quality Pressure) que controla el calentamiento evitando una sobrepresión y regula la potencia cuando detecta gases difundidos a través de los vasos.



Figura 30. Sistema de microondas utilizado en el trabajo

3. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN - DETECTOR DE RED DE DIODOS (HPLC-DAD)

Es una técnica que puede separar un amplio rango de analitos sin necesidad de tratamientos previos, y presenta otras ventajas porque puede aplicarse a la separación y determinación de compuestos térmicamente inestables y no volátiles. Las partes que componen normalmente un sistema de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) son: depósitos de disolventes, inyector, bomba, para impulsar la fase móvil a través de la columna, columna, donde se separan los componentes de la muestra, detector y sistema de procesamiento de datos [7]. La Figura 31 muestra el esquema de un equipo de HPLC

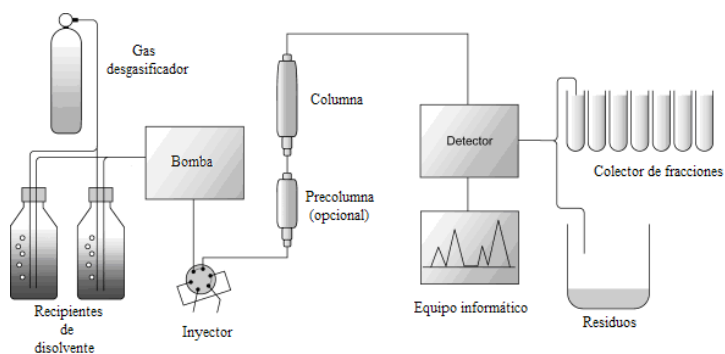


Figura 31. Esquema de un equipo de HPLC [7]

Las partes que componen normalmente un sistema HPLC son:

- Depósitos de disolventes
- Inyector
- Bomba, para impulsar la fase móvil a través de la columna
- Columna, donde se separan los componentes de la muestra
- Detector
- Sistema de procesamiento de datos

La forma más sencilla de llevar a cabo una separación en HPLC es mediante elución isocrática, es decir, manteniendo constante la composición de la fase móvil. Sin embargo, a menudo se puede obtener un cromatograma más satisfactorio mediante elución en gradiente, que consiste en utilizar mezclas variables de dos o más disolventes de distinta polaridad, mejorando la eficacia de la separación [8]. Según la polaridad de la fase estacionaria de la columna, se distinguen dos tipos de cromatografía: en fase normal (la fase estacionaria es muy polar y la fase móvil poco polar) y en fase reversa (la fase estacionaria es poco polar y la fase móvil es más polar).

La retención en cromatografía líquida de alta resolución es el resultado de múltiples tipos de interacciones entre los analitos de la muestra a estudiar, tanto con la fase móvil como con la estacionaria. Para lograr una buena separación de varios analitos, la fase estacionaria de la columna debe ser capaz de reconocer las diferencias entre ellos. Las alquílicas tradicionales, como las C18, diferencian bastante bien analitos de diferentes hidrofobicidades, pero no así diferentes grupos funcionales polares de analitos de hidrofobicidades similares. Sin embargo, las fases reversas, que poseen grupos funcionales polares, pueden interactuar con grupos polares específicos mediante interacciones polares, proporcionando frecuentemente mejores separaciones debido a la diferente retención y selectividad que presentan respecto a las C18 [9].

La cromatografía líquida de alta resolución es una técnica muy versátil. Los sistemas más comunes de detección son: ultravioleta, electroquímico, fluorescencia y espectrometría de masas [10], algunos de los cuales se ven limitados dentro de la cromatografía de gases. El detector ultravioleta más reciente es el *detector de red de diodos (DAD)* en el cual la radiación, procedente de una lámpara de deuterio, pasa a través de un divisor de haz hacia la celda de flujo, de modo que sobre la muestra incide totalmente la radiación lumínica. El haz de luz pasa a través de otra lente que lo enfoca hacia una red de difracción produciendo la dispersión de la luz. La radiación dispersada se refleja sobre un transductor de red de diodos, consistente en una serie de 200 a 1000 fotodiodos sobre un chip de silicón. La separación que existe entre las rendijas de la red de difracción es la misma que existe entre los diodos, por ello la señal de cada diodo se va a corresponder con una radiación de

diferente longitud de onda (190-800 nm). El escaneado secuencial de todas las señales da lugar a un cromatograma tridimensional (tiempo x absorbancia x longitud de onda) [11].

El detector de red de diodos presenta tres grandes ventajas: detección de señal múltiple, identificación de los picos y determinación de la pureza de los picos. También son mayores la reproducibilidad y la confianza de las medidas en cualquier punto de la curva de absorción debido a que el sistema óptico es fijo y estable. Al poder disponer simultáneamente de los valores de absorción a todas las longitudes de onda, resulta más fácil trabajar en algunas aplicaciones específicas como análisis de multicomponentes [12].

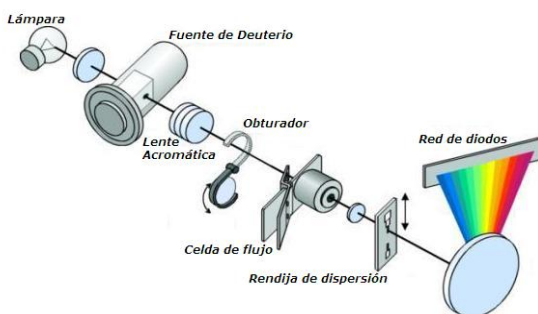


Figura 32. Esquema básico de un detector de red de diodos

4. DISEÑO EXPERIMENTAL

Cuando se pretende optimizar un proceso, no siempre es fácil seleccionar los factores a considerar. Aunque alguna de las variables importantes es fácilmente reconocible, existen otras que no se pueden descartar porque también pueden influir en el comportamiento del sistema. La solución ideal sería considerar todos los factores pero esto normalmente es inviable porque sería necesario un número muy elevado de experimentos. De este modo, surgen los diseños experimentales como herramienta para reducir el número de experimentos. Los factores caracterizan las condiciones operativas del sistema de interés. Un factor es cualquier aspecto de las

condiciones experimentales que influye en el resultado obtenido en un experimento. Se descartan los factores no significativos de modo que se produce una reducción del número de experimentos y un ahorro de tiempo y dinero. Los factores pueden ser cualitativos (si sus valores no se pueden ordenar numéricamente) o cuantitativos (si sus valores se pueden ordenar numéricamente). Los diferentes valores de un factor se denominan niveles y deben ser dos como mínimo [13].

En un estudio de factores el modelo no es predictivo, sino que está construido para medir el cambio en la respuesta con los distintos niveles de un factor y para determinar las interacciones, pero no para optimizar una respuesta. Sin embargo, los experimentos realizados en esta fase del estudio pueden servir de base para la optimización.

Los tres principios básicos del diseño de experimentos son:

Replicación: Consiste en realizar una serie de réplicas de cada experimento. Permite calcular el error experimental y conocer si un factor es realmente significativo. El principal problema asociado con la replicación es que se aumenta el tiempo y los costos del análisis.

Randomización: Se trata del orden en que se realizan los experimentos individuales. Una condición de los métodos estadísticos es que las observaciones estén distribuidas aleatoriamente.

Bloqueado: Es una técnica utilizada para aumentar la precisión de un experimento. Se refiere a la utilización de una porción de material experimental que presenta una mayor homogeneidad que el resto del material del que se dispone. Esta porción se conoce con el nombre de *bloque*.

A la hora de decidir qué factores se incluyen en el diseño se pueden introducir todas aquellas variables que consideremos puedan afectar al proceso e ir descartándolas progresivamente para quedarnos con las que afectan realmente al proceso, lo cual conlleva un enorme gasto de tiempo y dinero, o bien en base a una serie de experiencias previas decidir cuáles son las que a nuestro juicio juegan un papel determinante.

Para la aplicación de un diseño experimental se recurre a las *matrices de diseño* seguidas de los *planes de experimentación*. Las primeras incluyen conjuntos de experiencias a realizar, su naturaleza (niveles de las variables codificadas) y su

organización en el tiempo. Los segundos consisten en la aplicación de la matriz de experiencias en el mundo real.

Con una estrategia experimental, se persigue encontrar una relación causa-efecto entre los factores que afectan al sistema y las respuestas obtenidas. Se busca un modelo matemático que defina esta relación, para lo cual se hace una planificación de los ensayos a realizar, que constituyen la matriz de experiencias, un objeto matemático, abstracto, desarrollado para tener un determinado número de cualidades, independientemente del campo experimental estudiado. Ésta se elabora utilizando variables sin dimensiones, codificadas o provistas de normas [14]. Existen varios tipos de matrices de experiencias, entre las que destacan las matrices de experiencias factoriales simétricas o asimétricas, completas o fraccionarias [15].

Una vez definida la matriz de experiencias se transforma en el plan de experimentación, mediante el cual se realizan las experiencias y se obtiene la matriz de respuestas. En cualquier tipo de análisis, la función de respuesta se suele ajustar en general a un polinomio de primer o segundo grado:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \dots + \beta_n x_n + \beta_{11} x_1^2 + \dots + \beta_{nn} x_n^2 + \beta_{1n} x_1 x_n + \dots + \beta_{n1} x_n x_1$$

En esta ecuación, Y es la respuesta, y x_n son los diferentes factores de los que depende la respuesta. Los coeficientes β tienen el siguiente significado:

β_0 es el término constante; β_n es el efecto lineal del factor n ; β_{1n} es el efecto de interacción de dos factores; β_{nn} es el efecto cuadrático del factor n -ésimo.

Los experimentos realizados nos conducen a la evaluación de los coeficientes del modelo, de modo que podemos determinar la importancia que tiene cada factor, así como las posibles interacciones entre factores diferentes.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Thurman EM, Mills MS. Solid-phase extraction. Principles and Practice. Wiley, New Cork, 1998.

[2] Cela R, Lorenzo RA, Casais MC. Técnicas de separación en Química Analítica. Ed. Síntesis. Madrid (2002) 228-240.

[3] Jacob J, Boey F. Thermal and non-thermal interaction of microwave radiation with materials. J. Materials Sci. 30 (1995) 5321-5327.

[4] Dean, JR, Fitzpatrick, L, Heslop, C. Microwave-assisted solvent extraction in organic analysis En Handley, AJ. (Ed.) Extraction methods in organic analysis. Ed. CRC Press. Sheffield (1999).

[5] Eskilsson CS, Björklund E. Analytical-scale microwave-assisted extraction. J Chromatogr A 902 (2000) 227-250.

[6] Camel V. Microwave-assisted solvent extraction of environmental samples. Trends Anal Chem 19(4) (2000) 229-248.

[7] Moffat AC, Osselton MD, Widdop B. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material. Pharmaceutical Press, London, 2004.

[8] Skoog DA, West DM. Fundamentos de Química Analítica. Edit. Reverté. Barcelona, 1988.

[9] Bell D, Santasania C. Supelco, Bellefonte, P.A., 2003.

[10] Nakashima K. High performance liquid chromatographic analysis of drugs of abuse in biological samples. Journal of Health Science, 51(3) (2005) 272-277.

[11] Huber L, George SA. Diode array detection in HPLC. Chromatographic Science Series, vol.62. Ed. Marcel Dekker. New York, 1993.

[12] Bermejo F, Bermejo P, Bermejo A. Química analítica general, cuantitativa e instrumental. vol.2. Ed Paraninfo. Madrid, 1991.

[13]. Miller JN, Miller JC. Estadística y Quimiometría para Química Analítica. Ed. Prentice Hall. Madrid, 2002.

[14] Goupy JL. Methods for experimental design. Principles and applications for physicists and chemists. Edit. Elsevier. Amsterdam, 1993.

[15] Montgomery DC. Design and analysis of experiments. John Wiley&Sons. Canadá, 1991.

Capítulo

6

Antecedentes bibliográficos

CAPÍTULO 6. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

1. Técnicas de extracción drogas de abuso
2. Técnicas cromatográficas
3. Referencias bibliográficas

1. TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN DE DROGAS DE ABUSO

La preparación de la muestra para el análisis es un paso muy importante y el más lento. La finalidad de este proceso es la extracción de los analitos de matrices complejas en el menor tiempo, con el menor consumo de energía y con la mayor eficiencia y reproducibilidad posibles.

Los sistemas más comunes de extracción de drogas de abuso actualmente son: extracción líquido-líquido (LLE) y extracción en fase sólida (SPE). La segunda va a ofrecer numerosas ventajas frente a la primera, ya que permite una mejor purificación de la muestra, mayor selectividad y bajos volúmenes de muestra y solventes. Sin embargo, el elevado consumo de drogas de abuso hace necesaria una investigación continuada en este campo, desde el punto de vista analítico y toxicológico, lo que nos llevó a la búsqueda de métodos más eficaces de extracción, tales como la extracción asistida por microondas (MAE).

La radiación microondas ha sido muy utilizada para la extracción de contaminantes orgánicos como hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH), policlorobifenilos (PCB), pesticidas, herbicidas y fenoles, en varias matrices como sedimentos, suelos, aguas, etc. Pero en escasas ocasiones para la extracción de drogas de abuso y en menor medida aún a partir de matrices biológicas. La extracción de compuestos orgánicos por microondas comienza con Ganzler et al [1], que desarrollaron procedimientos para la extracción de lípidos, no-nutrientes y pesticidas de suelos, sedimentos y alimentos con un pequeño volumen de disolvente e irradiando durante treinta segundos hasta siete veces en microondas domésticos. También Ganzler et al [2] realizaron la extracción de esparteína y sus metabolitos en sedimentos y heces de rata, mostrando la importancia de comprobar la homogeneidad del horno microondas para obtener una buena reproducibilidad de la técnica

Paré et al [3] desarrollaron procesos de extracción asistida por microondas de productos naturales en agua, suelos, plantas y animales, mostrando capacidades analíticas (selectividad, sensibilidad, linealidad y reproducibilidad) similares o mejores que las de métodos tradicionales. También en 1994 surge una de las primeras aplicaciones de la radiación microondas a tejidos biológicos, realizada por Croteau et al [4], que extrajeron el ácido 3-nitro-4-hidroxifenilarsónico de hígado,

riñón y músculo de cerdo; este ácido es un suplemento dietético para cerdos que aumenta su crecimiento enormemente.

Franke et al [5] utilizaron la radiación de microondas para la extracción de drogas a partir de suero humano, entre ellas metadona, lidocaína y diacepan. El sistema fue comparado con la extracción líquido-líquido concluyendo que no existe degradación las drogas por la exposición a elevadas temperaturas y que las recuperaciones obtenidas son muy similares; esto indica que el calentamiento durante el proceso de extracción apenas contribuye a las recuperaciones de las drogas, pero el uso de microondas disminuye sustancialmente el tiempo de extracción y el consumo de disolvente.

Eskilsson et al [6] aplicaron la extracción asistida por microondas para la obtención de felodipina a partir de comprimidos; optimizaron el disolvente y el tiempo de extracción, concluyendo que una de las mayores ventajas de este sistema es el mínimo tratamiento de la muestra.

Brachet et al [7] analizaron cocaína y benzoilecgonina en las hojas de coca, utilizando para ello la extracción asistida por microondas a presión atmosférica. Obtuvieron una buena eficiencia de la extracción, seleccionando metanol como disolvente por su capacidad de calentamiento y su habilidad para solubilizar la cocaína.

2. TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

Después de la preparación de la muestra se sigue con una técnica cromatográfica. La sensibilidad de la cromatografía de gases asociada a espectrometría de masas (GC-MS) hizo que fuese una de las más utilizadas para la determinación de estas sustancias, pero la necesidad de derivatizar las muestras y el coste de la técnica han dado paso a la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) como alternativa, ya que permite separar un gran número de sustancias sin un tratamiento químico previo. Además usa una gran variedad de métodos de detección tales como ultravioleta (UV), DAD, fluorescencia y más recientemente el espectrómetro de masas, lo que explica la existencia de numerosos trabajos llevados a cabo con esta técnica para la determinación de opiáceos, cocaína y sus metabolitos en muestras

biológicas, en los que ha ido variando el método de detección, el tipo de columna, la composición de la fase móvil y el procedimiento de extracción de las drogas a partir de las matrices correspondientes.

La tabla 5 muestra una relación de los últimos trabajos en los que se usa la cromatografía líquida de alta resolución asociada a distintos detectores para determinar este tipo de drogas de abuso en muestras biológicas, fundamentalmente orina y humor vítreo.

Tabla 5. Revisión bibliográfica para la determinación de drogas por HPLC

Analito	Detector	Fase móvil	Columna	Referencia
100 drogas básicas	UV	Acetonitrilo: tampón fosfato pH= 3,2	Lichrospher 100 C8/II (250 x 4,6 mm)	Logan, 1990 [8]
Cocaína, BEG	UV	Acetonitrilo: tampón fosfato pH= 3 (30-70)	Lichrospher CH8 (250 x 4,6 mm)	Logan, 1990 [9]
Cocaína, BEG	UV	Tampón fosfato pH=2,3 + 6% acetonitrilo	Velosep ODS (100 x 3,2 mm, 3 µm)	Sandberg, 1990 [10]
Morfina, BEG	UV	N-Hexano: diclorometano: metanol: dietilamina	Lichrospher 100 RP 8 (250 x 4 mm, 5 µm)	Ferrara, 1992 [11]
Cocaína, BEG	UV	Tampón fosfato pH=3: acetonitrilo: dietilamina	IBM C8 (150 x 4,6 mm, 5 µm)	Larsen, 1992 [12]
Cocaína, BEG	DAD	Metanol: tampón fosfato (15:85)	Separon SGX CN (150 x 3 mm, 7 µm)	Balíková, 1994 [13]
Cocaína, BEG	UV	Metanol: tampón fosfato (25-75)	Lichrospher RP18 (125 x 4 mm)	Fernández, 1994 [14]
Morfina, cocaína, BEG, metadona, cocaetileno	DAD	Acetonitrilo: metanol: ácido ortofosfórico	Zorbax RX (250 x 4,6 mm)	Hill, 1994 [15]
Drogas de abuso	DAD	Acetonitrilo: tampón fosfato pH=3,2	Lichrospher 60 RP (250 x 4 mm, 5 µm,)	Li, 1994 [16]
Morfina, codeína, 6AM	UV	Pentano: diclorometano: metanol con 0,5% dietilamina	Hypersil (200 x 4,6 mm)	Low, 1995 [17]
Morfina, codeína, 6AM, cocaína, BEG	UV	Metanol: acetonitrilo: 1,2% acetato amónico (40:15:45)	Adsorbospher HS C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm)	Theodoridis, 1995 [18]
Drogas básicas	DAD	Hidróxido sódico 0,0125M: metanol	Aluspher PR select B (125 x 4 mm, 5 µm)	Lambert, 1995 [19]
Cocaína, BEG, cocaetileno	UV	Acido pentano sulfónico: tampón fosfato pH 6: acetonitrilo	NovaPak C8 (150 x 3,9 mm, 4 µm)	Sukbuntherng 1995 [20]
Morfina, codeína, cocaína, metadona	DAD	Metanol: tetrahidrofurano: tampón fosfato	NovaPak C18 (300 x 3,9 mm, 4 µm)	Tracqui, 1995 [21]
Morfina, 6AM, codeína, cocaína	UV	Agua: ácido ortofosfórico: hexilamina: acetonitrilo	Spherisorb ODS-1 (125 x 4,6 mm)	Grogg-Sulser, 1995 [22]
Morfina, codeína, cocaína, metadona	DAD	Acetonitrilo: ácido fosfórico con trietilamina pH=3,4	Supelcosil-Lichrospher RP 8	Koves, 1995 [23]

Analito	Detector	Fase móvil	Columna	Referencia
Morfina, glucurónidos	Fluoresc.	Acetonitrilo: tampón fosfato trietilamónico, pH=3	Superspher RP 18 (125 x 4 mm, 4 µm)	Aderjan, 1995 [24]
Morfina, 6AM, codeína, cocaína, BEG, cocaetileno	DAD	Acetonitrilo: metanol: agua (10:10:80)	Hypersil BDS C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm)	Clauwaert, 1996 [25]
Cocaína, BEG	UV	Metanol: tampón fosfato pH=7 (70:30)	Lichrospher RP18 (125 x 4 mm)	Fernández, 1996 [26]
Morfina, 6AM, cocaína, BEG	MS	Acetato amónico 100 mM	ODS RP (150 x 4,6 mm)	Tatsuno, 1996 [27]
Cocaína, BEG, cocaetileno	UV	Tampón fosfato pH=3: acetónitrilo: butilamina (81:18:1)	Lichrosorb RP18 (250 x 4,6 mm, 10 µm)	Phillips, 1996 [28]
Morfina	DAD	Acetonitrilo: tampón fosfato	Symmetry C8 (250 x 4,6 mm, 5 µm)	Gaillard, 1997 [29]
Codeína y drogas básicas	DAD	Acetonitrilo: tampón fosfato trietilamónico pH=3	Spherisorb S5 OD/CN (150 x 4,6 mm)	Elliot, 1998 [30]
Metadona, EDDP	UV	Acetonitrilo: dimetiloctilamina: fosfato sódico pH 5	Chiral-AGP (100 x 4 mm)	Angelo, 1999 [31]
Cocaína, cocaetileno, BEG	DAD	Acetonitrilo: tampón fosfato pH=2,3	Supelcosil AB7 (250 x 4,6 mm, 5 µm)	Foulon, 1999 [32]
Metadona, EDDP	DAD	0,1% Ácido trifluoroacético: metanol (60:40)	Symmetry C18	Cheng, 1999 [33]
Morfina, codeína, 6AM, cocaína, metadona	MS	Agua: acetónitrilo	Spherisorb 5 RP8 (100 x 2,1 mm, 5 µm)	Cailleux, 1999 [34]
Morfina	MS	Agua: acetónitrilo: tetrahidrofurano: ácido fórmico (100:1:1:0,1)	LiChrospher 100 RP8 (125 x 3 mm, 5 µm)	Schänzle, 1999 [35]
Cocaína, BEG	MS	Acetonitrilo: tampón fosfato pH=4	Columna Advantage Basic (50 x 2 mm, 5 µm)	Jeanville, 2000 [36]
Cocaína	MS-MS	Acetonitrilo: formiato amónico pH=3	Columna C18 (30 x 2,1 mm, 5 µm)	Needham, 2000 [37]
Morfina, cocaína	Fluorescencia	Acetonitrilo: tampón fosfato pH=9,5 (20:80)	PLRP-S (150 x 4,6 mm, 5µm)	Tagliaro, 2000 [38]
Cocaína, BEG	UV	Acetonitrilo: agua: ácido trifluoro acético (28:72:0,1)	Columna cyano (250 x 4,6 mm, 5 µm)	Jamdar, 2000 [39]
Cocaína, BEG	MS	Ácido fórmico: formiato amónico: acetónitrilo: acetona	Allure basix (30 x 2,1 mm)	Jeanville, 2001 [40]
Morfina, codeína, MAM	MS	Acetato amónico pH 6: acetónitrilo (30:70)	Capcell Pak SCX (150 x 1,5 mm, 5 µm)	Katagi, 2001 [41]
Cocaína, BEG, cocaetileno	DAD	Acetato amónico: metanol: acetónitrilo (80:10:10)	Lichrospher 100 RP18 (250 x 4 mm, 5 µm)	Antonilli, 2001 [42]
Cocaína, BEG	UV	Metanol: tampón fosfato pH 7	Lichrospher RP18 (125 x 4 mm)	Buján, 2001 [43]
Cocaína, BEG, EME, ecgonina	MS	Acetato amónico-metanol-acetónitrilo	Zorbax Eclipse C8 (150 x 2,1 mm)	Klingmann, 2001 [44]
Opiáceos	DAD	Agua: metanol: trietilamina	Hypersil BDS Phenyl column (53 x 7 mm)	Dams, 2002 [45]

Analito	Detector	Fase móvil	Columna	Referencia
Drogas de abuso	UV	Ácido pentonosulfónico: tampón fosfato pH 2,9: acetonitrilo	Chromolith RP18 (100 x 4,6 mm)	Caufield, 2002 [46]
Opiáceos, cocaína y metabolitos	MS-MS	Formiato amónico: ácido fórmico: acetonitrilo	Synergy Polar RP (150 x 2 mm, 4 µm)	Dams, 2003 [47]
Drogas de abuso	DAD	Etil acetato: metanol: hidróxido amónico (85:10:5) Ciclohexano: tolueno: dtilamina (75:15:10) Etil acetato: diclorometano: metanol: hidróxido amónico (80:90:15:5)	Lichrospher 100 RP-8	Gioino, 2003 [48]
Morfina y glucuronidos de morfina	MS	Metanol: acetonitrilo: ac. fórmico pH3	Atlantis dC ₁₈ (150 x 2,1 mm, 5 µm)	Whittington, 2003 [49]
Morfina, codeína, BEG, cocaína, EDDP, metadona	DAD	Tampón fosfato pH 7.0: acetonitrilo	Lichrospher 100 NH ₂ (250 x 3 mm, 5 µm)	Conemans, 2004 [50]
Morfina, codeína, MAM cocaína, BEG, metadona	MS	Acetato amónico pH 4.6: acetonitrilo	Synergi Hydro RP (150 x 2 mm, 3 µm)	Maralíková, 2004 [51]
Cocaína y metabolitos	MS	Acetato amónico: acetonitrilo	Atlantis HILIC silica (150 x 2,1 mm)	Giroud, 2004 [52]
Cocaína, BEG	DAD	Acetonitrilo: metanol: tampón fosfato pH 3 (15:15:70)	Spherisorb RP18 (250 x 4,6 mm, 5 µm)	Brunetto, 2005 [53]
Opiáceos	MS-MS	Acetato amónico: Acetonitrilo: Metanol	Synergy Fusion RP (75 x 2 mm)	Murphy, 2005 [54]
Opiáceos	MS-MS	Acetonitrilo: tampón formiato amónico pH 4	Zorbax Bonus (150 x 4,6 mm 5 µm)	Rook 2005 [55]
Opiáceos y cocaína	DAD	Acetonitrilo: tampón fosfato pH=6,53	XTerra RP 8 (250 x 4,6 mm, 5 µm)	Fernández, 2005, 2006 [56,57]
Cocaína, BEG	MS-MS	Formiato amónico: ácido fórmico: acetonitrilo	Synergy Polar RP (150 x 2 mm, 4 µm)	Duer, 2006 [58]
Opiáceos	MS-MS	Acetonitrilo: tampón formiato amónico pH 3.5	Phenomenex C12 MAX- RP (150 x 2 mm 4 µm)	Musshoff, 2006 [59]
Drogas de abuso	MS-MS	Acetonitrilo: tampón formiato amónico pH 3	Atlantis C18 (200 x 2,1 mm)	Concheiro, 2007 [60]
Opiáceos	MS-MS	Acetonitrilo: tampón formiato amónico pH 3	Synergy Polar RP (150 x 2,0 mm, 4 µm)	Al-Asmari, 2007 [61]
Opiáceos	MS/MS	Acetonitrilo: tampón formiato amónico pH 3	Nova-Pack CN HP (100 x 3,9 mm, 4 µm)	Coles, 2007 [62]
Opiáceos, cocaína	DAD	Acetonitrilo: tampón fosfato pH=6,53	XTerra RP 8 (250 x 4,6 mm, 5 µm)	Fernández, 2007 [63]
Cocaína y metabolitos	MS	Acido formico: agua: acetonitrilo	Zorbax C18	Johansen, 2007 [64]
Opiáceos	UV MS	Acetonitrilo: ác. acético glacial: acetato amónico	C8	Dordević, 2007 [65]
Opiáceos	MS-MS	Acetonitrilo: Ácido fórmico	Luna C18 (100 x 2 mm, 3 µm)	Gustavsson, 2007 [66]
Morfina, efedrina, petidina	MS-MS	Trietilamina: Fosfato dihidrógeno potásico pH 3: acetonitrilo	Hypersil C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm)	Zhang, 2008 [67]

Analito	Detector	Fase móvil	Columna	Referencia
Cocaína y metabolitos	MS-MS	Acido fórmico 0,1%: Agua Acido fórmico 0,1%: Acetonitrilo	Gemini C6-Phenyl (50 x 3 mm, 5 µm)	Jagerdeo, 2008 [68]
Opiáceos	MS-MS	Acetonitrilo: fórmico: acetato amónico	Gemini C18 (100 x 2 mm, 3 µm)	Gergov, 2009 [69]
Opiáceos	MS-MS	Acetato amónico pH 6,8: metanol Acetato amónico pH 8: metanol 2-propanol: acido fórmico: metanol	High Purity C8 (150 x 3 mm)	Fox, 2009 [70]
Opiáceos, cocaína, BEG	MS-MS	Bicarbonato amónico pH 10,2: metanol	BEH C18 (50 x 2,1 mm, 1,7 µm)	Berg, 2009 [71]
Cocaína y metabolitos	MS-MS	Formiato amónico pH 2,7: metanol: acetonitrilo	XDB - C8 (50 x 2,1 mm, 1,8 µm)	Langman, 2009 [72]
Morfina, codeína, 6-AM, BEG	MS-MS	Formiato amónico 5 mM: Ácido. Fórmico 0,1% Acetonitrilo: Ácido fórmico 0,1%	Zorbax XDB-C ₁₈ (4,6 x 50 mm, 1,8 µm) (BEG) Zorbax XDB-C ₁₈ (4,6 x 50 mm, 3,5 µm) (Opiáceos)	Stout, 2009 [73]
Morfina y glucuronidos	MS	Formiato amónico: ac. fórmico pH 2,7 Acetonitrilo: formiato amónico: acido fórmico pH 3,8	Synergy Polar (150 x 2 mm)	Taylor, 2009 [74]
Drogas de abuso	MS-MS	Metanol: formiato amónico	Varian Pursuit 3 C18 (100 x 3 mm, 3 µm)	Björk, 2010 [75]

3. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Ganzler K, Salgó A, Valkó K. Microwave extraction. A novel sample preparation method for chromatography. J Chromatogr 371 (1986) 299-306.

[2] Ganzler K, Szinai I, Salgó A. Effective sample preparation method for extracting biologically active compounds from different matrices by a microwave technique. J Chromatogr 520 (1990) 257-262.

[3] Paré JRJ, Belanger JMR. Microwave assisted process (MAP): a new tool for the analytical laboratory. Trends in Analytical Chemistry 13 (1994) 176-184.

- [4] Croteau LG, Akhtar MH, Bélanger JMR, Paré JRJ. High performance liquid chromatography determination following microwave assisted extraction of 3-nitro-4-hydroxyphenylarsonic acid from swine liver, kidney and muscle. *J Liquid Chromatogr* 17(13) (1994) 2971-2981.
- [5] Franke M, Winek CL., Kingston HM. Extraction of selected drugs from serum using microwave irradiation. *Forensic Sci Int* 81 (1996) 51-59.
- [6] Eskilsson CS, Björklund E, Mathiasson L, Karlsson L, Tortensson A. Microwave assisted extraction of felodipine tablets. *J Chromatogr A* 840 (1999) 59-70.
- [7] Brachet A, Christen P, Veuthey JL. Focused microwave assisted extraction of cocaine and benzoylecgonine from coca leaves. *Phytochem Anal*, 13 (2002) 162-169.
- [8] Logan BK, Stafford DT, Tebbett IR, Moore CM. Rapid screening for 100 basic drugs and metabolites in urine using cation exchange solid-phase extraction and high-Performance Liquid Chromatography with diode array detection. *J Anal Toxicol* 14 (1990) 154-159.
- [9] Logan BK, Stafford DT. High-Performance Liquid Chromatography with Column Switching for the Determination of Cocaine and Benzoylecgonine Concentrations in Vitreous Humor. *J Forensic Sci* 35 (6) (1990) 1303-1309.
- [10] Sandberg JA, Olsen GD. Microassay for the simultaneous determination of cocaine, norcocaine, benzoylecgonine and benzoynorecgonine by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 525 (1990) 113-121.
- [11] Ferrara SD, Tedeschi L, Frison G, Castagna F. Solid-phase extraction and HPLC-UV confirmation of drugs of abuse in urine. *J Anal Toxicol* 16 (1992) 217-222.

- [12] Larsen AK, Tebbett IR. Direct analysis for cocaine in urine by high performance liquid chromatography (HPLC) using a column-switching technique. *J Forensic Sci* 37 (1992) 636-639.
- [13] Baliková M, Vercerková J. HPLC confirmation of cocaine and BEG in biological samples using photodiode-array detection after toxicological screening. *J Chromatogr B*. 656 (1994) 267-273.
- [14] Fernández P, Rodríguez P, Bermejo AM, López-Rivadulla M, Cruz A. Simultaneous Determination of Cocaine and Benzoylcegonine in Vitreous Humor by HPLC. *J Liquid Chromatogr* 17(4) (1994) 883-890.
- [15] Hill DW, K, Albert J. Reversed-phase solvent-gradient HPLC retention indexes of drugs. *J Anal Toxicol* 18 (1994) 233-242.
- [16] Li S, Gemperline PJ, Briley K, Kazmierczak S. Identification and quantitation of drugs of abuse in urine using the generalized rank annihilation method of curve resolution. *J Chromatogr B* 655 (1994) 213-223.
- [17] Low AS, Taylor RB. Analysis of common opiates and heroin metabolites in urine by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B* 663 (1995) 225-233.
- [18] Theodoridis G, Papadoyannis I, Tsoukali-Papadoulou H, Vasilikiotis G. A comparative study of different solid phase extraction procedures for the analysis of alkaloids of forensic interest in biological fluids by RP-HPLC/diode array. *J Liquid Chromatogr* 18(10) (1995) 1973-1995.
- [19] Lambert WE, Meyer E, De Leeheer AP. Systematic toxicological analysis of basic drugs by gradient elution of an alumina-based HPLC packing material under alkaline conditions. *J Anal Toxicol* 19 (1995) 73-78.

[20] Sukbuntherng J, Walters A, Chow H, Mayersohn M. Quantitative determination of cocaine, cocaethylene (ethylcocaine), and metabolites in plasma and urine by high-performance liquid chromatography. *J Pharm Sci* 84(7) (1995) 799-804.

[21] Tracqui A, Kintz P, Mangin P. Systematic toxicological analysis using HPLC/DAD. *J Forensic Sci* 40(2): 254-262 (1995).

[22] Grogg-Sulser K, Helmlin HJ, Clerc JT. Qualitative and quantitative determination of illicit heroin street samples by HPLC of reverse phase. Method by Cartagos. *J Chromatogr A* 692 (1995) 121-129.

[23] Koves EM. Use of high-performance liquid chromatography-diode array detection in forensic toxicology. *J Chromatogr* 692 (1995) 103-119.

[24] Aderjan R, Hofmann S, Schmitt G, Skopp G. Morphine and morphine glucuronides in serum of heroin consumers and in heroin-related deaths determined by HPLC with native fluorescence detection. *J Anal Toxicol* 19(3) (1995) 163-168.

[25] Clauwaert KM, Van Bocxlaer JF, Lambert WE, De Leenheer AP. Analysis of cocaine, BEG and cocaethylene in urine by HPLC with diode-array detection. *Anal Chem* 68 (1996) 3021-3028.

[26] Fernandez P, Lafuente N, Bermejo AM, Lopez-Rivadulla M, Cruz A. HPLC determination of cocaine and benzoylecgonine in plasma and urine from drug abusers. *J Anal Toxicol* 20 (1996) 224-228.

[27] Tatsuno M, Nishikawa M, Katagi M, Tsuchihashi H. Simultaneous determination of illicit drugs in human urine by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *J Anal Toxicol* 20 (1996) 281-286.

[28] Phillips DL, Tebbet IR, Bertholf, R. Comparison of HPLC and GC-MS for measurement of cocaine and metabolites in human urine. *J Anal Toxicol* 20 (1996) 305-308.

[29] Gaillard Y, Pepin G. Use of HPLC with PDA detector for the creation of a 600-compound library. Application to forensic toxicology. *J Chromatogr A* 763 (1997) 149-163.

[30] Elliot SP, Hale KA. Applications of an HPLC-DAD drugs screening system based on retention indices and UV spectra. *J Anal Toxicol* 22 (1998) 279-289.

[31] Angelo HR, Beck N, Kristensen K. Enantioselective high performance liquid chromatographic of methadone and its main metabolite in urine using an AGP and C8 column coupled serially. *J Chromatogr B* 724 (1999) 35-40.

[32] Foulon C, Menet MC, Manuel N, Pham-Huy C, Galons H, Claude JR, Guyon F. Rapid analysis of benzoilecgonine, cocaine and cocaethylene in urine, serum and saliva by isocratic high performance liquid chromatography with diode array detection. *Chromatographia*, 50 (11/12) (1999) 721-727.

[33] Cheng YF, Neue UD, Woods LL. Novel high performance liquid chromatography and solid-phase extraction methods for quantitating methadone and its metabolite in spiked human urine. *J Chromatogr B* 729 (1999) 19-31.

[34] Cailleux A, Le Bouil A, Auger B, Bonsergent G, Turcant A, Allain P. Determination of opiates and cocaine and its metabolites in biological fluids by high-performance liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry, *J Anal Toxicol* 23 (1999) 620-624.

[35] Schänzle G, Li S, Mikus G, Hofmann U. Rapid, highly sensitive method for the determination of morphine and its metabolites in body fluids by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B* 721 (1999) 55-65.

[36] Jeanville PM, Estapé ES, Needham SR, Cole MJ. Rapid confirmation/quantification of cocaine and benzoilecgonine in urine utilizing high performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *American Society for Mass Spectrometry* 11 (2000) 257-263.

[37] Needham SR, Jeanville PM, Brown PR, Estapé ES. Performance of a pentafluorophenylpropyl stationary phase for the electrospray ionization high performance liquid chromatography-mass spectrometry-mass spectrometry assay of cocaine and its metabolite ecgonine methyl ester in human urine. *J Chromatogr B* 748 (2000) 77-87.

[38] Tagliaro F, Valentini R, Manetto G, Crivellente F, Carli G, Marigo M. Hair analysis by using radioimmunoassay, high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis to investigate chronic exposure to heroin, cocaine and/or ecstasy in applicants for driving licenses. *Forensic Sci Int* 107 (2000) 121-128.

[39] Jamdar SC, Pantuck CB, Diaz J, Mets B. A rapid, sensitive assay for cocaine and its metabolites in biological fluids using solid phase extraction and high performance liquid chromatography. *J Anal Toxicol* 24 (2000) 438-441.

[40] Jeanville PM, Estapé ES, Torres Negrón I, Martí A. Rapid confirmation/quantitation of ecgonine methyl ester, benzoylecgonine, cocaine in urine using on-line extraction coupled with fast HPLC and tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 25 (2001) 69-75.

[41] Katagi M, Nishikawa M, Tatsuno M, Miki A, Tsuchihashi H. Column switching high performance liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry for identification of heroin metabolites in human urine. *J Chromatogr B* 751 (2001) 177-185.

[42] Antonilli L, Suriano C, Grassi MC, Nencini P. Analysis of cocaethylene, benzoylecgonine and cocaine in human urine by high performance thin layer chromatography with ultraviolet detection: a comparison with high performance liquid chromatography. *J Chromatogr B* 751 (2001) 19-27.

[43] Buján L, Fernández P, Lafuente N, Aldonza M, Bermejo AM. Comparison of two chromatographic methods for the determination of cocaine and its metabolites in blood and urine. *Anal Letters* 34 (13) (2001) 2263-2275.

[44] Klingmann A, Skopp G, Aderjan R. Analysis of Cocaine, Benzoyllecgonine, Ecgonine Methyl Ester, and Ecgonine by High-Pressure Liquid Chromatography- API Mass Spectrometry and Application to a Short-Term Degradation Study of Cocaine in Plasma. *J Anal Toxicol* 25 (2001) 425-430.

[45] Dams R, Benijts T, Lambert WE, De Leenheer AP. Simultaneous determination of in total 17 opium alkaloids and opioids in blood and urine by fast liquid chromatography-diode-array detection-fluorescence detection after solid-phase extraction. *J Chromatogr B* 773 (2002) 53-61.

[46] Caufield WV, Stewart JT. Rapid Determination of Selected Drugs of Abuse in Human Plasma Using a Monolithic Silica HPLC Column and Solid Phase Extraction *J Liquid Chromatogr & Related Technol* 25 (19) (2002) 2977-2998.

[47] Dams R, Murphy CM, Lambert WE, Huestis MA. Urine drug testing for opioids, cocaine and metabolites by direct injection liquid chromatography /tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*; 17 (2003) 1665-70.

[48] Gioino G, Hansen C, Pacchioni A, Rocca F, Molina Barrios, Brocca E, Cancela LM. Use of High-Performance Liquid Chromatography With Diode-Array Detection After a Primary Drug Screening in Patients Admitted to the Emergency Department. *Therapeutic Drug Monitoring* 25 (2003) 99-106.

[49] Whittington D, Kharasch ED. Determination of morphine and morphine glucuronides in human plasma by 96-well plate solid-phase extraction and liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 796 (2003) 95-103.

[50] Conemans JMH, Van Der Burgt HAAM, Van Rooij JML, Pijnenburg CC. The simultaneous determination of illicit drugs with HPLC-DAD. *Bulletin of TIAFT* 34 (2004) 11-13.

[51] Maralíková B, Weinmann W. Confirmatory analysis for drugs of abuse in plasma and urine by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry with respect to criteria for compound identification. *J Chromatogr B* 811 (2004) 21-30.

[52] Giroud C, Michaud K, Sporkert F, Eap C, Augsburger M, Cardini P, Mangin P. A fatal overdose of cocaine associated with coingestion of marijuana, buprenorphine, and fluoxetine. Body fluid and tissue distribution of cocaine and its metabolites determined by Hydro Interaction Chromatography- Mass Spectrometry (HILIC-MS). *J Anal Toxicol* 28 (2004) 464-474.

[53] Brunetto MR, Delgado Cayama Y, Gutiérrez García L, Galignani M, Obando MA. Determination of cocaine and benzoylecgonine by direct injection of human urine into a column switching liquid chromatography system with diode array detection. *J Pharm Biomed Anal* 37 (2005) 115-120.

[54] Murphy CM, Huestis MA. LC-ESI-MS/MS analysis for the quantification of morphine, codeine, morphine-3- β -D-glucuronide, morphine-6- β -D-glucuronide, and codeine-6- β -D-glucuronide in human urine. *J Mass Spectrom* 40 (2005) 1412-1416.

[55] Rook EJ, Hillebrand MJX, Rosing H, Van Ree J, Beijnen JH. The quantitative analysis of heroin, methadone and their metabolites and the simultaneous detection of cocaine, acetylcodeine and their metabolites in human plasma by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B* 824 (2005) 213-221.

[56] Fernández P, Vázquez C, Morales L, Bermejo AM. Analysis of opiates, cocaine and metabolites in urine by high-performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD). *J Appl Toxicol* 25 (2005) 200-204.

[57] Fernández P, Morales L, Vázquez C, Bermejo AM, Tabernero MJ. HPLC-DAD determination of opioids, cocaine and their metabolites in plasma. *Forensic Sci Int* 161(1) (2006) 31-35.

[58] Duer WC, Spitz DJ, McFarland S. Relationships Between Concentrations of Cocaine and Its Hydrolysates in Peripheral Blood, Heart Blood, Vitreous Humor and Urine. *J. Forensic Sci*, 51,(2) (2006) 421-25.

[59] Musshoff F, Trafkowski J, Kuepper U, Madea B. An automated and fully validated LC-MS/MS procedure for the simultaneous determination of 11 opioids used in palliative care, with 5 of their metabolites. *J Mass Spectrom* 46 (2006) 633-640.

[60] Concheiro M, De Castro A, Quintela O, Cruz A, López-Rivadulla M. Determination of illicit Drugs and their Metabolites in Human Urine by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Including Relative Ion Intensity Criterion. *J Anal Toxicol* 31 (2007) 573-580.

[61] Al-Asmari AI, Anderson RA. Method for Quantification of Opioids and their Metabolites in Autopsy Blood by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J Anal Toxicol* 31 (2007) 394-408.

[62] Coles R, Kushnir MM, Nelson GJ, McMillin GA, Urry FM. Simultaneous Determination of Codeine, Morphine, Hydrocodone, Hydromorphone, Oxycodone, and 6-Acetylmorphine in Urine, Serum, Plasma, Whole Blood, and Meconium by LC-MS-MS. *J. Anal Toxicol* 31 (2007) 1-14.

[63] Fernández P, Lago M, Lorenzo RA, Carro AM, Bermejo AM, Tabernero MJ. Microwave-assisted extraction of drugs of abuse from human urine. *J Appl Toxicol* 27 (2007) 373-379.

[64] Johansen SS, Bhatia HM. Quantitative analysis of cocaine and its metabolites in whole blood and urine by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 852 (2007) 338-344.

[65] Dordević S, Kilibarda V. Analytical confirmation of lethal heroin overdose by the use of liquid chromatography methods. *Vojnosanit Pregl.* 64(11) (2007) 739-43.

[66] Gustavsson E, Andersson M, Stephanson N, Beck O. Validation of direct injection electrospray LC-MS/MS for confirmation of opiates in urine drug testing. *J Mass Spectrom* 42 (2007) 881-889.

[67] Zhaohui Zhang, Chenggong Zhang, Xiaoli Su, Ming Ma, Bo Chen, Shouzhao Yao. Carrier-mediated liquid phase microextraction coupled with high performance liquid chromatography for determination of illicit drugs in human urine. *Anal Chim Acta* 621 (2008) 185-192.

[68] Jagerdeo E, Montgomery MA, Sibum M, Sasaki TA, LeBeau MA. Rapid analysis of cocaine and metabolites in urine using a completely automated solid-phase extraction-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method. *J Anal Toxicol* 32(8) (2008) 570-576.

[69] Gergov M, Nokua P, Vuori E, Ojanperä I. Simultaneous screening and quantification of 25 opioid drugs in post-mortem blood and urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Forensic Sci Int* 189 (2009) 36-43.

[70] Fox EJ, Twigger S, Allen KR. Criteria for opiate identification using liquid chromatography linked to tandem mass spectrometry: problems in routine practice. *Ann Clin Biochem* 46 (2009) 50-57.

[71] Berg T, Lundanes E, Christophersen AS, Strand DH. Determination of opiates and cocaine in urine by high pH mobile phase reversed phase UPL-MS/MS. *J. Chromatogr. B* 877 (2009) 421-432.

[72] Langman LJ, Bjergum MW, Williamson CL, Crow FW. Sensitive method for detection of cocaine and associated analytes by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in urine. *J Anal Toxicol* 33(8) (2009) 447-55.

[73] Stout PR, Bynum ND, Mitchell JM, Baylor MR, Roper-Miller JD. A comparison of the validity of gas chromatography- mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of urine samples for morphine, codeine, 6-acetylmorphine, and benzoyllecgonine. *J Anal Toxicol.* 33(8) (2009) 398-408.

[74] Taylor K, Elliott S. A validated hybrid quadrupole linear ion-trap LC-MS method for the analysis of morphine and morphine glucuronides applied to opiate deaths. *Forensic Sci Int* 187 (2009) 34-41.

[75] Bjørk MK, Nielsen MK, Markussen LØ, Klinker HB, Linnet K Determination of 19 drugs of abuse and metabolites in whole blood by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2010 396(7) (2010) 2393-401.

Capítulo

7

Justificación y objetivos

Justificación y Objetivos

El número de intoxicaciones agudas y crónicas atribuidas a los opiáceos y/o a la cocaína, constituyen un grave problema social y sanitario. Así, según el informe 2009 del Observatorio Español sobre Drogas [1], la cocaína, después del cannabis, es la droga ilegal de mayor consumo en España, mientras que la heroína ha sido la responsable de la mayoría de los problemas graves relacionados con las drogas ilegales detectadas en nuestro país. Sin embargo, desde la década de los noventa ha disminuido de forma significativa tanto el consumo como los problemas asociados a la heroína, ralentizándose este descenso a partir de 2004-2006.

Se muestran a continuación una serie de artículos aparecidos en la prensa nacional y autonómica que no hacen sino corroborar estos datos de consumo y justifican la actualidad del presente estudio en este campo:

- EL PERIODICO, (26.06.10) [2]. Ligeramente repunte del consumo de heroína: Sanidad lo atribuye a la ignorancia de sus daños y al bajón de precios.
- EUROPA PRESS, (25.06.10) [3]. Alrededor de 6.000 personas demandan tratamientos por consumo de drogas en C-LM (Castilla la Mancha), según SAFA (asociación de ayuda al drogodependiente): Alerta del incremento del consumo de alcohol y heroína.
- LA VOZ DE GALICIA, (17.02.10) [4]. El consumo de heroína deja de ser marginal al perderle el miedo los jóvenes.
- LA VANGUARDIA, (26/06/2007) [5]. España ya es el país donde se consume más cocaína.

Todos estos aspectos han contribuido a la optimización de nuevos métodos analíticos sensibles, precisos y específicos para la determinación de estas drogas y sus metabolitos en las distintas matrices biológicas. Su aplicación será de gran

trascendencia para futuros estudios epidemiológicos y para el diagnóstico clínico de las intoxicaciones.

En este trabajo de investigación se ha aplicado la cromatografía líquida de alta resolución al estudio de morfina, codeína, 6-acetilmorfina, cocaína, benzoilecgonina, cocaetileno, metadona y EDDP, en dos fluidos biológicos: orina y humor vítreo.

La orina es la matriz utilizada rutinariamente para realizar el cribado inicial en toxicología forense y control antidoping, ya que contiene elevadas concentraciones de las drogas y es una muestra fácil de recoger, aunque hay que destacar su relativa dificultad para detectar estas drogas en orina cuando han transcurrido más de 48-72 horas desde su administración. Tanto los opiáceos como la cocaína se metabolizan rápidamente en el organismo, excretándose en su forma inalterada sólo un pequeño porcentaje de la dosis. De ahí, la importancia de la investigación analítica conjunta de cada droga y sus principales metabolitos en orina como indicadores de un consumo reciente (3 ó 4 días).

La sangre es la muestra en la que mejor se correlacionan los niveles hallados con el efecto farmacológico y/o toxicológico, permitiendo emitir un juicio clínico fiable. Sin embargo, en situaciones en las que esta muestra no está disponible, es donde el humor vítreo juega un papel importante en toxicología forense porque presenta las siguientes ventajas: es poco susceptible a la contaminación e invasión bacteriana, posee una gran estabilidad postmortem y además se trata de una muestra relativamente sencilla de analizar. En muy pocas ocasiones se informa de determinaciones cuantitativas de drogas en humor vítreo y probablemente sea debido a la dificultad de interpretar los resultados. El incremento de muertes por cocaína conduce al uso de análisis de humor vítreo como indicador de uso reciente de la droga [6].

Para el estudio toxicológico de estos ocho compuestos se ha seleccionado como técnica analítica la cromatografía líquida de alta resolución, de gran especificidad y selectividad, que incluye un proceso previo de preparación de la muestra con el fin de optimizar la recuperación de los distintos compuestos. Se lleva a cabo un proceso de extracción en fase sólida (SPE) y extracción asistida por microondas (MAE), ésta última poco utilizada en el campo de la toxicología forense pero muy extendida en el tratamiento de otras matrices con buenos resultados.

Por todo lo referido anteriormente, los objetivos de esta tesis doctoral han sido:

1. Desarrollar un método de cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de red de diodos (HPLC-DAD) para la determinación de drogas de abuso en orina y humor vítreo.
2. Optimizar sendos procedimientos de extracción (SPE y MAE) para morfina, codeína, 6-acetilmorfina, metadona, EDDP, cocaína, benzoilecgonina y cocaetileno a partir de orina y humor vítreo, aplicando sendos diseños experimentales para estudiar la influencia de diferentes variables sobre la purificación de la muestra, el tiempo invertido y la recuperación de los analitos, en el caso de la MAE.
3. Aplicar los dos métodos de extracción (SPE, MAE) y la HPLC-DAD, previamente optimizados, al análisis de muestras de orina y humor vítreo, procedentes de sujetos intoxicados con opiáceos y/o cocaína.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Observatorio Español sobre Drogas (OED). Informe 2009. Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas. <http://www..unad.org/>

[2]<http://www.elperiodico.com/es/noticias/sociedad/20100626/ligero-repunte-del-consumo-heroina/348966.shtml>

[3] <http://www.20minutos.es/noticia/747788/0/>

[4] <http://www.pnsd.msc.es/Categoria2/noticias/A2010/feb2010.htm>

[5] <http://www.lavananguardia.es/ciudadanos/noticias/20070626/51366642757>

[6] Drummer OH, Odell M. The forensic pharmacology of drugs of abuse. Arnold, London, 2001.

Capítulo

8

**Material y
métodos**

CAPÍTULO 8. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Instrumentación
2. Material de laboratorio
3. Reactivos
4. Preparación de disoluciones
5. Condiciones cromatográficas
6. Recogida de las muestras biológicas
7. Preparación de muestras de orina
8. Preparación de muestras de humor vítreo
9. Validación analítica del método
 - 9.1. Linealidad y análisis de regresión
 - 9.2. Límites de detección y cuantificación
 - 9.3. Selectividad
 - 9.4. Precisión y exactitud
 - 9.5. Recuperación
10. Referencias bibliográficas

1. INSTRUMENTACIÓN

- Sistema de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (Waters Alliance 2695).
- Detector de red de diodos (Waters, Modelo 996).
- Soporte Informático: ordenador Compaq Professional con sistema operativo Windows NT. El software de manejo y comunicación con el equipo cromatográfico se corresponde con el Millenium 3.20[®] (Waters Corporation).
- Sistema de extracción en fase sólida con aplicación de vacío: Manifold (Waters)
- Sistema de Extracción asistida por Microondas: ETHOS PLUS MPR-300/12S de media presión (Milestone)
- Vortex Reax 2000 (Heidolph).
- Pipetas automáticas (Gilson y Eppendorf).
- Agitador rotatorio Orbit (Selecta)
- Centrífuga de sobremesa Minispin plus (Eppendorf).
- Centrífuga de sobremesa Mixtasel (Selecta).
- Termostato de bloque metálico, con suministro múltiple de Nitrógeno (VLM EC1)
- Balanza analítica digital BP61S (Sartorius).
- Balanza de precisión S-2000 (Bosch)
- pHmetro digital Basic 20 (Crison)
- Agitador magnético HI 190M (Hanna Instruments[®])
- Agitador magnético ARE (Velp Científica[®])
- Sistema de purificación de agua Milli-Q (Millipore)
- Baño de ultrasonidos (Selecta)
- Bomba de vacío (Waters-Millipore[®])
- Equipo de filtración (Waters-Millipore[®])



Figura 33. Sistema HPLC-DAD empleado para la realización del trabajo

2. MATERIAL DE LABORATORIO

- Tubos de vidrio de fondo cónico de 10 mL (Kimble).
- Tubos de vidrio de fondo redondo de 12 mL (Pyrex)
- Matraces aforados de 5, 10, 20, 50 y 1000 mL
- Pipetas Pasteur
- Probetas de 5, 10, 100, 500 y 1000 mL
- Vasos de precipitados
- Papel de filtro
- Varillas de vidrio
- Filtros HV 0,45 μm (Waters-Millipore)
- Embudos de vidrio
- Frascos de cristal ámbar de 10 mL

3. REACTIVOS

- Sustancias Patron (Cerilliant[®]):
 - * Cocaína, Benzoilecgonina (BEG) y Cocaetileno
 - * Morfina, Codeína y 6-acetilmorfina (6AM)
 - * Metadona y 2-etilen-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina (EDDP)
- Cartuchos de extracción Bond-Elut Certify 130 mg, 3ml (Varian[®])
- Orina y Humor vítreo exentos de drogas

- Agua Milli-Q
- Acetonitrilo grado LiChrosolv gradiente (Merck®)
- Metanol grado LiChrosolv (Merck®)
- Cloroformo grado Lichrosolv (Merck®)
- Isopropanol grado Lichrosolv (Merck®)
- Hidróxido amónico 25% (Merck®)
- Ácido clorhídrico (Merck®)
- Ácido fosfórico (Merck®)
- Fosfato monopotásico (Merck®)
- Fosfato dipotásico (Merck®)
- Fosfato disódico (Merck®)
- Hidróxido sódico (Merck®)
- Sulfato sódico anhidro (Merck®)

4. PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES

- Tampón fosfato 0,02M pH 6,53: en un matraz aforado de 1 L, se añade 2,72 gramos de fosfato monopotásico. Se ajustó el pH con hidróxido sódico ó ácido fosfórico.
- Fase móvil: tampón fosfato 0,02M pH 6.53 y acetonitrilo en proporción 90:10.
- HCl 0,1N: se obtiene llevando 13 mL de ClH 25% a 1000 mL de agua Milli-Q
- Amoníaco 0,3N: se obtiene llevando 1,12 mL de amoníaco al 25% (Merck) a 50 mL de agua Milli-Q
- Tampón fosfato 0,1M, pH 6: se obtiene mezclando 445 mL de fosfato monopotásico (13,61 g/L) y 55 mL de fosfato disódico (14,20 g/L)
- Cloroformo-Isopropanol en la proporción 4:1, v/v.
- Disoluciones patrón de 1 mg/mL de cada una de las drogas en estudio. Para ello se pesaron 10 mg de cada una de las sustancias y se llevaron a 10 mL de metanol (morfina, codeína, benzoilecgonina, metadona y EDDP) o acetonitrilo (cocaína, cocaetileno y 6AM) en matraz aforado.
- Disoluciones-mezcla, se preparan a partir de las disoluciones patrón, diluyendo 1:5 (concentración 200 µg/mL), 1:10 (concentración 100 µg/mL), 1:20

(concentración 50 µg/mL), 1:100 (concentración 10 µg/mL), 1:200 (concentración 5 µg/mL) y 1:1000 (concentración 1 µg/mL) en fase móvil.

- Disoluciones para calibración en orina, se preparan de la manera indicada en la tabla 6.
- Disoluciones para calibración en humor vítreo, se preparan de la manera indicada en la tabla 7.
- Todas las disoluciones se almacenaron protegidas de la luz, bajo condiciones de refrigeración.

Tabla 6. Preparación de las disoluciones para el calibrado en orina.

Concentración (µg/mL)	Volumen de disolución-mezcla (µL)	Volumen final (µL)	Concentración final (µg/mL)
0,2	40 (5 µg/mL)	1000	1
0,4	40 (10 µg/mL)	1000	2
1,0	20 (50 µg/mL)	1000	5
2,0	40 (50 µg/mL)	1000	10
4,0	40 (100 µg/mL)	1000	20
10,0	50 (200 µg/mL)	1000	50

Tabla 7. Preparación de las disoluciones para el calibrado en humor vítreo

Concentración (µg/mL)	Volumen de disolución-mezcla (µL)	Volumen final (µL)	Concentración final (µg/mL)
0,1	10 (5 µg/mL)	500	0,5
0,2	20 (5 µg/mL)	500	1
0,4	20 (10 µg/mL)	500	2
1,0	50 (10 µg/mL)	500	5
2,0	20 (50 µg/mL)	500	10
4,0	40 (50 µg/mL)	500	20

5. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

El análisis cromatográfico fue realizado en fase reversa, con una columna XTerra® C8 (250 x 4,6 mm, 5 µm de tamaño de partícula) que favorece la retención de compuestos polares y permite trabajar con fases móviles de alto contenido acuoso. La fase móvil utilizada ha sido una mezcla de tampón fosfato monopotásico 0,02M, pH 6,53 y acetonitrilo, trabajando en modo gradiente.

Se desarrollaron métodos cromatográficos ligeramente diferentes para la orina y el humor vítreo, con el fin de eliminar ciertas interferencias presentes según la matriz biológica estudiada y el procedimiento de extracción utilizado. Los gradientes usados aparecen reflejados en las tablas 8, 9 y 10. El tiempo total de análisis fue de 22 minutos para la orina y 30 minutos para el humor vítreo. La presión del equipo oscila entre 8 psi y 4000 psi.

Tabla 8. Gradiente utilizado en orina (SPE)

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	Acetonitrilo (%)	Tampón fosfato (%)
0	0,7	10	90
5	0,7	15	85
7	0,8	20	80
10	0,8	35	65
15	0,8	50	50
20	0,8	50	50
22	0,7	10	90

Tabla 9. Gradiente utilizado en humor vítreo (SPE)

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	Acetonitrilo (%)	Agua Milli-Q (%)	Tampón fosfato (%)
Inicio	0,7	5	0	95
5	0,8	5	0	95
7	0,8	10	0	90
10	0,8	15	0	85
16	0,8	15	0	85
17	0,8	30	0	70
20	0,8	50	0	50
25	0,8	50	0	50
27	0,8	80	20	0
30	0,7	5	0	95

Tabla 10. Gradiente utilizado en humor vítreo (MAE)

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	Acetonitrilo (%)	Agua Milli-Q (%)	Tampón fosfato (%)
0	0,7	2	0	98
6	0,7	5	0	95
7	0,8	5	0	95
10	0,8	15	0	85
15	0,8	40	0	60
20	0,8	50	0	50
24	0,8	50	0	50
25	0,8	80	20	0
30	0,7	2	0	98

El detector es un espectrofotómetro de red de diodos Waters 996® y proporciona un espectro de absorción que abarca desde 190 a 800 nm en la región ultravioleta-visible del espectro electromagnético. En este trabajo es suficiente un registro de 200 a 400 nm. A la vista de los espectros de absorción de las drogas en estudio se seleccionaron las longitudes de onda en las cuales la absorbancia es máxima para

las distintas drogas, obteniendo así un aumento sustancial en la sensibilidad del método, y tres cromatogramas para cada inyección: a 233 nm para cocaína, benzoilecgonina y cocaetileno; a 285 nm para morfina, codeína y 6-acetilmorfina; y a 292 nm para metadona y 2-etilen-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina ó EDDP (Tabla 11).

Tabla 11. Longitudes de onda de trabajo para cada compuesto

COMPUESTO	λ (nm)
MRF	285,0
COD	285,0
6AM	285,0
BEG	233,0
COC	233,0
CET	233,0
EDDP	292,0
MTD	292,0

6. RECOGIDA DE LAS MUESTRAS BIOLÓGICAS

Las muestras que llegan al laboratorio de Toxicología son adecuadamente identificadas y almacenadas a 4°C, si el análisis va a realizarse en los 2 ó 3 días siguientes, o congeladas a -18°C en caso contrario. Se ha utilizado orina y humor vítreo blanco, libres de drogas, procedentes de sujetos no consumidores

Se preparan disoluciones en orina de las drogas en estudio para obtener los patrones de concentraciones: 0,1; 0,2; 0,4; 1,0; 2,0; 4,0 y 10 µg/mL.

En el caso del humor vítreo previamente se procede a una ultracentrifugación durante 10 minutos a 14000 rpm para separar compuestos que pudiesen ser co-extraídos. Posteriormente se añaden las drogas de abuso al humor vítreo blanco para obtener los patrones de concentraciones 0,1; 0,2; 0,4; 1,0; 2,0; 4,0 y 10 µg/mL; se añade 1 mL de acetonitrilo y se ultracentrifuga nuevamente durante 10 minutos a 14000 rpm para precipitar las proteínas que pueden provocar interferencias en el análisis cromatográfico.

7. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE ORINA

7.1. EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPE)

La extracción de las drogas y sus metabolitos (MRF, COD, 6AM, BEG, COC, CET, MTD y EDDP) fue realizada utilizando cartuchos Bond Elut Certify de 3 mL, 130 mg, de acuerdo con el siguiente esquema:

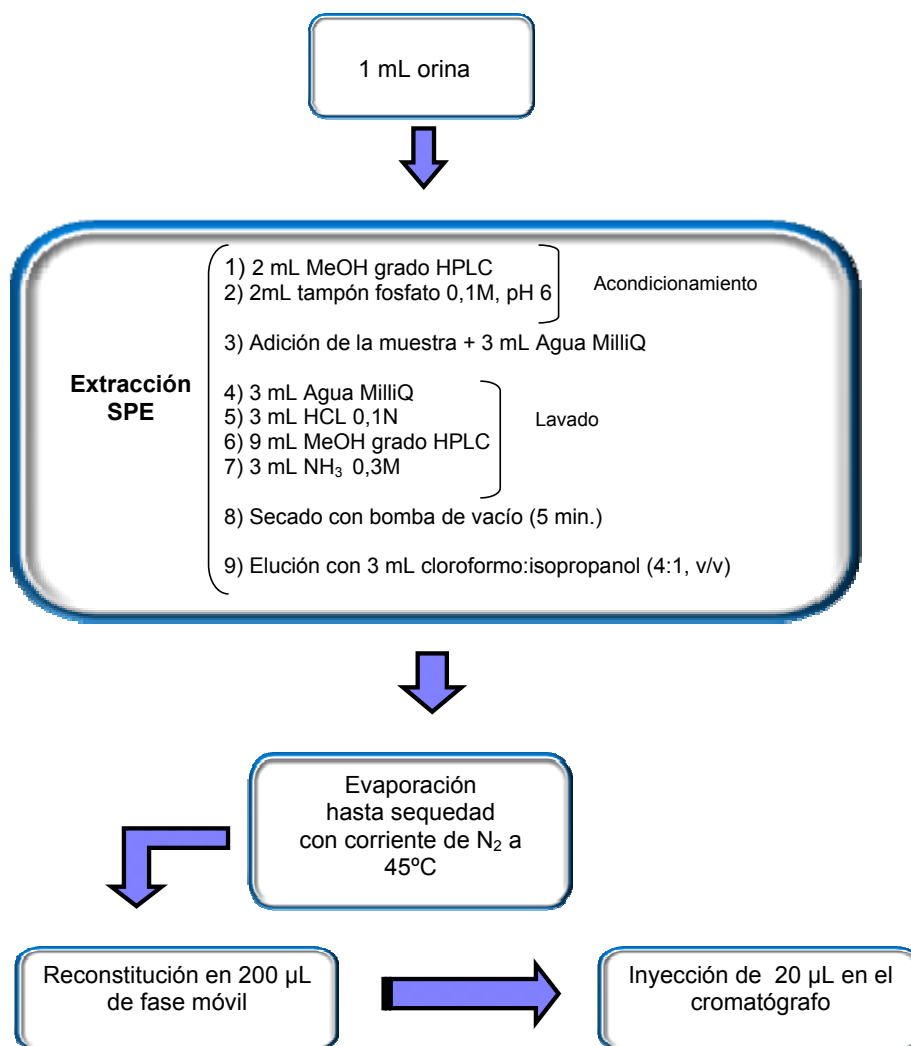


Figura 34. Esquema de la SPE para la orina

7.2. EXTRACCIÓN ASISTIDA POR MICROONDAS (MAE)

A 1 mL de orina se le añaden 10 mL de cloroformo para proceder a la extracción asistida por microondas, en las siguientes condiciones: 100°C, 10 minutos con agitación magnética. Finalizada la extracción se centrifuga a 4000 r.p.m. durante 20 minutos para separar la fase orgánica de la fase acuosa, se separa la fase orgánica y se evapora a sequedad con corriente de nitrógeno en un baño termostático a 40°C. A continuación el extracto seco se reconstituye en 100 μ L de fase móvil y finalmente se inyectan 20 μ L en el cromatógrafo (Figura 35)

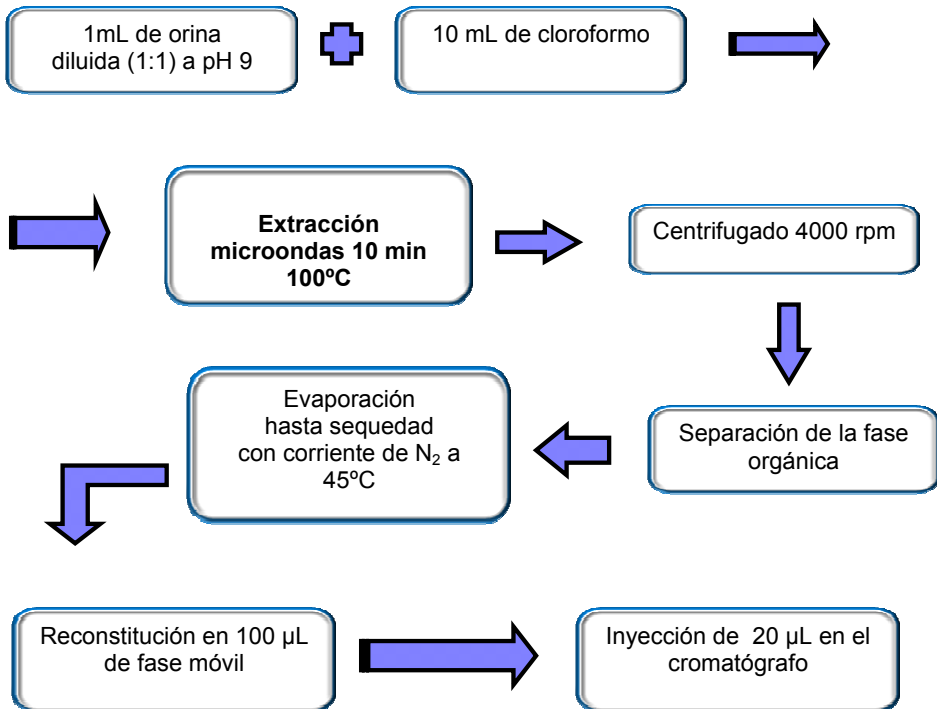


Figura 35. Esquema de la MAE para la orina

8. PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE HUMOR VÍTREO

8.1. EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPE)

Los pasos previos a la propia extracción incluyen un ultracentrifugado del humor vítreo durante 10 min a 14000 rpm para separar componentes endógenos que pudiesen ser coextraídos, la adición de las drogas objeto de estudio (si no es el caso de una muestra real) y un nuevo ultracentrifugado, previa adición de 1 mL de acetonitrilo, para precipitar las proteínas presentes en el humor vítreo que podrían provocar interferencias en el análisis cromatográfico posterior. Se han usado cartuchos Oasis HLB de 3 cc, siguiendo el protocolo indicado en la Figura 36.

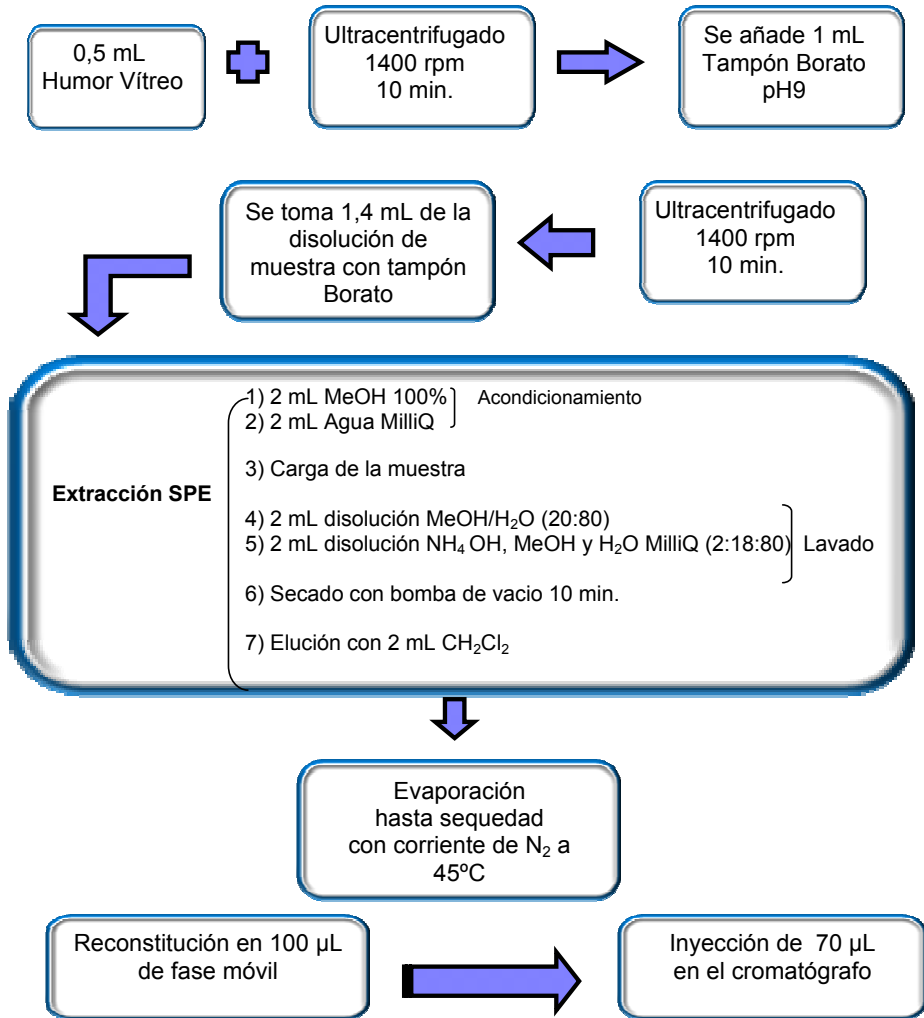


Figura 36. Esquema de la SPE para el humor vítreo

8.2. EXTRACCIÓN ASISTIDA POR MICROONDAS (MAE)

Se parte de 0,5 mL humor vítreo + 1 mL acetonitrilo y se añaden 2 mL de agua ya directamente en el vaso de extracción. Se agita y se añaden 15 mL de diclorometano, realizando la extracción en las siguientes condiciones: 80°C, 8 minutos y agitación magnética. Una vez finalizada la extracción el contenido del vaso se centrifuga a 4000 rpm durante 10 minutos y la fase orgánica se evapora a sequedad con corriente de nitrógeno en un baño termostático a 45°C. El extracto seco se reconstituye en 100 µL de fase móvil, logrando una concentración 5 veces superior a la inicial. Finalmente se inyectan 20 µL en el cromatógrafo. El esquema del proceso de extracción se muestra en la Figura 37.

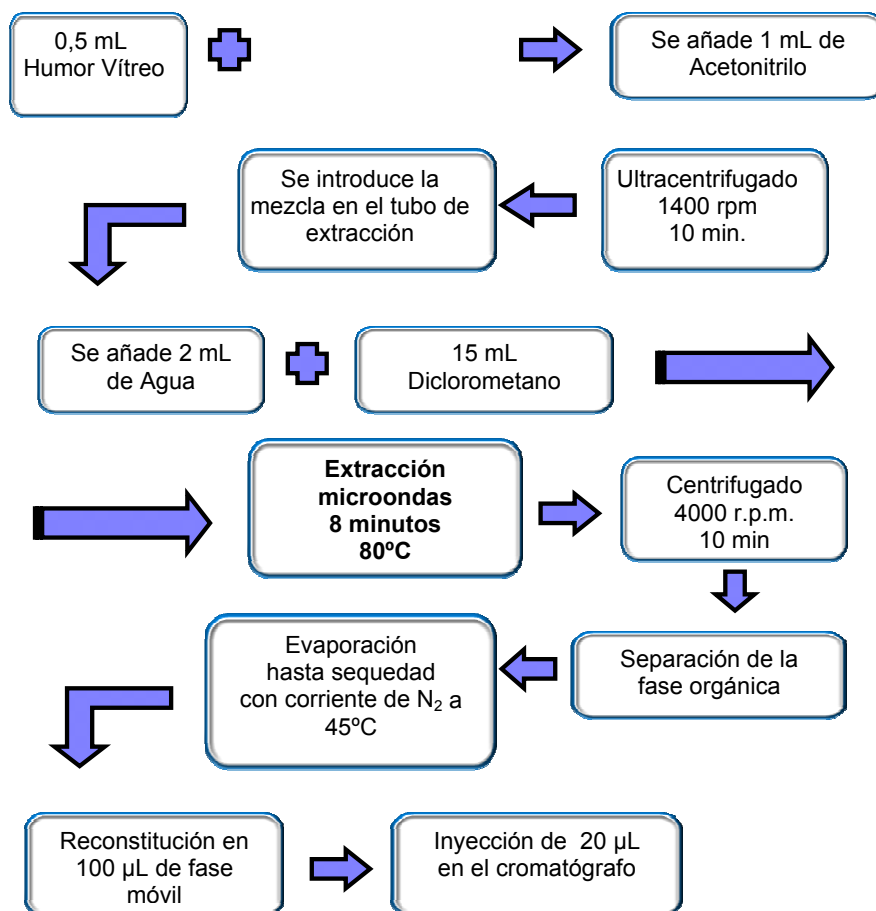


Figura 37. Esquema de la MAE para el humor vítreo

9. VALIDACIÓN ANALÍTICA DEL MÉTODO

La validación de un método requiere demostrar que el análisis cuantitativo de los compuestos en una matriz biológica es fiable dentro de un margen de error determinado y adecuado para la resolución de problemas analíticos. Solamente los métodos validados permiten asegurar como ciertos los resultados obtenidos.

Los criterios seguidos en este trabajo son los recomendados por organizaciones como la FDA (Food and Drug Administration) [1] o la ICH (International Conference of Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) [2,3], que promueven recomendaciones y guías para la comunidad científica en general, y para la industria farmacéutica, en particular [4,5]. Para la realización de la validación es necesaria la determinación de los parámetros:

- Linealidad y análisis de regresión.
- Límites de detección y cuantificación.
- Selectividad.
- Precisión y exactitud
- Recuperación

9.1. LINEALIDAD Y ANÁLISIS DE REGRESIÓN

La linealidad de un método analítico se define como la capacidad de éste para obtener respuestas linealmente proporcionales a la concentración de analito en un intervalo determinado. El estudio de la linealidad requiere la realización de curvas de calibrado, que han de ser realizadas para cada uno de los analitos en el medio de interés. Es necesario utilizar un número de puntos suficiente para definir de forma adecuada la relación entre la concentración y la respuesta. Las concentraciones estándar son elegidas en base al rango de concentraciones esperado en cada situación particular. La curva de calibrado debe contener una muestra cero (matriz sin droga), y de seis a ocho muestras que cubran el rango esperado, incluyendo el límite inferior de cuantificación (LLOQ, Low Limit of Quantitation).

Las curvas de calibrado se obtienen mediante la representación gráfica de las áreas de los picos cromatográficos obtenidos frente a la concentración conocida del

analito. Los datos obtenidos del estudio de la linealidad permiten realizar un análisis de regresión mediante el cual se ajustan a un modelo lineal del tipo $Y = AX + B$, donde A es la pendiente de la recta de regresión y B es la ordenada en el origen. También se puede obtener el coeficiente de correlación, R, que muestra el grado de relación entre las variables X e Y, al igual que el coeficiente de determinación, R^2 , que indica la calidad del ajuste de los puntos a una recta, cuyos valores oscilan entre 0 (no ajuste) y 1 (ajuste total); de este modo, cuánto más se acerque a 1 dicho parámetro, más se aproximará la distribución de los puntos a una recta.

9.2. LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

El límite de detección (LOD) se define como la menor cantidad de analito que puede detectarse con seguridad diferenciándose estadísticamente de un blanco y que no tiene que ser cuantificada como un valor exacto. Se calcula realizando replicados de muestras blanco, empleando un mínimo de cinco determinaciones y utilizando las ecuaciones:

$$\text{LOD:} \quad S/R = 3; \quad Y_{\text{LOD}} = 3Y_b$$

donde S/R es la relación señal-ruido e Y_b representa la señal de un blanco cuyos picos definen el ruido medio estimado para cada compuesto. A continuación, sustituyendo la señal en la ecuación de la recta de calibrado, se obtiene el límite de detección (X_{LOD}):

$$Y_{\text{LOD}} = aX_{\text{LOD}} + b \quad X_{\text{LOD}} = Y_{\text{LOD}} - b / a$$

El límite inferior de cuantificación (LLOQ) se define como la concentración más baja de un analito que puede ser medida con certeza y es estadísticamente aceptable. Normalmente se acepta como límite inferior de cuantificación el estándar más bajo de la curva de calibrado, si cumple las siguientes condiciones: la respuesta del analito en el LLOQ es por lo menos cinco veces superior a la respuesta del blanco y el pico del analito debe ser identificable y reproducible con una precisión de 20% y una exactitud de $\pm 20\%$.

9.3. SELECTIVIDAD

La selectividad es la capacidad de un método analítico para distinguir y cuantificar el analito en presencia de otros componentes en la muestra. Existen diferentes métodos para validar la selectividad. Karnes et al [6] consideran que el método más simple cuando hablamos de análisis cromatográficos es demostrar la ausencia de respuesta en una muestra blanco. Para confirmar que el método analítico es selectivo se debe realizar el análisis de al menos cinco muestras blanco de diferente procedencia y se examinarán con cuidado sus cromatogramas a los tiempos de retención de los analitos de interés [7].

Las interferencias pueden deberse a componentes endógenos presentes en las matrices biológicas, o a otras drogas o fármacos consumidas por el individuo.

La evaluación de la selectividad se realizó analizando orina y humor vítreo, procedentes de seis sujetos diferentes que no habían consumido las sustancias estudiadas (muestras blanco), y se comprobó que no existían interferencias con el método analítico.

9.4. PRECISIÓN Y EXACTITUD

Según la ICH [2,3], la precisión de un método analítico determina la proximidad entre los valores obtenidos para una serie de muestras procedentes de la misma muestra madre, y analizadas bajo las mismas condiciones. La precisión debe evaluarse analizando, al menos, 5 replicados de una concentración el mismo día de análisis (precisión intradía o repetibilidad) o en días distintos (precisión interdía o reproducibilidad), y debe estudiarse, como mínimo, a dos niveles de concentración de la recta de calibrado (bajo y alto).

El coeficiente de variación (CV) es un parámetro útil para determinar la precisión de una serie de medidas. También es conocido como desviación estándar relativa (RSD) y viene determinado por la fórmula:

$$CV = \left(\frac{s}{x} \right) \times 100$$

El coeficiente de variación calculado para cada nivel de concentración no debe exceder del 15%, excepto para el LLOQ donde ha de ser menor de un 20%.

La exactitud analítica de un método es la medida de la concordancia entre el valor obtenido en una medida y su valor real o asignado. La exactitud debe ser calculada para un mínimo de cinco replicados por cada concentración, aplicadas por lo menos a dos niveles de concentración distintos dentro del rango de la curva de calibrado. La exactitud suele medirse en términos de inexactitud. La medida matemática es el denominado error medio relativo (E_r), que viene dado por la siguiente ecuación:

$$E_r = \left| \frac{\bar{x} - x_t}{x_t} \right| \times 100$$

Siendo \bar{x} el valor de la media y x_t el valor teórico. El error medio relativo debe ser menor o igual al 15% respecto al valor real, excepto para el LLOQ, donde la desviación no debe superar el 20% para su uso como criterio de validación [4,5].

9.5. RECUPERACIÓN

La recuperación o rendimiento de un procedimiento analítico mide la eficacia del proceso de extracción. El rendimiento se calcula comparando la señal de cinco replicados de muestras blanco a los que se añadió una determinada cantidad de analito antes de la extracción, con la señal de otros cinco replicados de muestra blanco a los que se les añadió la misma cantidad de analito después de realizar la extracción; estas últimas muestras serían las correspondientes a un hipotético rendimiento del 100%. El porcentaje de recuperación se calcula como: $A \times 100 / P$, siendo A el valor medio de los replicados de muestras a los que se le añadió el analito antes de la extracción, y P el valor medio de los replicados de muestra a los que se le añadió la misma cantidad de analito después de la extracción. Se consideraron adecuadas recuperaciones superiores a un 60%.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. "Guidance for industry, bioanalytical method validation" (2001). <http://www.fda.gov/cder/guidance/4252fml.pdf>.

[2] International Conference of Harmonization (ICH). "Validation of analytical methods: Definitions and terminology" ICH Q2A, 1994.

[3] International Conference of Harmonization (ICH). "Validation of analytical methods: Definitions and terminology" ICH Q2B, 1996.

[4] Peters FT, Maurer HH. Bioanalytical method validation and its implications for forensic and clinical toxicology - A review. *Accred Qual Assur* 7 (2002) 441-449.

[5] Shah VP, Midha KK, Findlay JWA, Hill HM, Hulse JD, McGilveray IJ, McKay G, Miller KJ, Patnaik RN, Powell ML, Tonelli A, Viswanathan CT, Yacobi A. Bioanalytical Method Validation - A Revisit with a Decade of Progress. *Pharmaceutical Research* 17(12) (2000)1551-1557.

[6] Karnes HT, Shiu G, Shah VP. Validation of bioanalytical methods. *Pharmaceutical Research* 8(4) (1991) 421-426.

[7] Bresolle F, Bromet--Petit M, Audran M. Validation of liquid chromatographic methods. Applications to pharmacokinetics. *J Chromatogr* 686 (1996) 3-10.

Capítulo

9

**Resultados
y discusión**

CAPÍTULO 9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Optimización de las condiciones cromatográficas
2. Identificación de los compuestos
3. Ensayos en orina
 - 3.1. Extracción en fase sólida (SPE)
 - 3.2. Validación del método
 - 3.2.1. Linealidad y análisis de regresión
 - 3.2.2. Límites de detección y cuantificación
 - 3.2.3. Selectividad
 - 3.2.4. Precisión y exactitud
 - 3.2.5. Recuperación del método
 - 3.3. Aplicación a casos reales
 - 3.4. Comparación de los resultados en orina usando SPE y MAE
 - 3.4.1. Linealidad
 - 3.4.2. Límites de detección y cuantificación
 - 3.4.3. Precisión y exactitud
 - 3.4.4. Recuperación del método
4. Ensayos en humor vítreo
 - 4.1. Extracción en fase sólida (SPE)
 - 4.2. Validación del método
 - 4.2.1. Linealidad y análisis de regresión
 - 4.2.2. Límites de detección y cuantificación

- 4.2.3. Selectividad
- 4.2.4. Precisión y exactitud
- 4.2.5. Recuperación del método
- 4.3. Aplicación a casos reales
- 4.4. Extracción asistida por microondas (MAE)
 - 4.4.1. Validación del diseño
 - 4.4.2. Validación del método
 - 4.4.2.1. Linealidad y análisis de regresión
 - 4.2.2.2. Límites de detección y cuantificación
 - 4.4.2.3. Selectividad
 - 4. 4.2.4. Precisión y exactitud
 - 4.4.2.5. Recuperación del método
 - 4.4.3. Aplicación a casos reales
 - 4.4.4. Comparación de resultados en humor vítreo usando SPE y MAE
 - 4.4.4.1. Linealidad
 - 4.4.4.2. Límites de detección y cuantificación
 - 4.4.4.3. Precisión y exactitud
 - 4.4.4.4. Recuperación del método
- 4.5. Referencias bibliográficas

1. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

Se ha puesto a punto un método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con una columna de acero inoxidable XTerra™ RP8, de 250 x 4,6 mm, empaquetada con partículas esféricas de tamaño 5 µm. Se ha empleado un detector de red de diodos por su elevada especificidad para determinar la presencia de morfina, codeína, 6AM, cocaína, BEG, cocaetileno, metadona y EDDP en orina y humor vítreo. Este detector permite hacer un barrido de longitudes de onda entre 200 y 400 nm, gracias a lo cual se pueden obtener cromatogramas tridimensionales, en los que aparecen representadas las absorbancias y longitudes de onda frente al tiempo. Así, se selecciona la longitud de onda a la cual la respuesta cromatográfica es máxima para cada analito: 285 nm para morfina, codeína y 6AM; 233 nm para cocaína, BEG y cocaetileno; 292 nm para metadona y EDDP. Además, esta técnica nos proporciona información acerca del espectro de cada sustancia analizada, de ahí que su identificación resulte mucho más fácil e inequívoca.

La primera parte del trabajo consistió en optimizar las condiciones cromatográficas que permitan separar adecuadamente todas las drogas para su posterior identificación y determinación. Se comenzó estudiando el tipo de columna cromatográfica, usando como fase móvil la propuesta por Logan y Stafford [1]. Se probaron las columnas µBondapak C18 (300x3,9 mm) y Sunfire C18 (250x4,6 mm, 5 µm), que fueron rechazadas porque se obtuvo una mala resolución de los picos cromatográficos correspondientes a los derivados opiáceos y unas respuestas bajas para todos los compuestos en estudio, que limitarían la sensibilidad del método. También fueron descartadas las columnas Kromasil C8 (250x4,6 mm, 5 µm) y Spherisorb C8 (250x4,0 mm, 5 µm), que proporcionaron picos desdoblados para cocaetileno, metadona y/o EDDP. Por último, la columna XTerra RP8 (250x4,6 mm, 5 µm) fue la seleccionada porque permitió obtener una buena separación y respuesta de los compuestos.

Con la columna previamente seleccionada se estudiaron diferentes fases móviles. La ensayada en primer lugar fue acetonitrilo-tampón fosfato 0,05M pH 3,2 variando la proporción de los dos componentes a lo largo del análisis, pero al no permitir una buena resolución de los picos cromatográficos se continuó la optimización con otras fases móviles, modificando la sal utilizada para la preparación del tampón (fosfato

disódico, fosfato monosódico, acetato amónico, fosfato trietilamónico), su concentración, su pH, el disolvente orgánico (acetonitrilo o metanol) y el flujo y gradiente utilizados [2, 3, 4]. Finalmente se concluye que la columna XTerra RP8 y la fase móvil compuesta por acetonitrilo - tampón fosfato 20mM, pH 6,53 en régimen de gradiente son las condiciones cromatográficas que consiguen una mejor respuesta y una óptima resolución de los picos del cromatograma, separando los ocho compuestos en un tiempo razonable.

Se desarrollaron dos métodos cromatográficos ligeramente diferentes para la determinación de drogas de abuso en orina y en humor vítreo, y dos procedimientos de extracción para eliminar las posibles interferencias presentes en las dos matrices biológicas estudiadas. Los gradientes usados han sido descritos en el apartado de *Material y Métodos* (Tablas 8-10), y el tiempo total de análisis fue de 22 minutos para la orina y 30 minutos para el humor vítreo.

2. IDENTIFICACIÓN DE LAS DROGAS DE ABUSO

La identificación de las drogas de abuso se ha hecho en base a sus tiempos de retención y a sus espectros de absorción. Para asignar un compuesto a cada uno de los picos del cromatograma, se inyectaron por separado disoluciones patrón de cada uno de los analitos de interés y después un disolución mezcla con todas las drogas estudiadas.

Los espectros obtenidos para cada una de las moléculas, así como sus estructuras químicas, aparecen reflejados en las figuras 38 a 40. Los tiempos de retención a los que aparecen y las longitudes de onda seleccionadas para su determinación se muestran en la tabla 12 y en la Figura 41. Durante el desarrollo de las diferentes metodologías analíticas propuestas, se han producido algunas variaciones en los tiempos de retención de las drogas, debido a las tareas de mantenimiento del cromatógrafo de líquidos y sus componentes (limpieza, cambios de columna, etc).

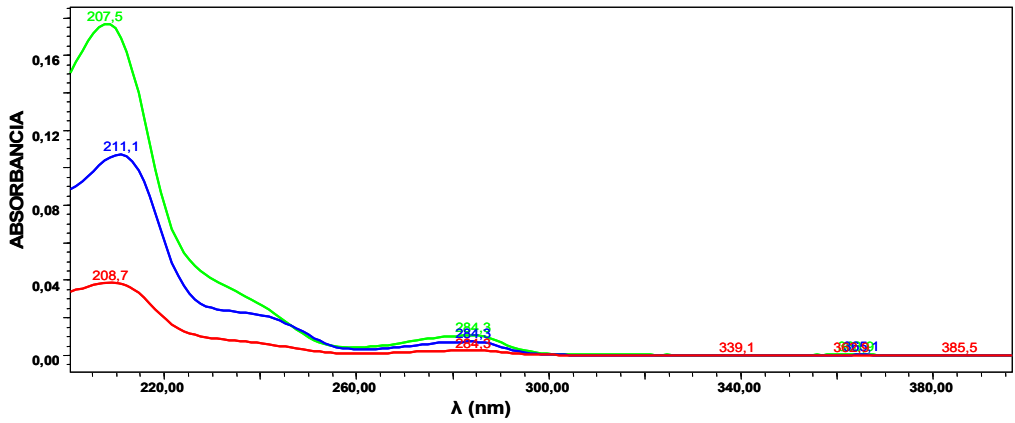


Figura 38. Espectros de Morfina (rojo), Codeína (azul) y 6AM (verde)

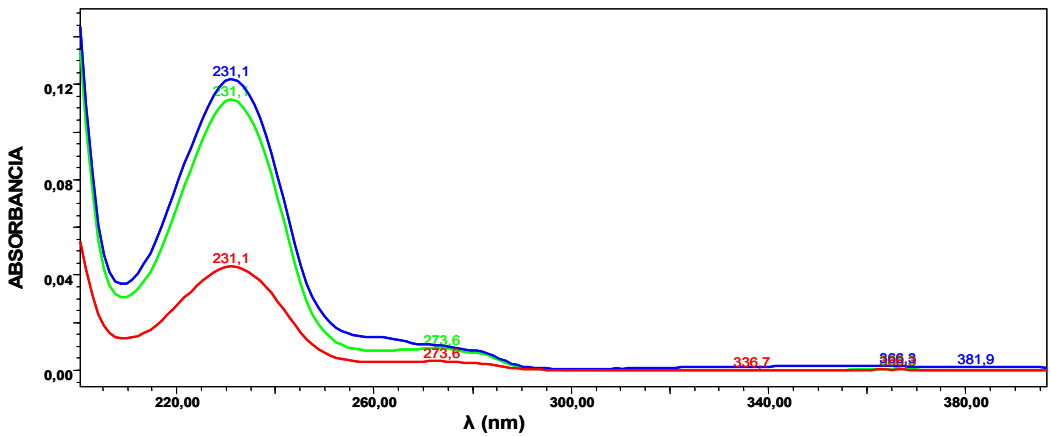


Figura 39. Espectros de Cocaína (azul), Cocaetileno (verde) y BEG (rojo)

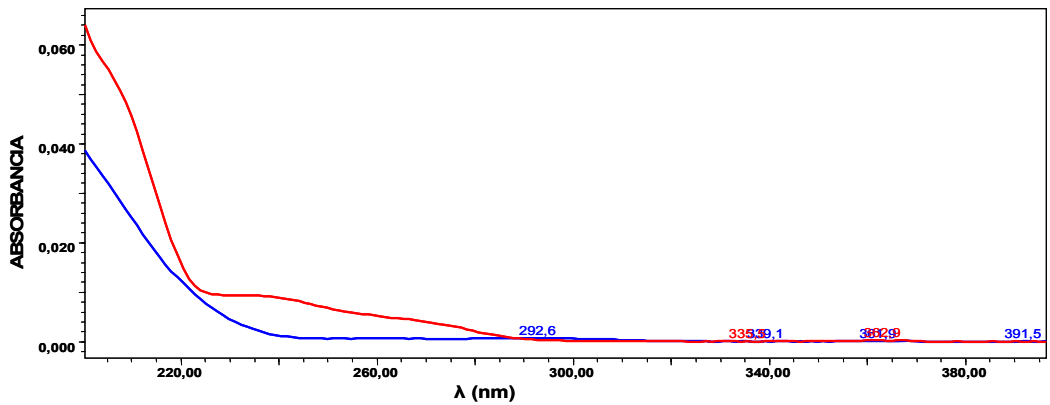


Figura 40. Espectros de Metadona (azul) y EDDP (rojo)

Tabla 12. Tiempos de retención y longitudes de onda de trabajo

Drogas	Longitud de onda (nm)	TIEMPOS DE RETENCIÓN (MINUTOS)			
		Orina (SPE)	Orina (MAE)	Humor vítreo (SPE)	Humor vítreo (MAE)
MRF	285	6,57	6,70	7,74	6,86
COD	285	9,32	11,50	12,48	11,79
BEG	233	10,50	12,50	14,50	12,98
6AM	285	11,98	13,10	16,02	14,11
COC	233	14,92	15,10	22,38	17,19
CET	233	16,04	16,10	23,28	18,64
EDDP	292	17,63	17,70	24,30	20,58
MTD	292	18,56	18,60	24,93	21,88

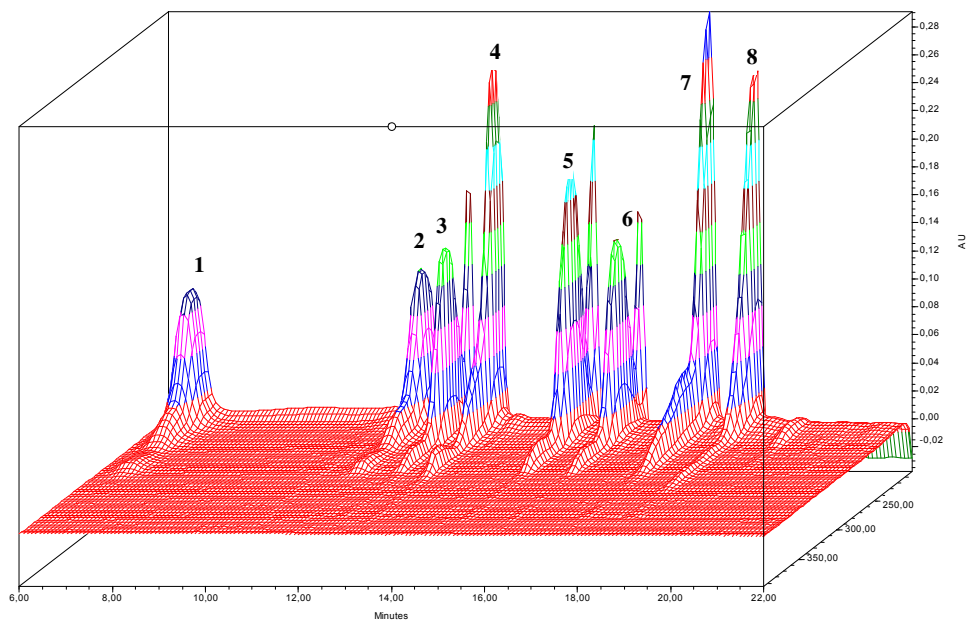


Figura 41. Cromatograma tridimensional de una disolución patrón (Conc.=10 µg/mL) (1: Morfina; 2: Codeína; 3: BEG; 4: 6AM; 5: Cocaína; 6: Cocaetileno; 7: EDDP; 8: Metadona).

3. ENSAYOS EN ORINA

3.1. EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPE)

En el desarrollo de este método se ensayaron distintos cartuchos de extracción en fase sólida, con rellenos a base de sílica C18 (Bond Elut Certify) y copolímero hidrofílico-lipofílico (Oasis HLB). Estas pruebas preliminares fueron realizadas en muestras blanco de orina (Figura 42), mostrando que los cartuchos Bond Elut Certify [5] son los que proporcionan los mejores resultados.

El protocolo utilizado fue el descrito en el apartado de *Material y Métodos*, tanto en muestras de orina libre de drogas como en muestras de orina conteniendo concentraciones conocidas de drogas. Los cromatogramas obtenidos demuestran la ausencia de sustancias interferentes en el primer caso, y una adecuada separación y buenas recuperaciones de los analitos en el segundo caso.

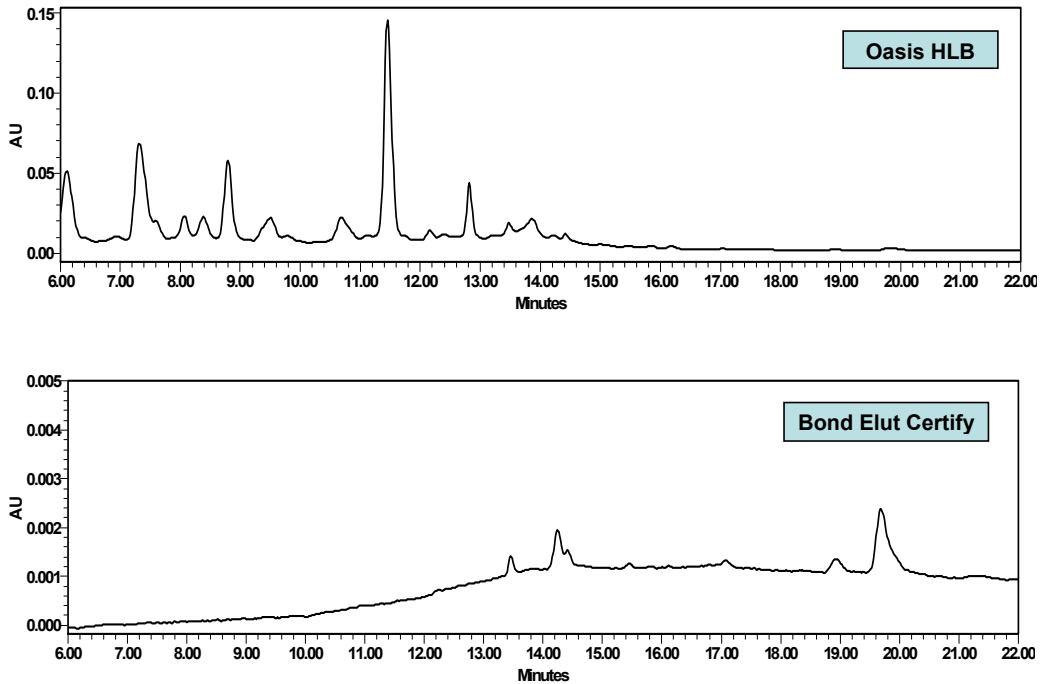


Figura 42. Cromatogramas de dos orinas blanco

3.2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO

3.2.1. LINEALIDAD Y ANÁLISIS DE REGRESIÓN

Después de aplicar el procedimiento de extracción en fase sólida a las disoluciones-mezcla en orina (concentraciones: 0,2; 0,4; 1; 2; 4 y 10 $\mu\text{g/mL}$), se construyen las rectas de calibrado de las ocho drogas en este fluido biológico, realizando tres replicados de cada nivel. Se parte de 1000 μL de orina y se reconstituye el extracto seco en 200 μL de fase móvil, obteniendo así unas concentraciones postextracción 5 veces más concentradas que las iniciales (concentraciones: 1; 2; 5; 10; 20 y 50 $\mu\text{g/mL}$).

En el cálculo de la concentración de una muestra real, procedente de un sujeto intoxicado, se ha de tener en cuenta el volumen inicial y el volumen final:

$$\text{Conc. real} = \text{Conc. en recta de calibrado} \times \text{volumen final} / \text{volumen inicial}$$

Así pues, si se mantiene el *volumen inicial* y se reconstituye el extracto seco en un volumen final menor, que, como mínimo, puede ser de 50 μL , las disoluciones postextracción (1-50 $\mu\text{g/mL}$) serían 20 veces más concentradas que la orina de partida (50-2500 ng/mL), pudiendo así cuantificarse concentraciones urinarias por encima de 50 ng/mL .

Se observa una buena linealidad, en base a los coeficientes de correlación y de determinación, que superan siempre el valor de 0,99 para todas las drogas estudiadas.

En las figuras 43-45 se muestran los cromatogramas de las drogas para las tres longitudes de onda de trabajo en orina a una concentración de 2 $\mu\text{g/mL}$.

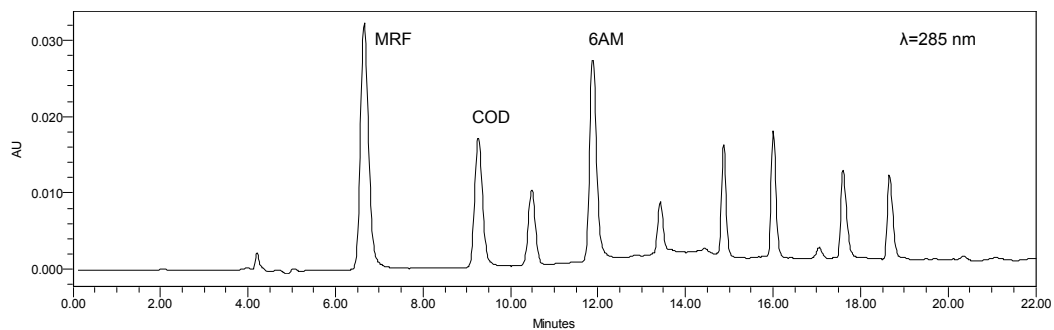


Figura 43. Cromatograma de Morfina, Codeína y 6AM

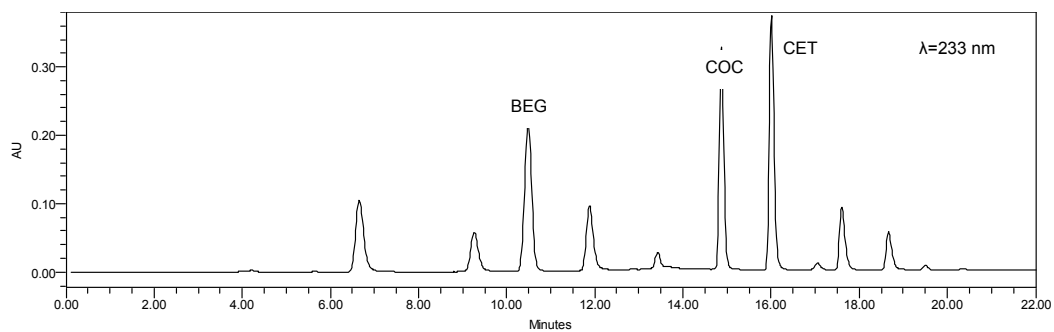


Figura 44. Cromatograma de BEG, Cocaína y Cocaetileno

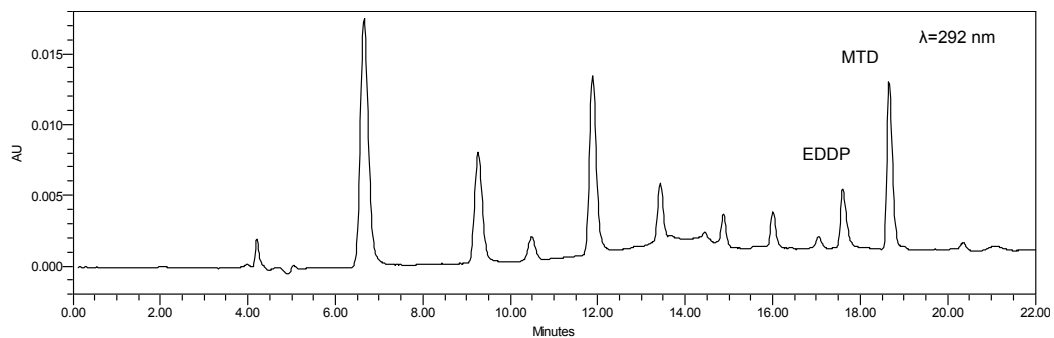


Figura 45 Cromatograma de EDDP y Metadona

Los resultados del análisis de regresión por el método de ajuste de mínimos cuadrados, según un modelo lineal del tipo $y = ax + b$ y el análisis de la varianza se reflejan en las tablas 13 y 14, y las rectas de calibrado correspondientes en este fluido biológico se observan en las Figuras 46 a 53.

Tabla 13. Análisis de regresión en orina (SPE). Rango: 0,2-10 $\mu\text{g/mL}$

Analito	Parámetro	Valor estimado	Error standard	Valor t	Nivel de probabilidad
MRF	b	+14	232,370	0,059	0,954
	a	2635	51,702	50,971	0,000
COD	b	-258	161,156	-1,598	0,129
	a	5158	35,857	143,864	0,000
6AM	b	+349	303,347	1,150	0,267
	a	3714	67,516	55,009	0,000
BEG	b	+1292	4332,503	0,298	0,769
	a	38272	963,969	39,703	0,000
COC	b	+2415	2920,084	0,827	0,420
	a	53047	649,710	81,647	0,000
CET	b	-3204	4725,222	-0,678	0,507
	a	44182	1051,348	42,024	0,000
EDDP	b	+36	31,607	1,150	0,267
	a	504	7,032	71,744	0,000
MTD	b	-446	340,334	-1,313	0,208
	a	1668	75,723	22,034	0,000

Tabla14. Análisis de la varianza en orina (SPE). Rango: 0,2-10 $\mu\text{g/mL}$

Analito	Coficiente de correlación	Error standard	R-cuadrado (%)
MRF	0,997	746,941	0,994
COD	1,000	518,027	1,000
6AM	0,997	975,415	0,994
BEG	0,995	13926,603	0,990
COC	0,999	9386,458	0,998
CET	0,996	15188,979	0,992
EDDP	0,998	101,599	0,996
MTD	0,991	1093,986	0,982

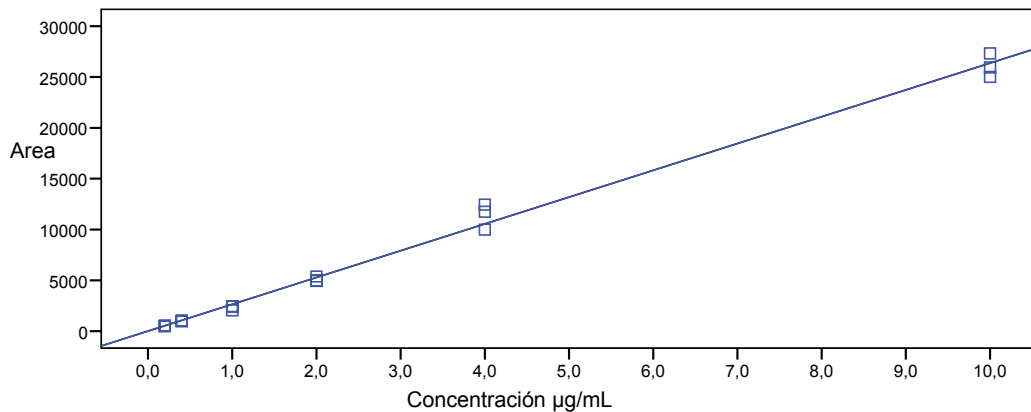


Figura 46. Recta de calibrado de Morfina en orina (SPE)

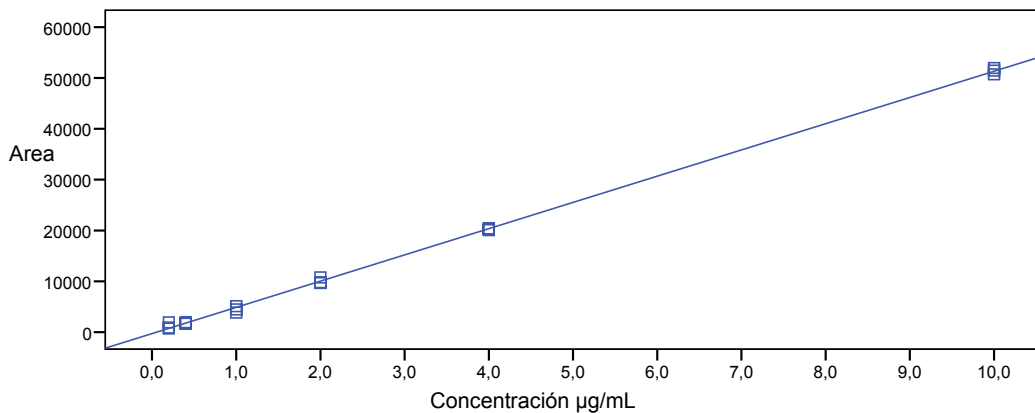


Figura 47. Recta de calibrado de Codeína en orina (SPE)

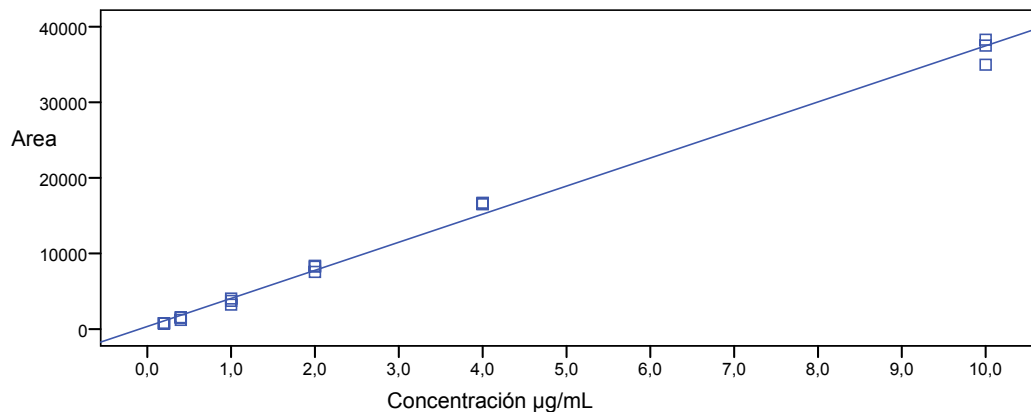


Figura 48. Recta de calibrado de 6AM en orina (SPE)

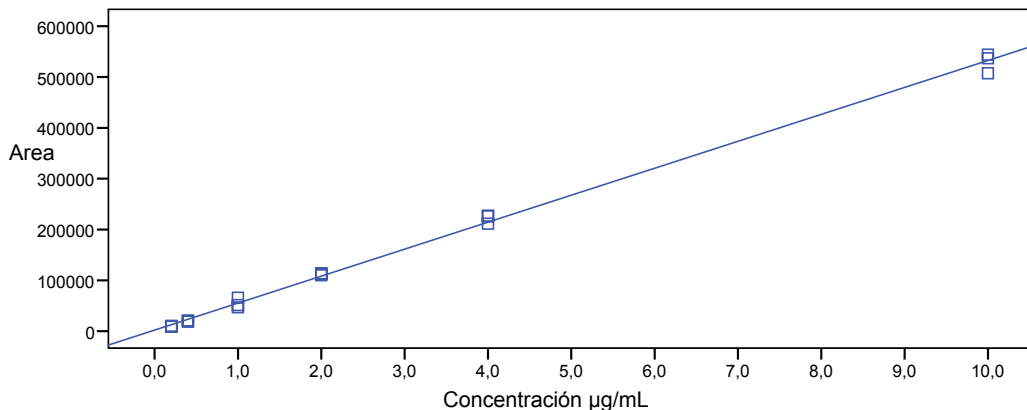


Figura 49. Recta de calibrado de Cocaína en orina (SPE)

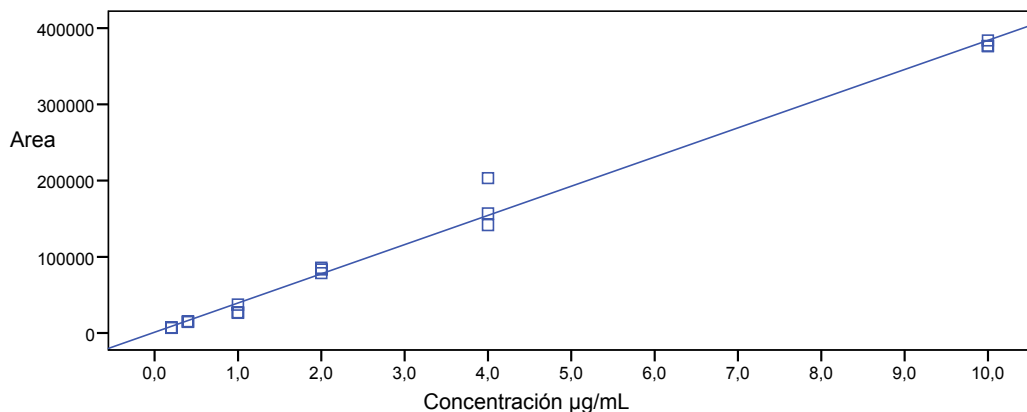


Figura 50. Recta de calibrado de BEG en orina (SPE)

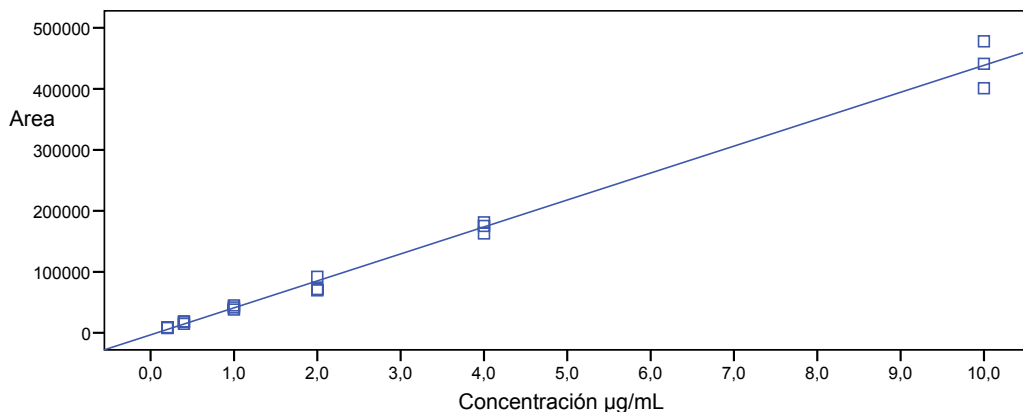


Figura 51. Recta de calibrado de Cocaetileno en orina (SPE)

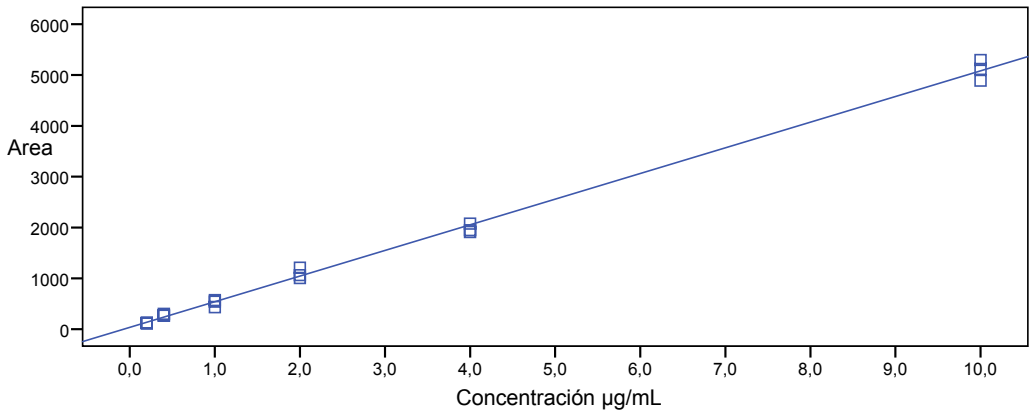


Figura 52. Recta de calibrado de EDDP en orina (SPE)

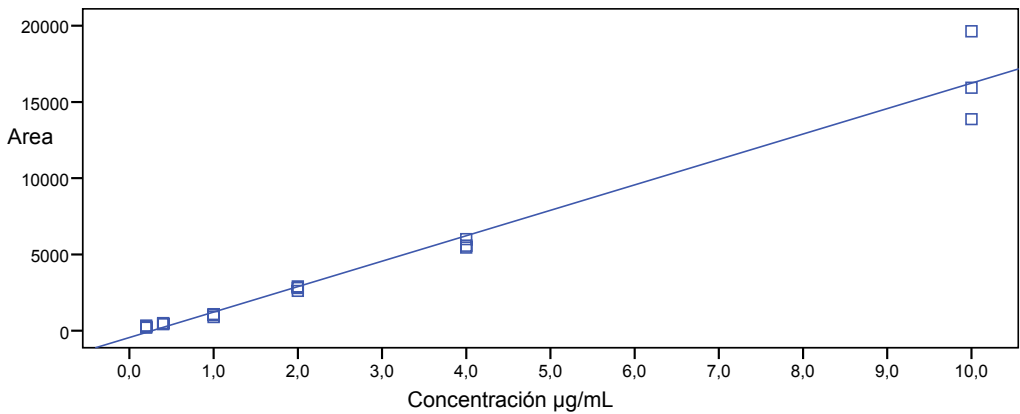


Figura 53. Recta de calibrado de Metadona en orina (SPE)

3.2.2. LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

El límite de detección, definido como la menor concentración que alcanza un valor igual a tres veces la relación señal/ruido, se calcula de la forma indicada en el apartado de *Material y Métodos*. Para todas las drogas el LLOQ es la concentración más baja de la recta de calibrado (200 ng/mL), que cumple los criterios anteriormente mencionados con respecto a la precisión y exactitud.

La tabla 15 muestra los límites de detección obtenidos para la determinación de drogas de abuso en orina, aplicando el procedimiento de extracción en fase sólida y la técnica analítica HPLC-DAD.

Tabla 15. Límites de detección en orina (SPE)

DROGA	LOD (ng/mL) (n=5)
MRF	90
COD	78
6AM	80
COC	39
BEG	50
CET	76
EDDP	95
MTD	82

Los valores oscilan entre 39 y 95 ng/mL, resultando ser similares a los reportados por Ferrara et al [6] para la morfina y BEG, y Zhaohui et al [7] para la morfina, y menores que los detectados por Fernández et al [8], Balikova et al [9], Clauwaert et al [10], Antollini et al [11] y Brunetto et al [12] para la cocaína, BEG y cocaetileno. Otros autores [13-19] que utilizan MS-MS como técnica de detección publican resultados inferiores a los obtenidos con este método. Nuestros valores se consideran aceptables para el estudio de estas drogas en orina, teniendo en cuenta las concentraciones obtenidas en nuestra serie.

El valor de LLOQ es comparable al obtenido por Antollini et al [11] para cocaína, BEG y cocaetileno.

3.2.3. SELECTIVIDAD

Antes de analizar estos compuestos en muestras de orina, se ha estudiado la especificidad o selectividad del método analítico, analizando cinco muestras de orina de otros tantos individuos que no habían consumido drogas. La figura 54 muestra los cromatogramas de una orina blanco (a) y de una orina conteniendo las ocho drogas

estudiadas (b), obtenidos después de haber aplicado el proceso de extracción en fase sólida; se comprueba que no se coextraen compuestos endógenos, que podrían interferir en el análisis, si tuvieran tiempos de retención similares a los de las drogas en estudio.

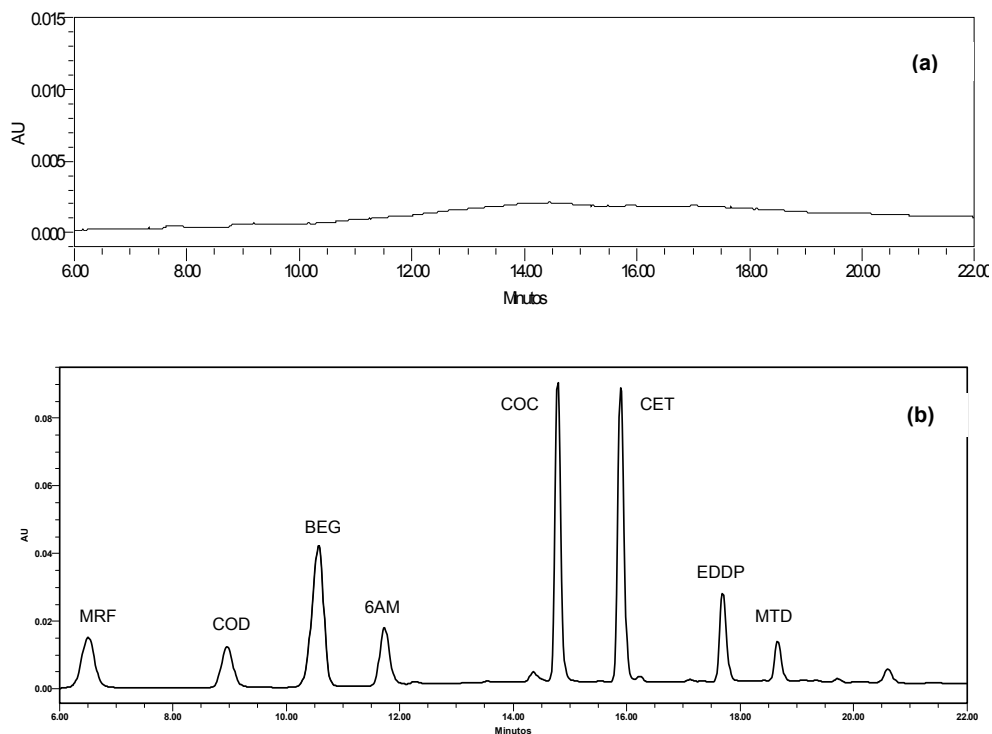


Figura 54. Cromatogramas de un blanco de orina (a) y de un estándar (b) ($\lambda = 233 \text{ nm}$)

3.2.4. PRECISIÓN Y EXACTITUD

Se estudió la precisión inter-día o reproducibilidad del método a través del cálculo de la desviación estándar relativa o coeficiente de variación en dos niveles de concentración (2 y 10 $\mu\text{g/mL}$) utilizados para la calibración de cada una de las drogas en orina. La exactitud del método fue estudiada en base al error relativo con respecto a la concentración real de los dos niveles de concentración mencionados.

Tabla 16. Valores de la precisión y la exactitud en orina (SPE)

Drogas	Conc. añadida (µg/mL)	Conc. media medida (µg/mL)	CV (%) (n=5)	Error relativo (%) (n=5)
MRF	2	2,09	5,43	4,58
	10	10,29	3,55	2,98
COD	2	2,01	4,33	0,63
	10	10,06	2,09	0,63
6AM	2	2,09	6,47	4,59
	10	10,24	4,71	2,37
COC	2	2,06	6,90	3,13
	10	10,13	5,46	1,27
BEG	2	2,11	6,33	5,69
	10	10,33	4,75	3,29
CET	2	1,90	6,65	5,25
	10	9,65	4,19	3,47
EDDP	2	2,03	6,89	1,92
	10	10,18	6,01	1,80
MTD	2	1,92	6,06	4,01
	10	9,59	4,02	4,11

En la tabla 16 se observa que la mayor parte de los resultados de la precisión y la exactitud son mejores para la concentración más alta. Los coeficientes de variación oscilan entre 2,09% para la codeína a la concentración de 10 µg/mL y 6,90% para la cocaína a la concentración de 2 µg/mL, mientras que los errores relativos oscilan entre 0,63% para la codeína a las concentraciones de 2 y 10 µg/mL y 5,69% para la benzoilecgonina a la concentración de 2 µg/mL. Estos valores se pueden considerar aceptables porque todos se encuentran por debajo del 15% [20-23].

En el caso de la precisión los coeficientes de variación son inferiores al 7% en todas las concentraciones estudiadas, siendo concordantes con los obtenidos por Fernández et al [8] Clauwaert et al [10], Brunetto et al [12], Jeanville et al [13], Coles et al [16], Cheng et al [24], Foulon et al [25], Jamdar et al [26] y Dams et al [27].

El rango de valores obtenidos para el cálculo de la exactitud es inferior en todos los casos al 6% y resultados similares son obtenidos en los métodos propuestos por Clauwaert et al [10], Foulon et al [25], Johansen et al [28] y Jagerdeo et al [29].

3.2.5. RECUPERACIÓN DEL MÉTODO

La recuperación de las drogas se calcula comparando la señal de la muestra blanco a la que se añadió una determinada cantidad de analito antes de la extracción, con la señal de otras muestras blanco a las que se añadió la misma cantidad de analito después de la extracción. La tabla 17 y la Figura 55 recogen las recuperaciones obtenidas para las concentraciones de 2 y 10 µg/mL de cada droga.

Tabla 17. Recuperaciones obtenidas en orina (SPE)

Drogas	Conc. añadida (µg/mL)	Conc. media obtenida (µg/mL)	Recuperación (%) (n=5)
MRF	2	1,93	96,50
	10	9,30	93,04
COD	2	1,57	78,39
	10	8,33	83,31
6AM	2	1,48	74,12
	10	7,14	71,40
COC	2	1,37	68,90
	10	7,18	71,80
BEG	2	1,36	68,11
	10	6,51	65,10
CET	2	1,91	95,72
	10	9,77	97,68
EDDP	2	1,20	60,10
	10	6,03	60,30
MTD	2	1,50	75,16
	10	7,25	72,54

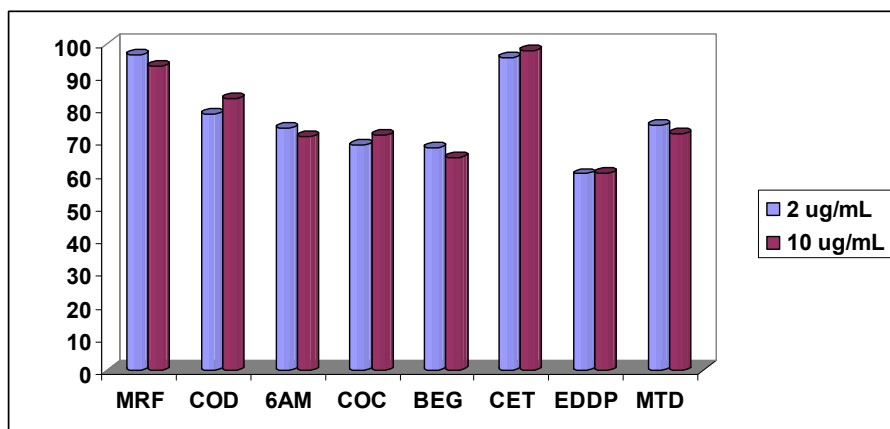


Figura 55. Recuperaciones en orina para conc: 2 µg/mL y 10 µg/mL

Si se comparan los resultados obtenidos a las dos concentraciones no se observa una tendencia uniforme, pues los valores son mayores a la concentración más baja (2 µg/mL) para morfina, 6-acetilmorfina, benzoilecgonina y metadona, y a la inversa para las demás drogas. Las recuperaciones oscilan entre 60,10% para el EDDP a la concentración de 2 µg/mL y 97,68% para el cocaetileno a una concentración de 10 µg/mL. De las drogas restantes, las que presentan mayores porcentajes de recuperación media son la morfina y la codeína, seguidas de la metadona, la 6-acetilmorfina y la cocaína. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Fernández et al [8], Clauwaert et al [10], Johansen et al [28] y Soriano et al [30] para la cocaína y metabolitos, con los reportados por Theodoridis et al [3], Zhaohui et al [7] y Low et al [31] para los opiáceos y metabolitos, y con los publicados por Li et al [32], para la determinación de opiáceos, cocaína y metabolitos; en todos ellos se ha utilizado un método de extracción en fase sólida. Sin embargo, las recuperaciones obtenidas por Yawney et al [33], con cartuchos Oasis MCX[®], son de 113% para cocaína y 86% para morfina, datos superiores a los de esta serie para la cocaína, y menores para la morfina.

3.3. APLICACIÓN A CASOS REALES

El método propuesto ha sido aplicado a 23 muestras postmortem de orina, procedentes de intoxicaciones positivas a opiáceos, y/o cocaína, que han sido remitidos al Servicio de Toxicología del Instituto Universitario de Medicina Legal de Santiago de Compostela (IUML). De los 23 casos estudiados, 18 hombres y cinco mujeres, 20 casos fueron positivos para opiáceos y cocaína y en 3 casos se ha detectado únicamente cocaína. Además se han detectado otras sustancias tales como cafeína, alcohol, benzodiazepinas y/o cannabis (Tabla 18).

Tabla 18. Niveles en orina ($\mu\text{g/mL}$) para 23 casos mortales, relacionados con consumo de heroína, cocaína y/o metadona

Caso	MRF	COD	MAM	COC	BEG	CET	MTD	EDDP	Otras drogas
1	0,46	1,87	0,50	1,35	38,76	5,07	2,85	15,72	Cafeina, Alc,BZD
2	4,51	4,95	38,65	17,13	193,39	7,23	5,79	57,16	Cafeina, Alc,BZD
3	—	—	—	3,22	9,51	1,75	2,98	21,87	Cafeina, Alc,BZD
4	10,17	—	0,41	13,24	177,27	—	2,76	4,33	Cafeina
5	—	—	—	2,85	5,10	—	3,76	12,50	Cafeina, BZD, THC
6	13,57	5,86	11,95	2,60	2,70	—	2,10	31,92	Cafeina
7	—	—	—	1,85	38,31	1,65	—	4,59	Cafeina, Alc, THC
8	13,57	—	0,90	3,46	217,24	—	—	—	Cafeina, THC
9	—	—	—	—	104,40	5,98	17,17	89,86	Cafeina, Alc,BZD, THC
10	—	—	—	21,87	75,97	5,22	—	95,76	Cafeina, THC
11	0,39	—	0,58	—	2,36	—	—	—	Cafeina, BZD, Piracetan
12	10,05	—	22,35	17,61	2227	—	—	—	Cafeina
13	7,54	8,73	7,71	12,45	98,73	7,96	—	—	Cafeina, BZD THC, Piracetan
14	15,12	9,31	—	43,56	183,94	—	—	—	Cafeina, BZD, THC
15	6,21	4,45	1,61	3,21	5,91	—	—	16,98	Cafeina, BZD, THC
16	—	—	—	—	1,02	1,42	—	13,12	Alc
17	—	—	—	—	0,92	1,20	3,43	8,04	Cafeina, Alc,BZD
18	—	—	—	13,29	260,01	—	—	43,75	Cafeina, BZD, THC
19	21,54	5,44	1,67	3,63	0,99	7,39	—	—	BZD
20	—	—	—	273,34	164,40	—	—	—	Cafeina, BZD, THC
21	—	—	—	3,33	12,44	—	—	38,35	Cafeina, BZD
22	—	—	—	—	50,19	1,98	—	—	Cafeina, Alc
23	—	—	—	17,08	42,44	8,95	—	—	THC, Alc

Alc: Alcohol; BZD: Benzodiazepinas; THC: Cannabis

Los niveles hallados en orina para cocaína y metabolitos oscilaron entre 1,35 y 273,34 $\mu\text{g/mL}$, con una media ($\pm\text{SD}$) de $25,28 \pm 62,81 \mu\text{g/mL}$ y una mediana de 8,04 $\mu\text{g/mL}$ para la cocaína; entre 0,92 y 260,01 $\mu\text{g/mL}$, con una media ($\pm\text{SD}$) de $170,13 \pm 455,88 \mu\text{g/mL}$ y una mediana de 42,44 $\mu\text{g/mL}$ para la BEG; y entre 1,20 y 8,95 $\mu\text{g/mL}$, con una media ($\pm\text{SD}$) de $4,65 \pm 2,90 \mu\text{g/mL}$ y una mediana de 5,14 $\mu\text{g/mL}$

para el cocaetileno. Según los resultados de nuestros análisis se comprueba que la sustancia detectada en la totalidad de las muestras es la BEG, siendo el valor de concentración superior al de cocaína en el 96% de los casos. El cocaetileno fue detectado en los nueve casos positivos a alcohol y cocaína. Al igual que ocurre en nuestra serie, son numerosos los estudios [10-13] en los cuales las concentraciones más elevadas se corresponden con la BEG en lugar de la cocaína. Esto es debido a la mayor vida media de la BEG (5-8h) frente a la cocaína (0,5-1,5h) y a la hidrólisis que sufre la cocaína a EME y BEG.

Los niveles urinarios de cocaína y BEG en nuestra serie son similares a los obtenidos por Peterson et al [34] y Pereiro et al [35] en el caso de la cocaína; pero más altos que los publicados por Fernández et al [8], Antollini et al [11], Brunetto et al [12], Jeanville et al [13], Berg et al [14] y Shakleya et al [19].

El rango de concentraciones encontrado para el grupo de los opiáceos ha sido de 0,46 - 21,54 $\mu\text{g/mL}$, con una media ($\pm\text{SD}$) de $9,38 \pm 6,13 \mu\text{g/mL}$ y una mediana de 10,05 $\mu\text{g/mL}$ para la morfina; 1,87 - 9,31 $\mu\text{g/mL}$, con una media ($\pm\text{SD}$) de $5,80 \pm 2,55 \mu\text{g/mL}$ y una mediana de 5,44 $\mu\text{g/mL}$ para la codeína; 0,41 - 22,35 $\mu\text{g/mL}$, con una media ($\pm\text{SD}$) de $8,63 \pm 12,73 \mu\text{g/mL}$ y una mediana de 1,6 $\mu\text{g/mL}$ para la 6AM; 2,10 - 17,17 $\mu\text{g/mL}$, con una media ($\pm\text{SD}$) de $4,65 \pm 2,90 \mu\text{g/mL}$ y una mediana de 5,14 $\mu\text{g/mL}$ para la metadona; y 4,33-95,76 $\mu\text{g/mL}$, con una media ($\pm\text{SD}$) de $32,42 \pm 29,93 \mu\text{g/mL}$ y una mediana de 19,42 $\mu\text{g/mL}$ para el EDDP. Los valores medios de las concentraciones urinarias de morfina fueron más elevados que los de 6AM y codeína, y el valor medio del EDDP fue superior al de la metadona. Georv et al [15] obtuvieron niveles de morfina y codeína similares a los de nuestra serie. Fernández et al [8] y Pereiro et al [35] refieren concentraciones menores para la morfina, y Berg et al [14], Shakleya et al [19] y Low et al [31] reportan valores inferiores para la morfina y metabolitos.

En la figura 56 se resumen los resultados obtenidos en los análisis efectuados, representando el número de casos que han resultado positivos para cada sustancia, y en la figura 57 se muestra un cromatograma de un caso real.

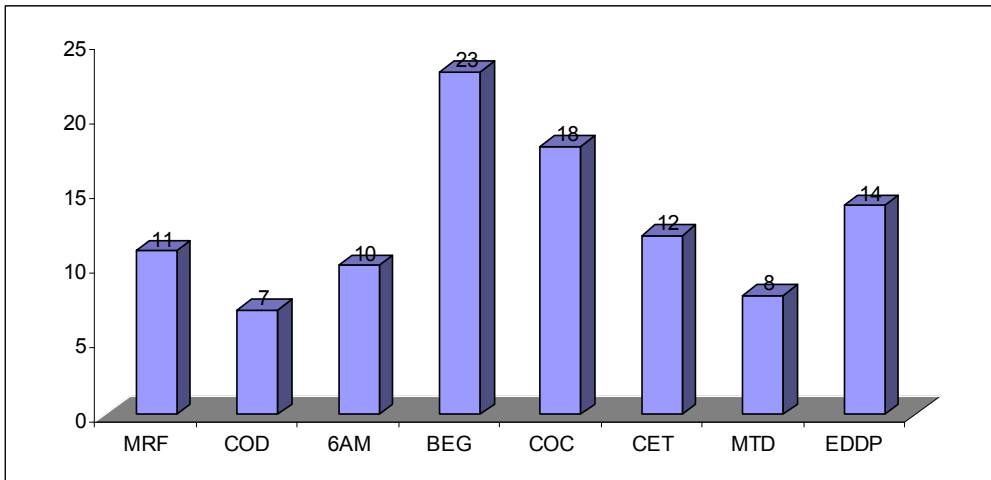


Figura 56. Número de casos positivos para cada sustancia en orina

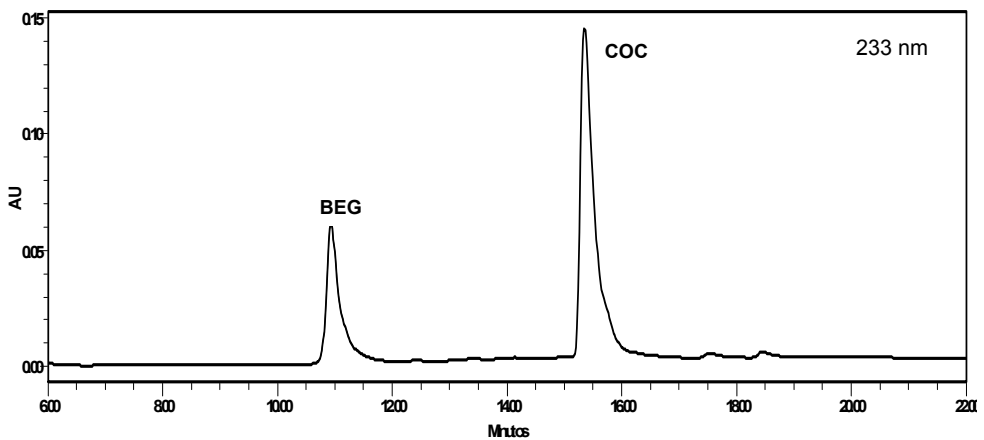


Figura 57. Cromatograma del caso número 20 (orina diluida 1:25)

3.4. COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS EN ORINA USANDO SPE Y MAE

Se ha realizado la comparación de un método clásico de extracción en fase sólida (SPE) con un método de extracción asistida por microondas (MAE) para extraer las drogas de abuso a partir de la orina, con el fin de implantar el procedimiento más adecuado para los análisis rutinarios en nuestro laboratorio de Toxicología.

3.4.1. LINEALIDAD

La linealidad de ambos métodos se ha analizado elaborando rectas de calibrado de cada analito en orina en el rango de concentraciones de 0,2 a 10 µg/mL, realizando tres replicados de cada nivel en ambos casos. La comparación entre los coeficientes de correlación para cada uno de los analitos empleando la extracción en fase sólida y la extracción asistida por microondas se muestra en la tabla 19.

Tabla 19. Comparación de los coeficientes de correlación en orina (SPE-MAE)

DROGAS	COEFICIENTE CORRELACIÓN (SPE)	COEFICIENTE CORRELACIÓN (MAE)
MRF	0,997	0,997
COD	1,000	0,998
6AM	0,997	0,999
COC	0,999	0,999
BEG	0,995	0,999
CET	0,996	0,998
EDDP	0,998	0,999
MTD	0,991	0,998

Los resultados obtenidos indican que ambos métodos proporcionan una excelente linealidad en el rango de concentraciones estudiado, siendo superiores en todos los casos a 0,99. El rango de trabajo fue elegido en función de los niveles presentes en la orina de sujetos intoxicados [36], y de los intervalos estudiados por otros autores [10, 12, 27]

Las concentraciones de las drogas pueden variar enormemente, dependiendo del período transcurrido entre la administración de la dosis y la toma de muestra, de fenómenos de redistribución postmortem, etc. Por esta razón trabajar en un rango adecuado es sumamente importante.

3.4.2. LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

Tanto en el caso de la extracción en fase sólida como en la extracción asistida por microondas, los límites de detección para cada analito se han calculado según el proceso descrito anteriormente. En ambas técnicas de extracción y para todos los analitos se acepta como límite inferior de cuantificación el estándar más bajo de la curva de calibrado que cumple las condiciones de precisión y exactitud requeridas.

En la tabla 20 y en la figura 58 se muestra la comparación de los límites de detección y de los límites de cuantificación para SPE y MAE.

Tabla 20. Comparación de los límites de detección y cuantificación en orina (SPE-MAE)

Drogas	LOD (ng/mL) SPE	LOD (ng/mL) MAE	LLOQ (ng/mL) SPE	LLOQ (ng/mL) MAE
MRF	90	60	200	100
COD	78	70	200	100
6AM	80	50	200	100
COC	39	20	200	100
BEG	50	40	200	100
CET	76	70	200	100
EDDP	95	80	200	100
MTD	82	70	200	100

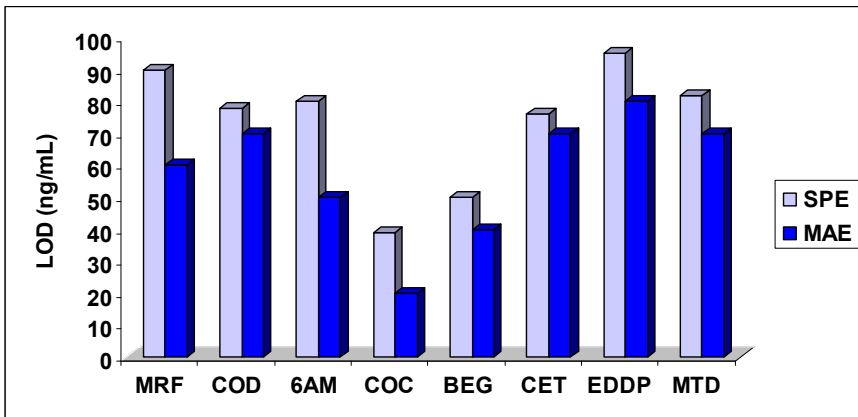


Figura 58. Comparación de los límites de detección

Como se puede observar, tras realizar la determinación cromatográfica de las drogas en orina después de una extracción asistida por microondas, se obtienen unos límites de detección y de cuantificación menores a los conseguidos cuando se usa la extracción en fase sólida. En todos los casos los valores son adecuados para determinar la presencia de las sustancias estudiadas, teniendo en cuenta las concentraciones obtenidas en el análisis de muestras reales [37-38].

3.4.3. PRECISIÓN Y EXACTITUD

La precisión y exactitud obtenidas en la determinación cromatográfica de las drogas de abuso en orina, usando SPE o MAE, muestran que ambos métodos de extracción proporcionan unos resultados adecuados para los coeficientes de variación y los errores relativos medios, según los criterios internacionales. Sin embargo, se pueden observar ciertas tendencias, reflejadas en la tabla 21.

Tabla 21. Comparación de la precisión y la exactitud en orina (SPE-MAE)

	Concent. añadida (µg/mL)	CV (%) (n=5) SPE	CV (%) (n=5) MAE	Error relativo (%) (n=5) SPE	Error relativo (%) (n=5) MAE
MRF	2	5,43	5,87	4,58	2,30
	10	3,55	2,16	2,98	1,34
COD	2	4,33	6,15	0,63	3,20
	10	2,09	2,16	0,63	3,20
6AM	2	6,47	4,05	4,59	1,70
	10	4,71	2,41	2,37	3,50
COC	2	6,90	5,88	3,13	3,80
	10	5,46	3,10	1,27	2,32
BEG	2	6,33	4,43	5,69	1,70
	10	4,75	2,84	3,29	3,04
CET	2	6,65	7,62	5,25	1,70
	10	4,19	1,23	3,47	1,48
EDDP	2	6,89	6,55	1,92	1,80
	10	6,01	2,15	1,80	1,80
MTD	2	6,06	4,30	4,01	3,60
	10	4,02	2,07	4,11	2,26

Los coeficientes de variación obtenidos a la concentración de 10 µg/mL resultaron ser más elevados en el caso de la extracción en fase sólida para todas las drogas de abuso, a excepción de la codeína que presentó unos valores muy próximos entre sí. Los coeficientes de variación obtenidos a la concentración de 2 µg/mL también han sido mayores cuando se usa la SPE, excepto para la codeína y el cocaetileno. Si se comparan los valores medios obtenidos para cada droga, la MAE proporciona mejores resultados en cuanto a precisión para todos los casos, salvo para la codeína.

Los errores relativos obtenidos a las dos concentraciones, cuando se aplicó la extracción asistida por microondas, son más bajos para todas las drogas estudiadas, excepto para codeína y cocaína.

De forma general, este estudio comparativo muestra mayor precisión y exactitud cuando las drogas de abuso son aisladas a partir de la orina mediante extracción asistida por microondas, particularmente a las concentraciones más altas.

3.4.4. RECUPERACIÓN

Las recuperaciones obtenidas para las drogas a partir de la orina extraída por MAE o por SPE, muestran que ambos procedimientos de extracción aportan unos valores que se ajustan a los criterios internacionales en relación con dicho parámetro. Sin embargo se pueden observar ciertas tendencias, reflejadas en la tabla 22 y en la Figura 59.

Tabla 22. Comparación de las recuperaciones medias en orina (SPE-MAE)

DROGA	Concent. añadida (µg/mL)	Recuperación (%) (n=5) (SPE)	Recuperación (%) (n=5) (MAE)
MRF	2	96,50	94,00
	10	93,04	73,60
COD	2	78,39	82,50
	10	83,31	88,40
6AM	2	74,12	107,50
	10	71,40	88,30
COC	2	67,90	83,00
	10	70,80	88,20
BEG	2	68,11	62,50
	10	65,10	62,80
CET	2	95,72	80,00
	10	97,68	87,70
EDDP	2	60,10	75,00
	10	60,30	77,10
MTD	2	75,16	67,00
	10	72,54	66,60

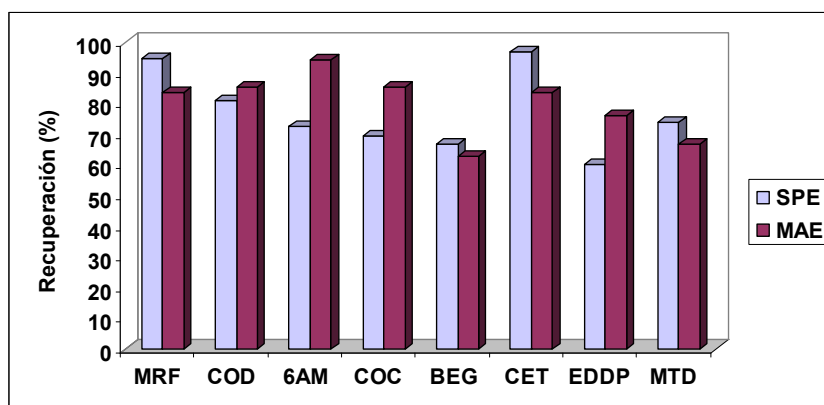


Figura 59. Comparación de las recuperaciones medias en orina

En base a las recuperaciones obtenidas para las ocho drogas estudiadas en orina, no se puede destacar de forma significativa un método de extracción sobre el otro. Tanto la SPE como la MAE proporcionan resultados aceptables, que oscilan entre 60 y 97% y entre 63 y 107%, respectivamente. Se debe resaltar que la morfina, BEG, cocaetileno y metadona se extraen mejor cuando se usa la extracción en fase sólida, mientras que la codeína, 6-acetilmorfina, cocaína y EDDP se extraen mejor cuando se usa la MAE en la orina.

4. ENSAYOS EN HUMOR VÍTREO

4.1. EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPE)

Para llegar a las condiciones de extracción en fase sólida reflejadas en *Material y Métodos*, se realizaron unos experimentos previos para conseguir unos resultados óptimos. Se decidió trabajar con cartuchos Oasis HLB[®] debido a su polivalencia para retener en su fase adsorbente distintos tipos de drogas; así se puede trabajar con un espectro más amplio de sustancias y no ceñirnos a compuestos claramente ácidos o básicos para los cuales existen cartuchos más específicos (Oasis MCX[®] y Oasis WAX[®]).

La primera fase de optimización consistió en determinar la proporción de metanol que podría ser empleada en la primera fase de lavado. Se emplearon diferentes proporciones de agua/metanol (tabla 23) y solo a partir de un 25% de metanol, se observa la presencia de BEG en los cromatogramas obtenidos (Figura 60), así como de morfina, cuando se llega al 30% de metanol. Así pues, se decidió que la proporción máxima de metanol sería de un 20%, para conseguir eliminar la mayor cantidad de interferencias de la muestra sin afectar a la retención de las drogas de abuso.

Tabla 23. Proporción de metanol en la fase de lavado

Proporción Agua/Metanol	Analitos detectados en líquidos de lavado
95/5	--
90/10	--
85/15	--
80/20	--
75/25	BEG
70/30	BEG, Morfina

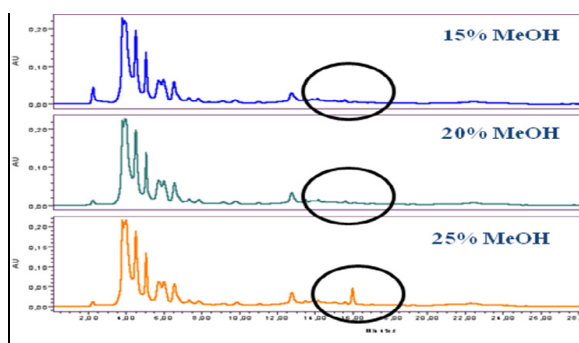


Figura 60. Cromatogramas de diferentes lavados

Una vez determinada la proporción máxima de metanol, en el segundo lavado se emplea una pequeña parte de hidróxido amónico para hacerlo más eficiente. Se estudió también el efecto de añadir distintas proporciones de NH_4OH , desde un 0,5% hasta un 5% sin observar una variación apreciable. Así pues, se decidió mantener una parte de metanol (18%) y un 2% de hidróxido amónico para potenciar el efecto del lavado.

También se optimizó el eluyente, probando solo 2 mL de diclorometano, una doble elución con 2 mL de diclorometano + 2 mL de metanol, y solo 2 mL de metanol. Las respuestas cromatográficas obtenidas en cada caso se reflejan en la Figura 61, poniéndose de manifiesto que el diclorometano es el disolvente que proporciona los mejores resultados, en lo que respecta a la purificación de la muestra y a la recuperación de las drogas.

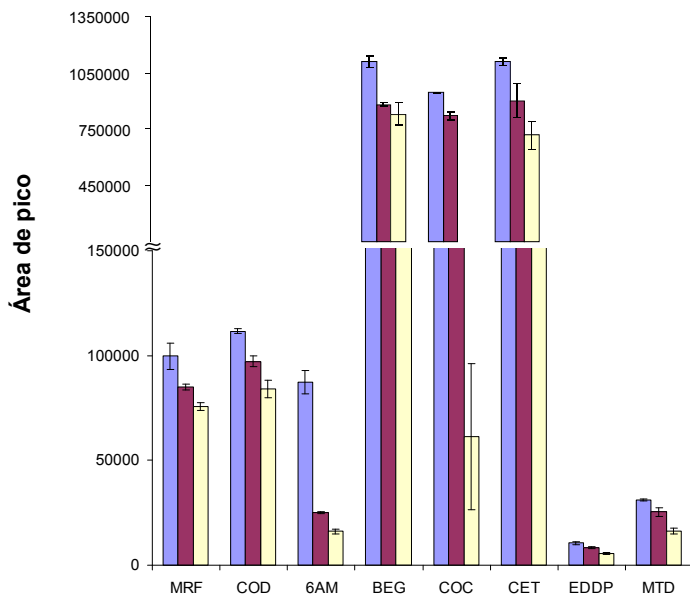


Figura 61. Optimización del eluyente

4.2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO

4.2.1. LINEALIDAD Y ANÁLISIS DE REGRESIÓN

La linealidad del método se ha analizado elaborando rectas de calibrado de cada analito en humor vítreo, en el rango de concentraciones de 0,1 a 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, realizando tres replicados de cada nivel. La figura 62 muestra los cromatogramas de las drogas para cada longitud de onda en humor vítreo.

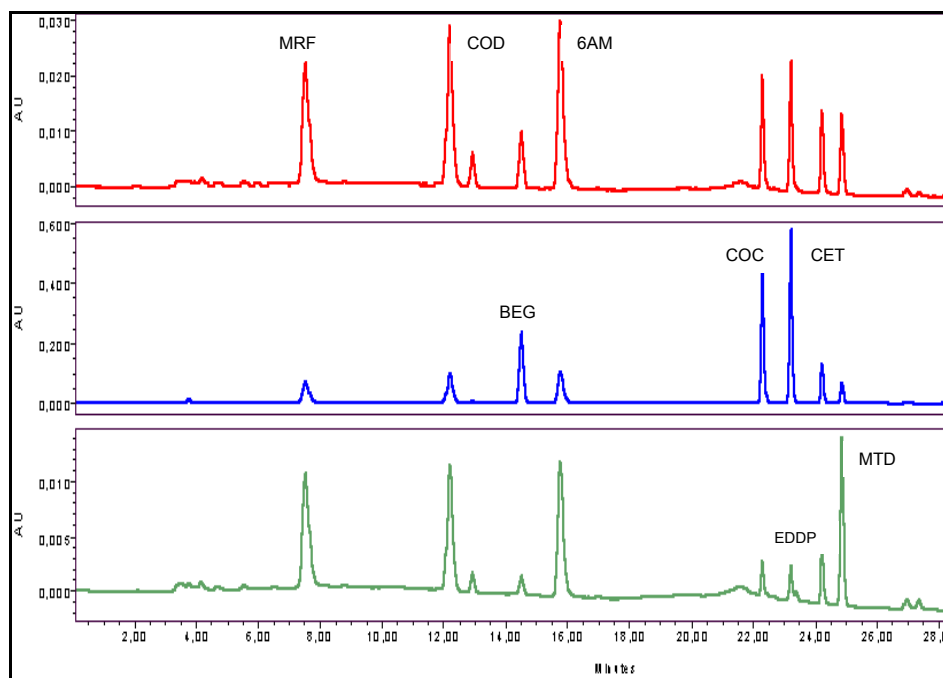


Figura 62. Cromatogramas obtenidos para cada longitud de onda en humor vítreo (rojo: $\lambda = 285$ nm, azul: $\lambda = 233$ nm, verde: $\lambda = 292$ nm)

Las áreas obtenidas nos permiten realizar un análisis de regresión ajustándose a un modelo lineal del tipo $y = ax + b$, donde a es la pendiente de la recta de regresión y b la ordenada en el origen. También se puede obtener el coeficiente de correlación, r , que muestra el grado de relación entre las variables x e y , siendo superior a 0,999 para las drogas de estudio. Las tablas 24 y 25 reflejan los resultados del análisis de regresión y varianza en humor vítreo. Las figuras 63 a 70 muestran las representaciones gráficas de las rectas de calibrado en humor vítreo.

Tabla 24. Análisis de regresión en humor vítreo (SPE). Rango: 0,1-4 µg/mL

Analito	Parámetro	Valor estimado	Error standard	Valor t	Nivel de probabilidad
MRF	b	-1159	1617,409	-0,717	0,484
	a	81266	860,251	94,468	0,000
COD	b	+617	1963,249	0,314	0,758
	a	90847	1044,193	87,003	0,000
6AM	b	+1598	1128,230	1,417	0,176
	a	93219	600,072	155,347	0,000
BEG	b	+13221	13633,080	0,970	0,347
	a	764884	7251,023	105,486	0,000
COC	b	+6779	9685,697	0,700	0,494
	a	702822	5151,529	136,430	0,000
CET	b	-19392	13848,343	-1,400	0,181
	a	873880	7365,493	118,645	0,000
EDDP	b	+28	279,176	0,101	0,921
	a	8745	148,485	58,898	0,000
MTD	b	-742	652,031	-1,139	0,272
	a	22766	346,796	65,647	0,000

Tabla 25. Análisis de la varianza en humor vítreo (SPE). Rango: 0,1-4 µg/mL

Analito	Coefficiente de correlación	Error standard	R-cuadrado (%)
MRF	0,999	5014,9747	0,998
COD	0,999	6087,2947	0,998
6AM	1,000	3498,2169	0,999
BEG	0,999	42271,0375	0,999
COC	1,000	30031,6933	0,999
CET	0,999	42938,3629	0,999
EDDP	0,998	865,6188	0,995
MTD	0,998	2021,7035	0,996

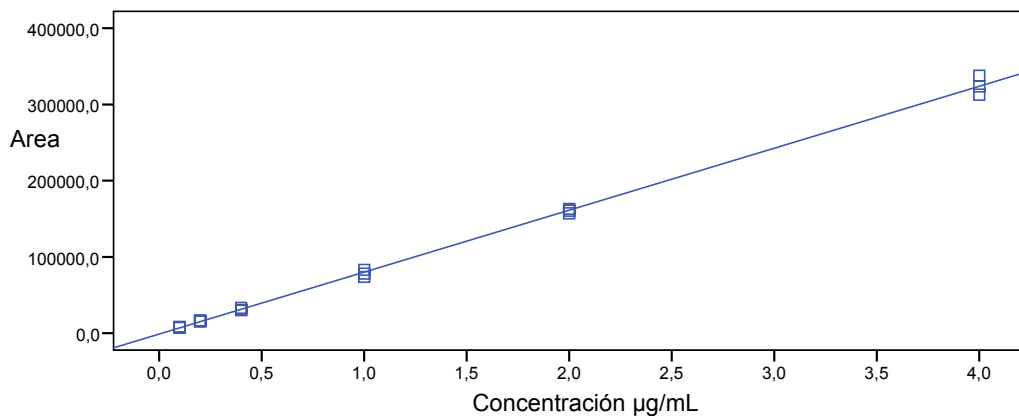


Figura 63. Recta de calibrado de Morfina en humor vítreo (SPE)

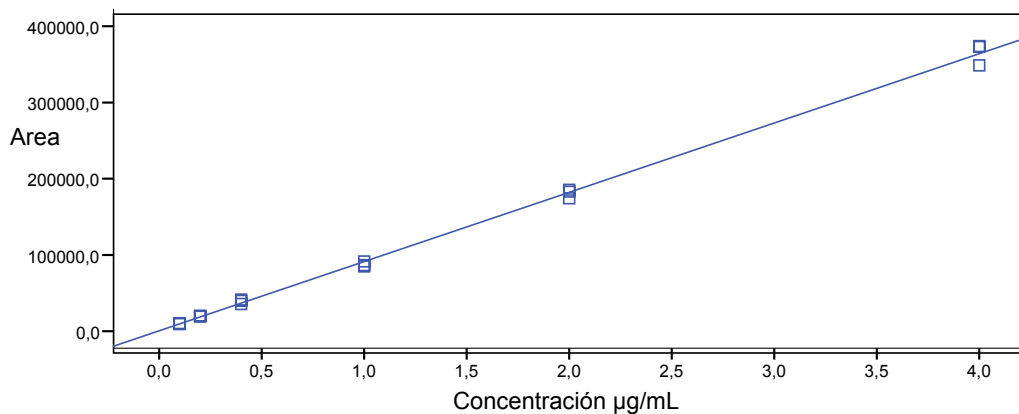


Figura 64. Recta de calibrado de Codeína en humor vítreo (SPE)

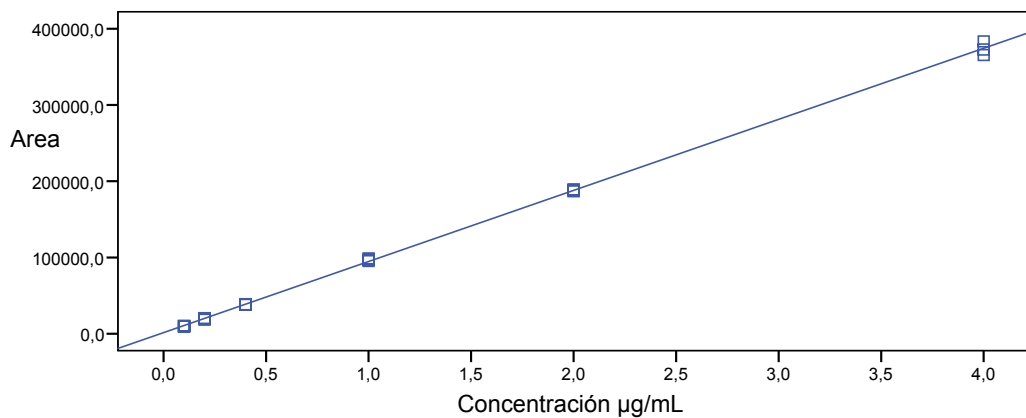


Figura 65. Recta de calibrado de 6AM en humor vítreo (SPE)

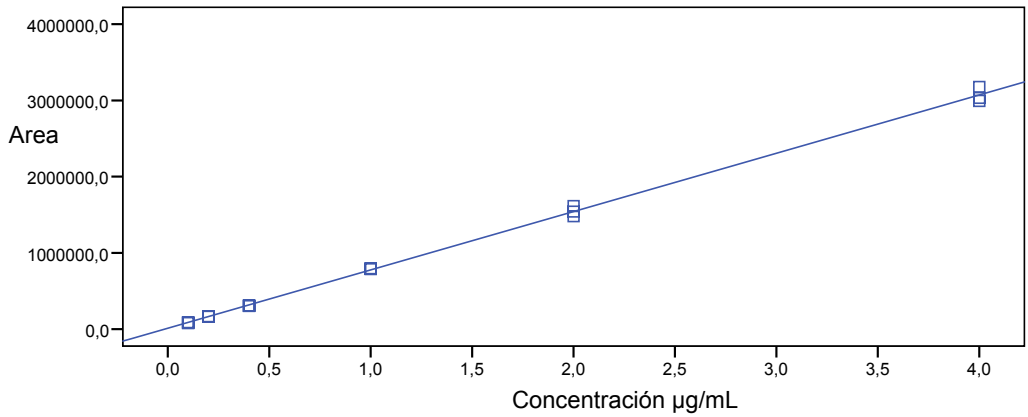


Figura 66. Recta de calibrado de DEG en humor vítreo (SPE)

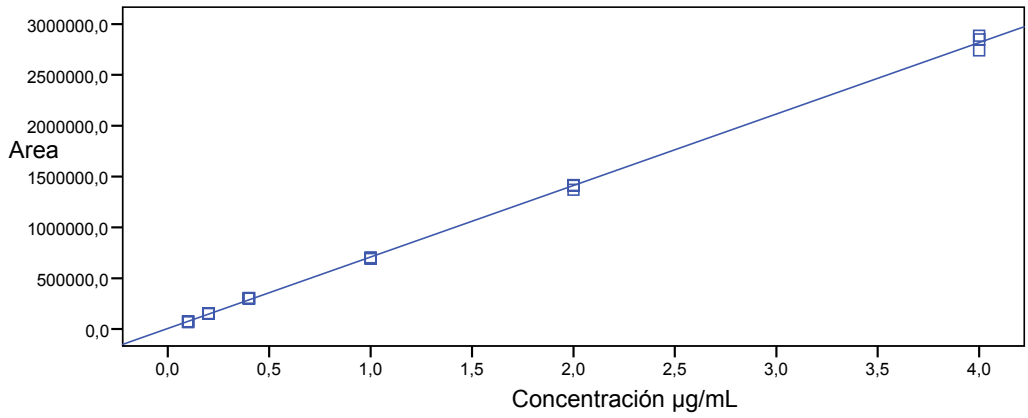


Figura 67. Recta de calibrado de Cocaína en humor vítreo (SPE)

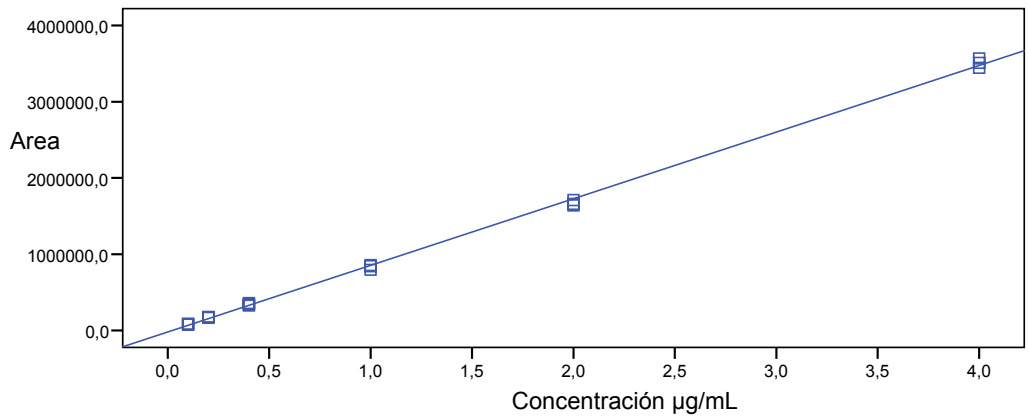


Figura 68. Recta de calibrado de Cocaetileno en humor vítreo (SPE)

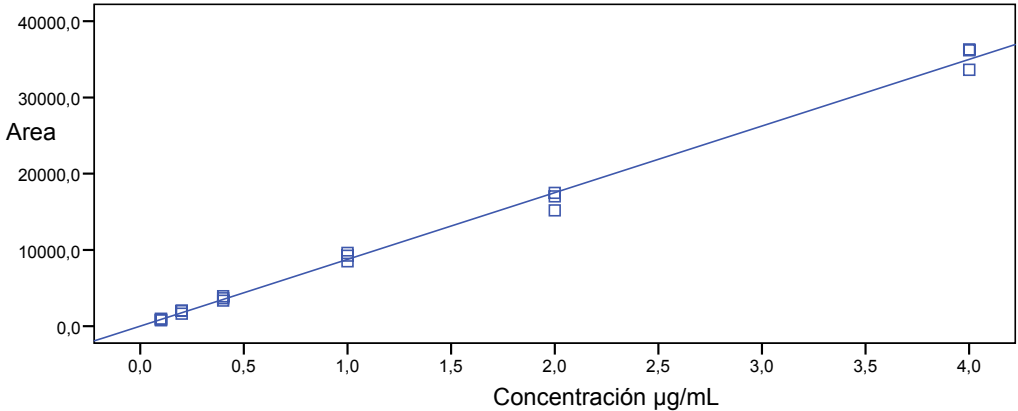


Figura 69. Recta de calibrado de EDDP en humor vítreo (SPE)

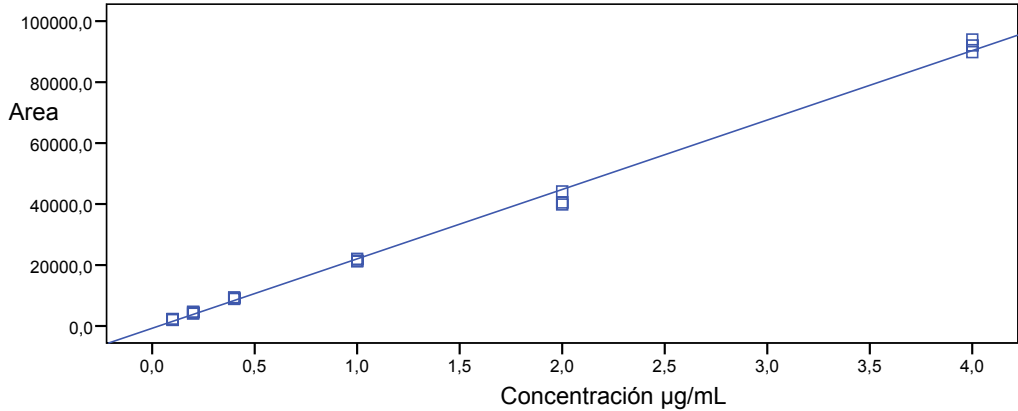


Figura 70. Recta de calibrado de Metadona en humor vítreo (SPE)

4.2.2. LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

La tabla 26 muestra los límites de detección obtenidos para la determinación de drogas de abuso en humor vítreo, aplicando el procedimiento de extracción en fase sólida.

Tabla 26. Límites de detección en humor vítreo (SPE)

DROGA	LOD (ng/mL) (n=5)
MRF	29
COD	14
6AM	25
COC	12
BEG	10
CET	28
EDDP	24
MTD	28

Los límites de detección obtenidos para SPE son comparables a los publicados por Logan et al [1] para determinar cocaína y BEG. En otros estudios realizados sobre la misma muestra, utilizando extracción en fase sólida y detección por HPLC-UV [39], GC-MS [40] o GC-FID [38], se obtuvieron valores de LOD para cocaína y BEG ligeramente superiores a los obtenidos en este estudio. Los métodos propuestos por Pragst et al [41] y Wyman et al [42] para la determinación de morfina y metabolitos utilizando GC-MS-MS mostraron resultados sustancialmente inferiores a los recogidos en este trabajo.

El valor de LLOQ (100 ng/mL) es similar al obtenido por Mackey-Bojack et al [40] y Fernandez et al [38] en la determinación de cocaína y metabolitos, utilizando cromatografía de gases como técnica de determinación. Por el contrario, Pragst et al [41] y Wyman et al [42] han comunicado valores de LOQ muy inferiores a los obtenidos en el presente estudio.

Teniendo en cuenta los niveles obtenidos frecuentemente en humor vítreo de cocaínómanos muertos por una sobredosis [38, 39, 43], los límites de detección y cuantificación calculados se pueden considerar aceptables en este tipo de muestra.

4.2.3. SELECTIVIDAD

Existen diferentes métodos para validar la selectividad. El más sencillo, cuando se trata de cromatografía, es demostrar la ausencia de respuesta en una muestra blanco de la matriz biológica en estudio. El análisis de humor vítreo blanco nos ha permitido concluir que no existen interferencias en los tiempos de retención de nuestros analitos (Figura 71).

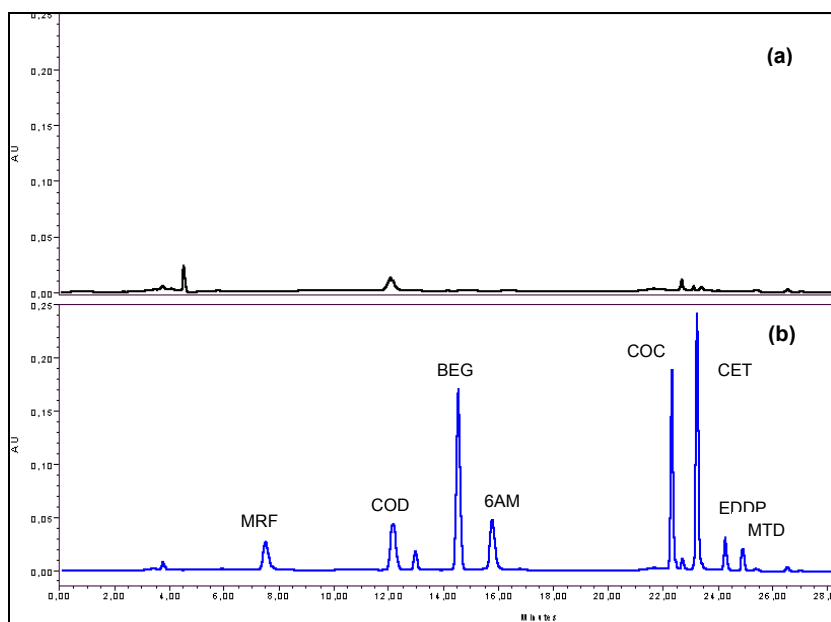


Figura 71. Cromatogramas de humor vítreo blanco (a) y de un estándar (b)

4.2.4 PRECISIÓN Y EXACTITUD

Se eligieron 3 niveles de concentración de las drogas de abuso en humor vítreo para realizar el estudio de la precisión y exactitud intra-día e inter-día. Los valores se calcularon sobre una recta de calibrado inyectada en la misma serie que los patrones en el caso del estudio intra-día, y sobre rectas de calibrado inyectadas en 5 días diferentes en el caso del estudio inter-día.

Tanto en los estudios intra-día como inter-día se han obtenido buenos resultados (tablas 27 y 28) observándose en los distintos replicados valores inferiores al 15% para el coeficiente de variación y el error relativo.

Tabla 27. Precisión y exactitud intra-día en humor vítreo (SPE)

	Concentración añadida (µg/mL)	Concentración media medida (µg/mL)	CV (%) (n=5)	Error Relativo (%) (n=5)
MRF	0,1	0,098	5,10	1,91
	1	0,98	1,85	1,64
	4	4,01	0,60	0,41
COD	0,1	0,094	3,40	4,52
	1	0,98	0,70	1,74
	4	4,03	0,57	0,68
6AM	0,1	0,098	4,32	1,34
	1	1,01	2,00	1,06
	4	4,02	0,85	0,57
COC	0,1	0,098	6,84	1,69
	1	0,99	2,63	0,91
	4	4,00	1,92	0,12
BEG	0,1	0,090	1,32	8,82
	1	1,03	1,35	3,18
	4	3,95	1,70	1,07
CET	0,1	0,10	3,00	1,52
	1	1,02	2,15	2,36
	4	4,03	0,69	0,65
EDDP	0,1	0,098	2,57	1,47
	1	1,03	1,60	2,9
	4	4,01	1,14	0,24
MTD	0,1	0,11	3,46	9,47
	1	1,01	1,00	1,34
	4	3,97	1,36	0,67

Tabla 28. Precisión y exactitud inter-día en humor vítreo (SPE)

	Concentración añadida (µg/mL)	Concentración media medida (µg/mL)	CV (%) (n=5)	Error Relativo (%) (n=5)
MRF	0,1	0,10	9,01	4,60
	1	0,98	1,23	1,34
	4	4,02	0,76	0,39
COD	0,1	0,10	12,87	2,78
	1	0,99	2,93	0,94
	4	4,01	0,08	0,25
6AM	0,1	0,10	5,98	4,86
	1	1,01	3,16	1,45
	4	4,02	0,36	0,45
COC	0,1	0,096	12,20	2,47
	1	0,99	3,85	1,06
	4	4,01	0,38	0,39
BEG	0,1	0,090	2,87	10,04
	1	1,01	3,85	0,88
	4	3,97	0,58	0,70
CET	0,1	0,10	6,25	5,26
	1	1,00	2,48	0,18
	4	4,03	0,51	0,76
EDDP	0,1	0,10	4,13	1,95
	1	0,99	4,89	1,21
	4	3,98	0,86	0,39
MTD	0,1	0,11	4,75	12,39
	1	0,97	4,59	2,92
	4	4,03	0,55	0,83

Si se comparan las tablas 27 y 28 se observa que la precisión y la exactitud son mejores para el estudio intra-día y para las concentraciones más altas (4 µg/mL).

En los ensayos intra-día, los coeficientes de variación están comprendidos entre 0,57% y 6,84% para la codeína y cocaína, respectivamente; mientras que los errores relativos oscilan entre 0,12% para la cocaína y 9,47% para la metadona.

En los ensayos inter-día, la precisión varía entre 0,08% y 12,87% para la codeína a las concentraciones de 4 µg/mL y 0,1 µg/mL, respectivamente; mientras que los errores relativos oscilan entre 0,18% para el cocaetilo a la concentración de 1 µg/mL y 12,39% para la metadona a la concentración de 0,1 µg/mL.

Los coeficientes de variación obtenidos son comparables a los de Fernández et al [39] para la cocaína en los estudios interdía, mientras que el valor obtenido para la BEG es inferior tanto en los estudios interdía como intradía. En una publicación posterior [38], utilizando la cromatografía de gases como técnica de determinación, se obtienen valores inferiores para la cocaína (3,4%), siendo similares a los obtenidos en el presente estudio en el ensayo intradía. En el estudio de Wymann et al [42] los valores de precisión para morfina y codeína son superiores (7% y 4%, respectivamente) a los reportados en este trabajo.

Con respecto al error relativo, Fernández et al [38] encuentra valores superiores para la cocaína (2,01%) y un valor similar para la BEG (3,20%). Por otra parte, Wymann et al [42] obtiene valores inferiores tanto para la morfina como para la codeína.

4.2.5. RECUPERACIÓN DEL MÉTODO

La recuperación se calcula comparando la señal de la muestra blanco a la que se añadió una determinada cantidad de analito antes de la extracción, con la señal de otras muestras blanco a las que se añadió la misma cantidad de analito después de la extracción. La recuperación del método fue estudiada también a los tres niveles de concentración utilizados en el estudio de precisión y exactitud (tabla 29 y figura 72).

Tabla 29. Recuperaciones en humor vítreo (SPE)

	Concentración real (µg/mL)	Concentración media obtenida (µg/mL) (n=5)	Recuperación (%) (n=5)
MRF	0,1	0,092	92,00
	1	0,83	83,20
	4	3,91	97,80
COD	0,1	0,090	90,00
	1	0,97	97,20
	4	3,88	96,95
6AM	0,1	0,096	95,00
	1	0,99	99,20
	4	3,89	97,25
COC	0,1	0,098	98,30
	1	0,95	94,85
	4	3,91	97,69
BEG	0,1	0,082	82,70
	1	0,93	93,35
	4	3,94	98,60
CET	0,1	0,092	92,00
	1	0,96	96,08
	4	3,84	95,97
EDDP	0,1	0,070	70,00
	1	0,62	62,40
	4	2,72	68,08
MTD	0,1	0,088	88,00
	1	0,71	70,83
	4	3,15	78,71

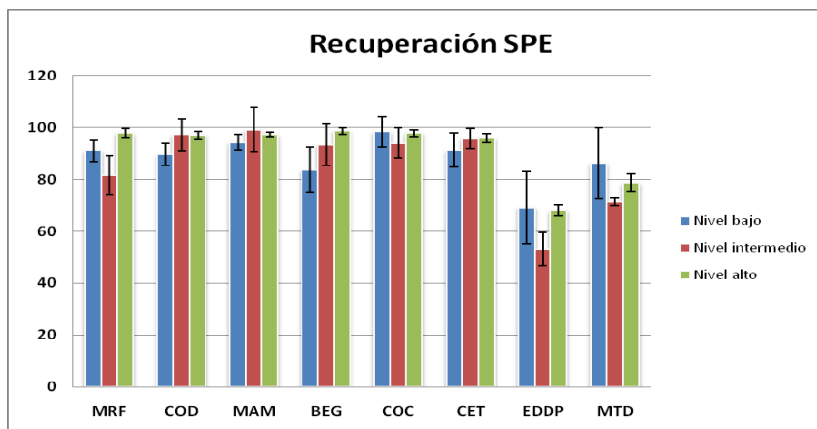


Figura 72. Recuperaciones en humor vítreo (SPE)

Los resultados obtenidos son mayores para la concentración más alta (4 $\mu\text{g/mL}$) de morfina y BEG, para la concentración intermedia (1 $\mu\text{g/mL}$) de codeína, 6AM y cocaetileno, y para la concentración más baja (0,1 $\mu\text{g/mL}$) de cocaína, EDDP y metadona.

Los valores medios de recuperación oscilan entre 67% para el EDDP y 97% para la 6AM. Del resto de las drogas, la cocaína es la que presenta recuperaciones medias más altas, seguida de la codeína y el cocaetileno.

La eficacia de la extracción ha sido superior para la BEG y la cocaína, al compararla con el estudio de Fernández et al [39], que publica unas recuperaciones de 92% y 72%, respectivamente. Sin embargo, al compararla con otros autores [1,39] se obtienen mejores rendimientos de extracción tanto para la cocaína como para la BEG.

4.3. APLICACIÓN A CASOS REALES

La aplicación del método ya validado a 15 muestras de humor vítreo, procedentes de individuos consumidores de opiáceos y/o cocaína, ha proporcionado los resultados recogidos en la tabla 30 y figura 73. A modo de ejemplo, se presenta el cromatograma correspondiente a la muestra número cuatro, en la Figura 74.

Tabla 30. Concentraciones en muestras reales de humor vítreo (SPE)

Muestra	Analito	Concentración (µg/mL)
1	BEG	6,84
	Cocaína	1,95
2	BEG	0,03
3	BEG	3,84
4	Morfina	0,15
	6AM	0,24
	BEG	1,98
	Cocaína	0,10
5	BEG	0,96
6	BEG	0,12
	Metadona	0,12
7	BEG	0,63
	Metadona	0,09
8	BEG	0,51
	Cocaetileno	0,15
	EDDP	0,69
9	BEG	0,66
	Codeína	0,06
10	BEG	0,60
11	EDDP	0,66
12	BEG	0,09
13	Metadona	0,11
	BEG	0,21
14	BEG	0,24
15	BEG	0,15

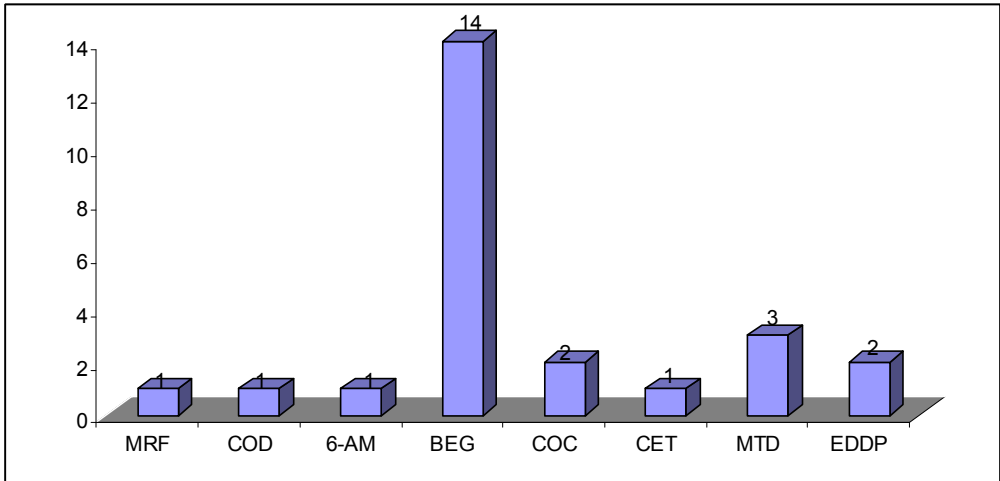


Figura 73. Número de casos positivos para cada sustancia

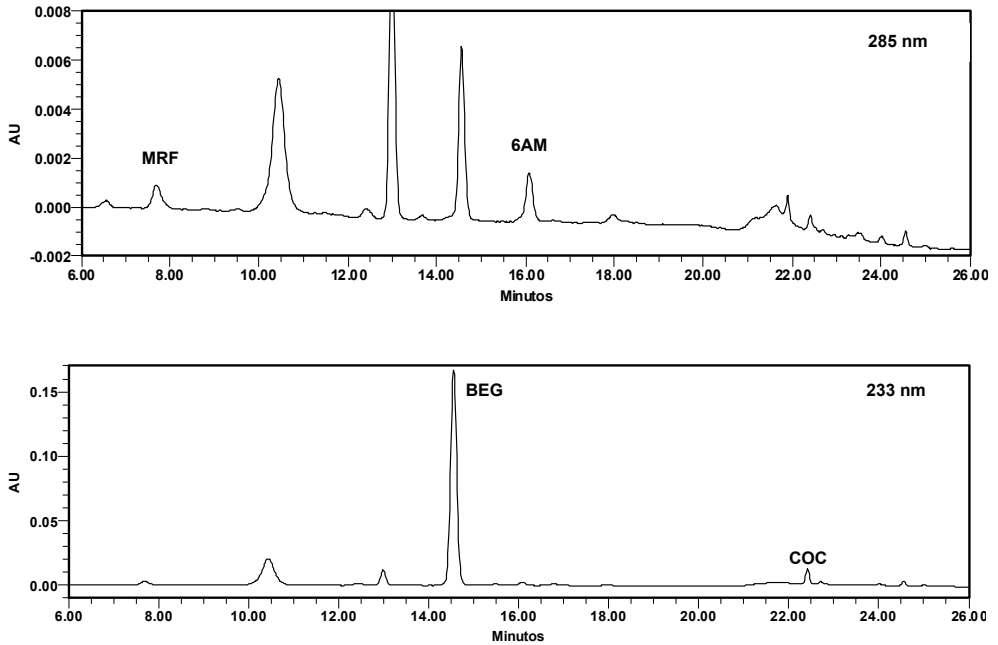


Figura 74. Cromatogramas del caso número 4

La BEG fue detectada en todas las muestras analizadas, seguida de la cocaína y metadona en el 20%, EDDP en el 13%, y morfina, codeína y 6AM en el 7% de los casos.

En cuanto al número de drogas implicadas en cada uno de los sujetos estudiados, se observan 8 casos con presencia única de cocaína y/o metabolitos, 4 casos asociados a consumo de cocaína y metadona, 2 casos debidos a intoxicación por heroína y cocaína y 1 caso de muerte relacionada sólo con metadona.

A diferencia de otros estudios [1, 39, 40] en los que se detecta BEG y cocaína simultáneamente en un gran número de casos, en nuestra serie sólo en 3 de los 15 casos se encuentran conjuntamente.

Las concentraciones encontradas para la BEG en las muestras analizadas están comprendidas en el rango 0,03 – 6,84 µg/mL, con un valor medio de $1,20 \pm 1,91$ µg/mL y mediana de 0,55 µg/mL, situándose la mayoría de ellos dentro del rango de concentraciones tóxicas e incluso letales, descritas para esta sustancia por Logan y Stafford [1], Fernández et al [38] y Mackey-Bojack et al [40].

4.4. EXTRACCIÓN ASISTIDA POR MICROONDAS (MAE)

Antes de realizar el diseño experimental se llevaron a cabo una serie de experiencias para acotar el número de factores que se incluirían en el mismo, así como los posibles niveles de dichos factores.

Se comenzó optimizando el disolvente de extracción, probando varias opciones: metanol, cloroformo, cloroformo-isopropanol (4:1, v/v), diclorometano-isopropanol (3:1, v/v) y diclorometano. El metanol, cloroformo y las mezclas con isopropanol no resultaron eficientes, pues las respuestas obtenidas (áreas) proporcionaban bajas recuperaciones para todas las drogas objeto de estudio. El diclorometano resultó ser el más adecuado (Figura 75), concluyendo que no será necesaria su inclusión como un factor en el diseño.

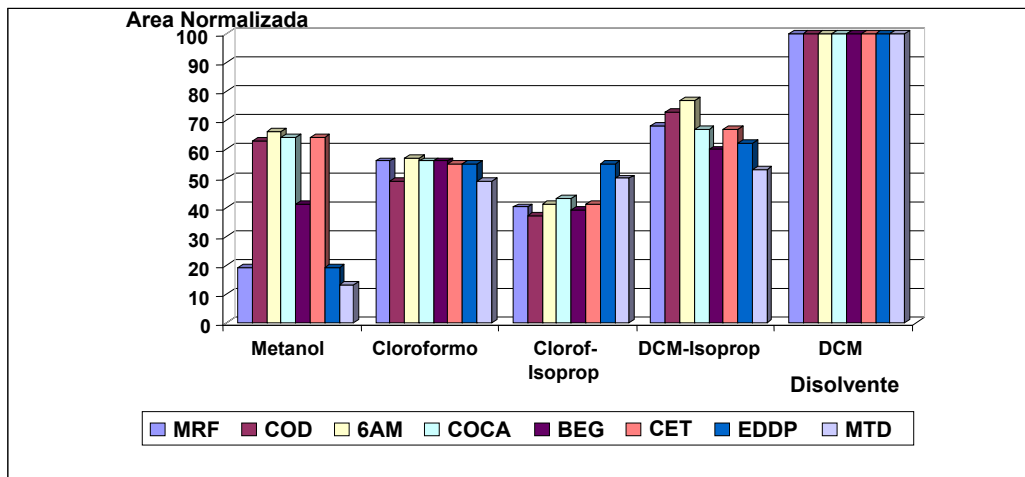


Figura 75. Respuestas de las drogas extraídas con distintos disolventes (MAE)

Se trabajó con los factores: volumen de disolvente, tiempo y temperatura de extracción, realizando experiencias desde 5 a 12 minutos y a 80°C. Para estudiar la influencia de los factores en el proceso de extracción se realiza un diseño de superficie de respuesta (*diseño central compuesto*). El objetivo es predecir el valor de la respuesta experimental en cualquier punto del dominio experimental de interés. En la tabla 31 se muestra el dominio experimental sobre el cual se realiza el diseño. Las tablas 32 y 33 recogen la matriz de experiencias y el plan de experimentación.

Tabla 31. Dominio experimental

	Factor	Unidad	Centro	Paso de variación
U1	Volumen disolvente	mL	10	3
U2	Temperatura	°C	80	18
U3	Tiempo	min	7	3

Tabla 32. Matriz de experiencias

N°Exp	X1	X2	X3
1	-1.00000	-1.00000	-1.00000
2	1.00000	-1.00000	-1.00000
3	-1.00000	1.00000	-1.00000
4	1.00000	1.00000	-1.00000
5	-1.00000	-1.00000	1.00000
6	1.00000	-1.00000	1.00000
7	-1.00000	1.00000	1.00000
8	1.00000	1.00000	1.00000
9	-1.68179	0.00000	0.00000
10	1.68179	0.00000	0.00000
11	0.00000	-1.68179	0.00000
12	0.00000	1.68179	0.00000
13	0.00000	0.00000	-1.68179
14	0.00000	0.00000	1.68179
15	0.00000	0.00000	0.00000
16	0.00000	0.00000	0.00000
17	0.00000	0.00000	0.00000

X1: Volumen de disolvente, X2: Temperatura, X3: Tiempo

Tabla 33. Plan de experimentación

N°Exp	Randomización	Volumen disolvente (mL)	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1	10	7	62	4
2	11	13	62	4
3	16	7	98	4
4	7	13	98	4
5	15	7	62	10
6	6	13	62	10
7	5	7	98	10
8	9	13	98	10
9	13	5	80	7
10	3	15	80	7
11	17	10	50	7
12	2	10	110	7
13	1	10	80	2
14	4	10	80	12
15	8	10	80	7
16	12	10	80	7
17	14	10	80	7

El sistema está descrito mediante el siguiente modelo polinómico de segundo grado:

$$Y = b_0 + b_1 * X_1 + b_2 * X_2 + b_3 * X_3 + b_{11} * (X_1 * X_1) + b_{22} * (X_2 * X_2) + b_{33} * (X_3 * X_3) + b_{12} * (X_1 * X_2) + b_{13} * (X_1 * X_3) + b_{23} * (X_2 * X_3)$$

Este diseño de superficie de respuesta utiliza 5 niveles para cada factor y 17 experiencias, 3 de ellas en el centro del dominio experimental para validar el modelo matemático.

4.4.1. VALIDACIÓN DEL DISEÑO

Las respuestas obtenidas para las muestras procedentes de las experiencias del diseño se han analizado con el programa *Nemrod W* (2000).

El análisis de varianza realizado muestra que el único factor estadísticamente significativo es el volumen de disolvente. Además, se observa que la influencia de los distintos niveles de cada factor sobre la respuesta de cada compuesto y las interacciones entre factores, siguen la misma tendencia para todas las drogas. A modo de ejemplo se muestran las figuras 76 y 77 obtenidas para la morfina.

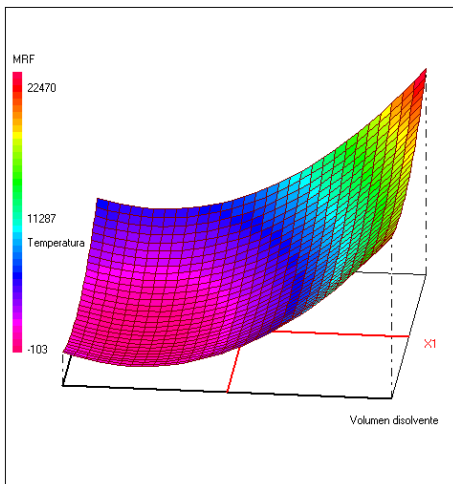


Figura 76. Variación de la respuesta de la morfina en el plano: temperatura-volumen disolvente
Manteniendo constante el tiempo, se observa que a temperatura alta y volumen de disolvente alto, se obtienen las mejores respuestas para la morfina.

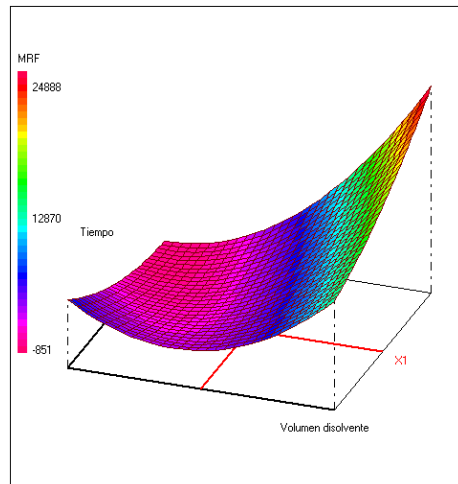


Figura 77. Variación de la respuesta de la morfina en el plano: tiempo-volumen disolvente
Manteniendo constante la temperatura, se observa que a tiempos altos y volumen de disolvente alto, se obtienen las mejores respuestas para la morfina.

A continuación se muestra la gráfica de la función de deseabilidad de la morfina (Figura 78), donde se observa el valor de área mínima aceptable y el valor diana. Hay que destacar que los valores los marca el experimentador en función de las exigencias que desee en el sistema estudiado y los valores obtenidos experimentalmente en cada punto del diseño. El programa busca los valores de las variables en las cuales se cumplan los requisitos marcados. La función de deseabilidad utilizada en todos los casos es una función unilateral izquierda no lineal (cóncava), de modo que la búsqueda es más exigente.

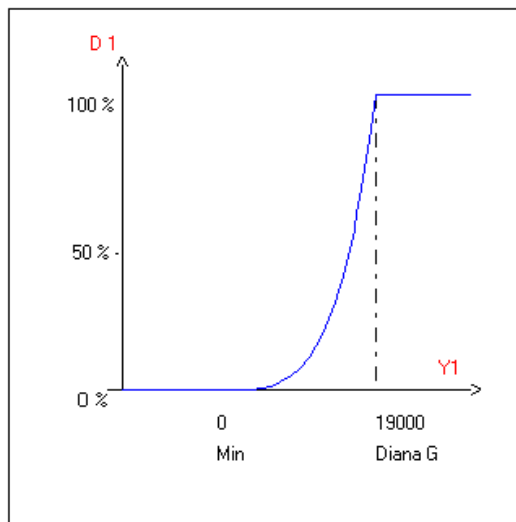


Figura 78. Función de deseabilidad de la morfina

Después de indicarle al sistema la función de deseabilidad de cada compuesto, se observa la respuesta gráfica en dos dimensiones en la que se pueden observar las curvas de isorespuesta; se observan las variaciones de las respuestas en función de las variables X1-X2, X1-X3 y X2-X3 (figuras 79-81).

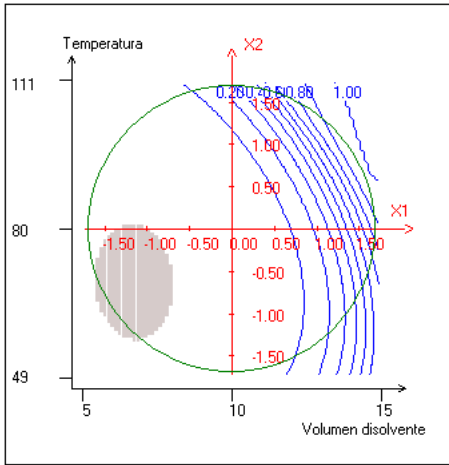


Figura 79. Variación de la deseabilidad en el plano: temperatura-volumen disolvente

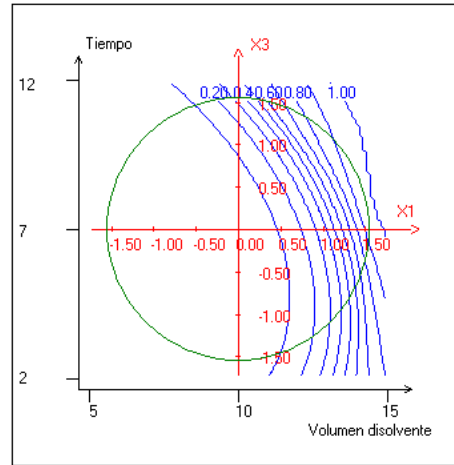


Figura 80. Variación de la deseabilidad en el plano: tiempo-volumen disolvente

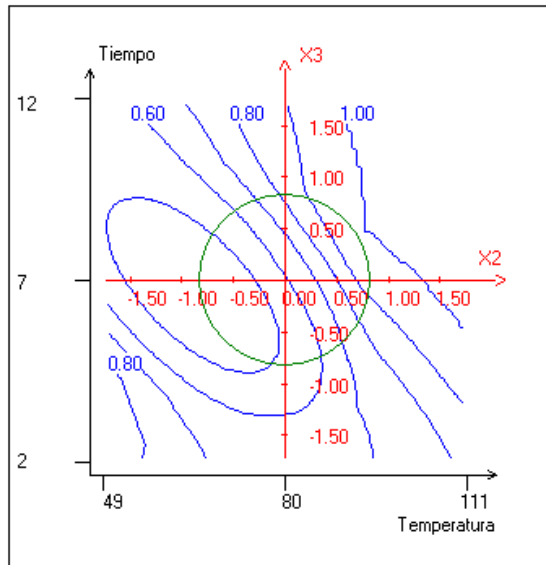


Figura 81. Variación de la deseabilidad en el plano: tiempo-temperatura

A la vista de las gráficas se puede observar que manteniendo constante una de las variables, la mejor respuesta se obtiene combinando valores altos de las otras dos.

Conclusiones del Diseño

De los resultados obtenidos en el diseño, podemos concluir que las condiciones óptimas del proceso de extracción para las drogas en muestras de humor vítreo utilizando extracción asistida por microondas (MAE) son 94°C de temperatura, 8 minutos de tiempo de extracción y 15 mL de disolvente, siendo este último factor el único estadísticamente significativo, por lo que debido a la aparición de un mayor número de interferencias en los cromatogramas cuando se realizaron las extracciones a 94°C, se decidió emplear una temperatura de 80°C, ya que el rendimiento del proceso no se veía afectado, y los cromatogramas aparecían más limpios, lo cual facilita la identificación y cuantificación de las sustancias de interés (tabla 34).

Tabla 34. Condiciones finales del proceso de extracción

FACTOR	VALOR
Vol. Disolvente	15 mL
Temperatura	80°C
Tiempo	8 min

4.4.2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO

4.4.2.1. LINEALIDAD Y ANÁLISIS DE REGRESIÓN

La linealidad del método se ha analizado elaborando rectas de calibrado de cada analito en humor vítreo, en el rango de concentraciones de 0,1 a 4 µg/mL, realizando tres replicados de cada nivel. Las figuras 82 a 84 muestran los cromatogramas de las drogas en humor vítreo, obtenidos a la concentración de 2 µg/mL para cada longitud de onda de trabajo.

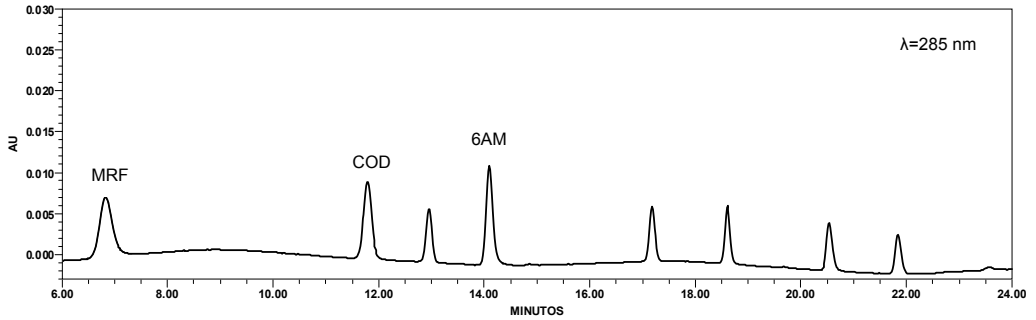


Figura 82. Cromatograma de Morfina, Codeína y 6AM

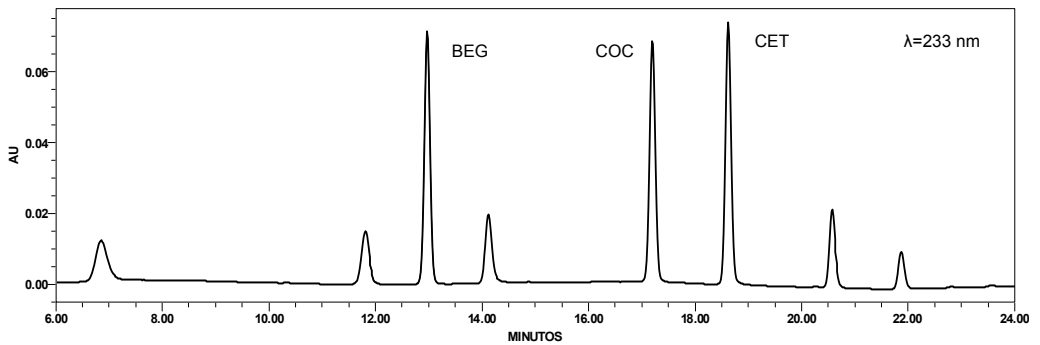


Figura 83. Cromatograma de BEG, Cocaína y Cocaetileno

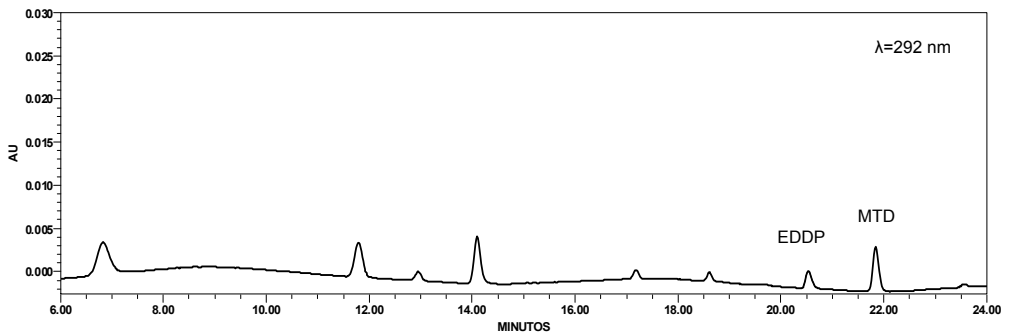


Figura 84. Cromatograma de EDDP y Metadona

Las áreas obtenidas nos permiten realizar un análisis de regresión ajustándose a un modelo lineal del tipo $y = ax + b$, donde a es la pendiente de la recta de regresión y b la ordenada en el origen. También se puede obtener el coeficiente de correlación, r , que muestra el grado de relación entre las variables x e y , siendo superior a 0,999 para las drogas en estudio.

Los valores de a y b, así como otros parámetros para estimar la validez del método aparecen en las tablas 35 y 36. Las figuras 85 a 92 muestran las representaciones gráficas de las rectas de calibrado en humor vítreo.

Tabla 35. Análisis de regresión en humor vítreo (MAE). Rango: 0,1 – 4 µg/mL

Drogas	Parámetro	Valor estimado	Error standard	Valor t	Nivel de probabilidad
MRF	b	165	410,55	0,401	0,694
	a	10638	218,36	48,717	0,000
COD	b	-292	205,43	-1,422	0,174
	a	14868	109,26	136	0,000
6AM	b	+172	556,27	0,310	0,760
	a	17378	296,86	58,737	0,000
BEG	b	-1500	2338,115	-0,642	0,530
	a	73873	1243,573	59,404	0,000
COC	b	+11912	5272,345	2,259	0,038
	a	199210	2804,201	71,040	0,000
CET	b	+1939	4445,807	0,436	0,669
	a	206690	2354,590	87,411	0,000
EDDP	b	+196	97,559	2,010	0,062
	a	2216	51,889	42,704	0,000
MTD	b	+127	203,117	-0,626	0,540
	a	3932	108,032	36,396	0,000

Tabla 36. Análisis de la varianza en humor vítreo (MAE). Rango: 0,1 – 4 µg/mL

Drogas	Coefficiente de correlación	Error standard	R-cuadrado (%)
MRF	0,997	1272,972	0,993
COD	1,0	636,954	0,999
6AM	0,998	1724,787	0,995
BEG	0,998	7249,614	0,99
COC	0,998	16347,553	0,997
CET	0,999	13784,770	0,998
EDDP	0,996	302,495	0,991
MTD	0,994	629,788	0,987

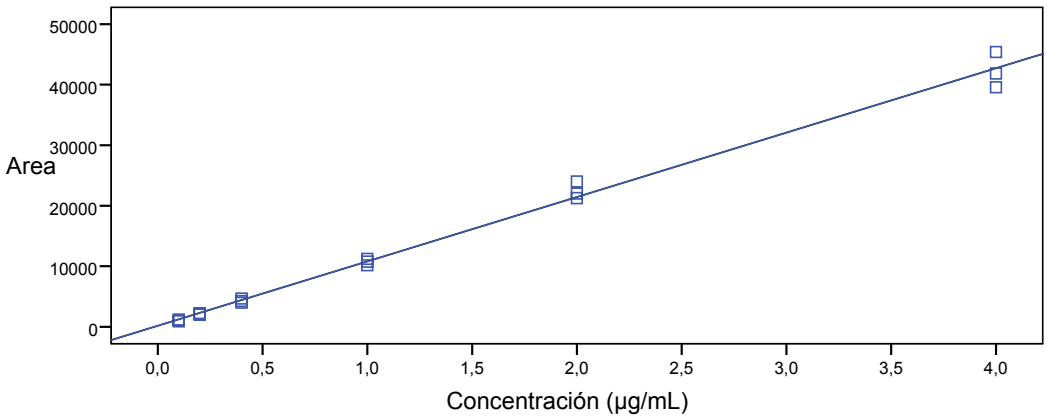


Figura 85. Recta de calibrado de Morfina en humor vítreo (MAE)

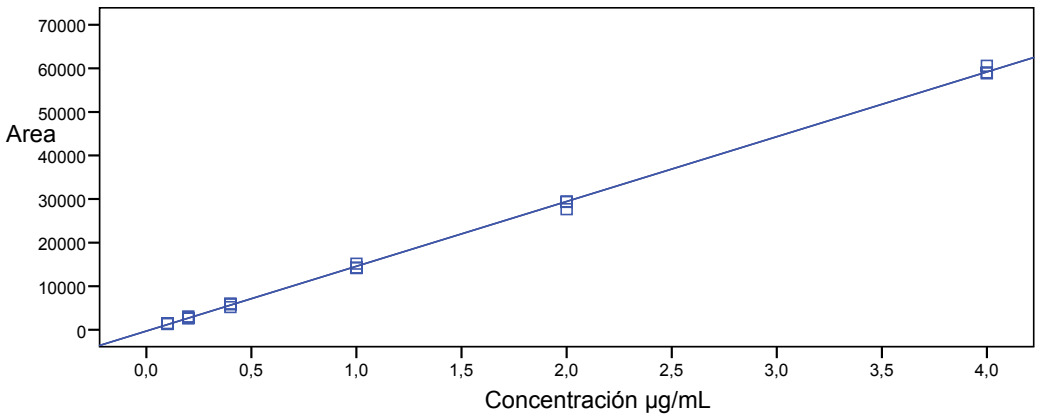


Figura 86. Recta de calibrado de Codeína en humor vítreo (MAE)

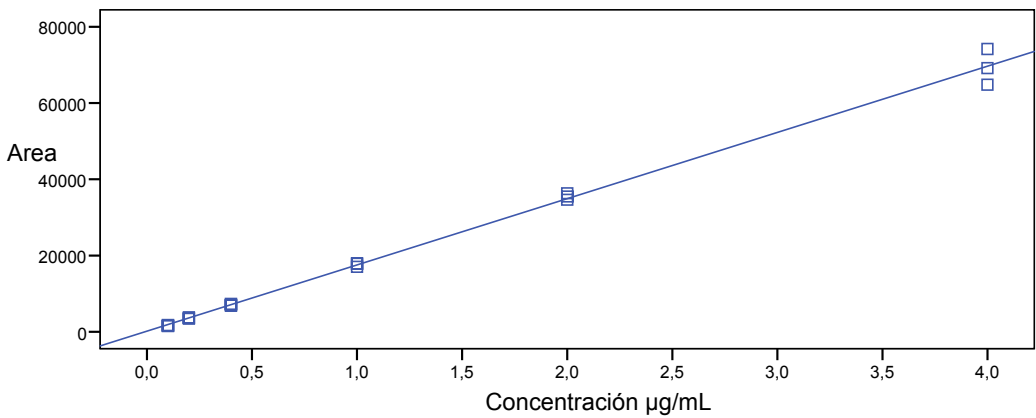


Figura 87. Recta de calibrado de 6AM en humor vítreo (MAE)

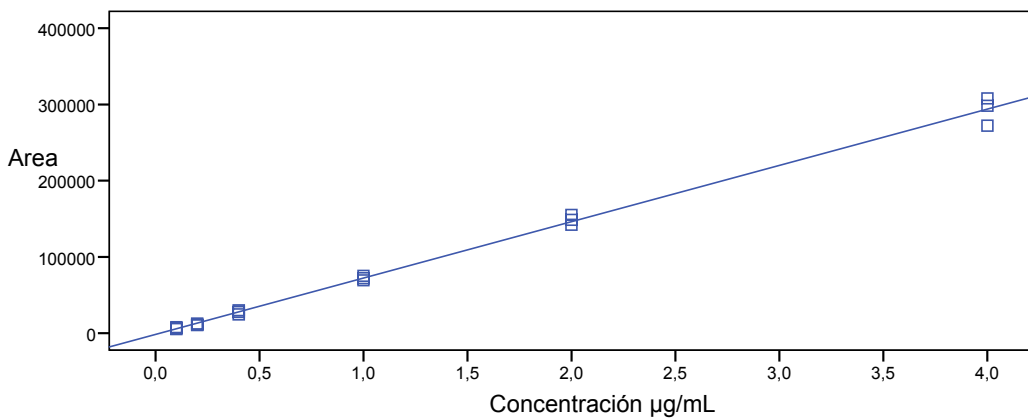


Figura 88. Recta de calibrado de BEG en humor vítreo (MAE)

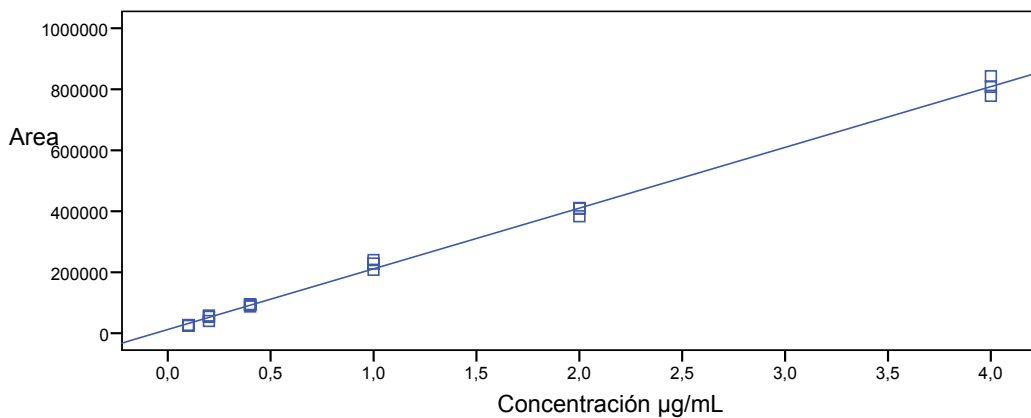


Figura 89. Recta de calibrado de Cocaína en humor vítreo (MAE)

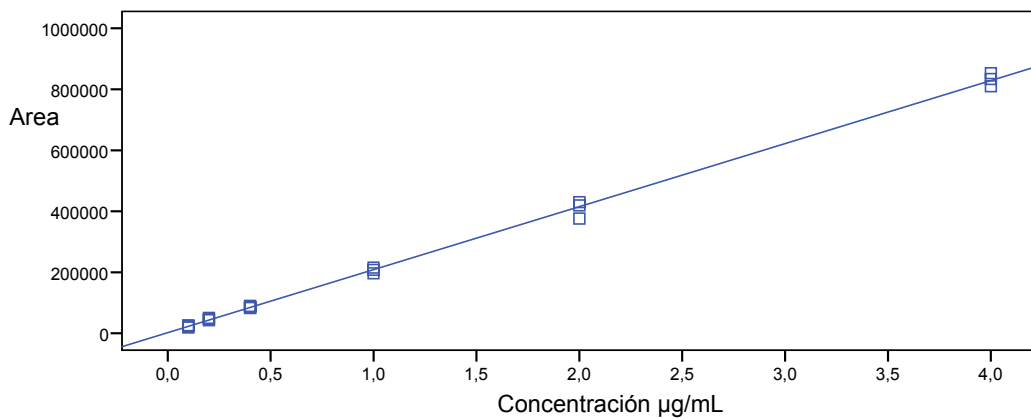


Figura 90. Recta de calibrado de Cocaetileno en humor vítreo (MAE)

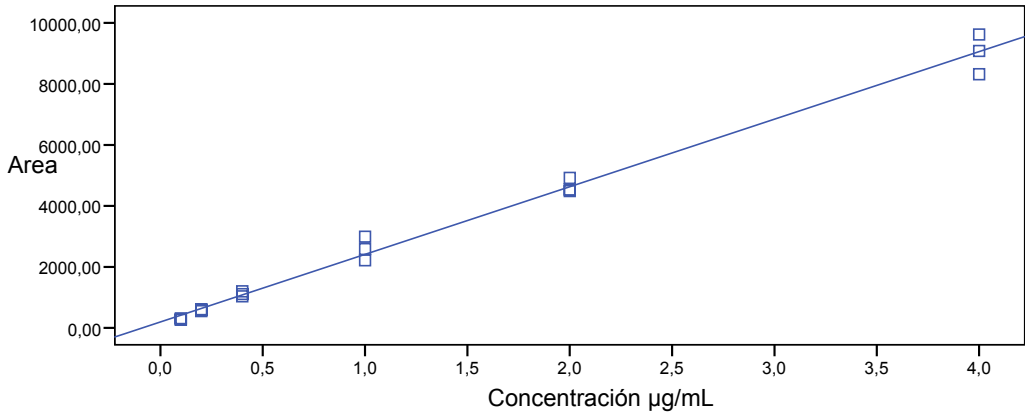


Figura 91. Recta de calibrado de EDDP en humor vítreo (MAE)

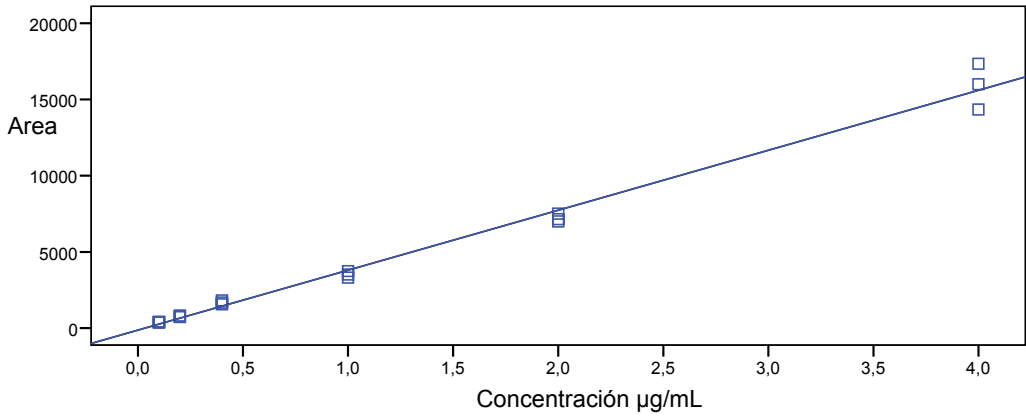


Figura 92. Recta de calibrado de Metadona en humor vítreo (MAE)

4.4.2.2. LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

El límite de detección definido como la menor concentración que alcanza un valor superior a tres veces la relación señal/ruido se obtuvo a partir de las áreas obtenidas a los tiempos de retención de los analitos en 5 inyecciones de muestras de humor vítreo blanco sometidas al proceso de extracción asistida por microondas (Tabla 37).

Tabla 37. Límites de detección en humor vítreo (MAE)

DROGA	LOD (ng/mL) (n=5)
MRF	60
COD	70
6AM	70
BEG	40
COC	70
CET	30
EDDP	30
MTD	40

Los valores obtenidos son aceptables para los fines propuestos en este trabajo ya que se han obtenido valores de LOD de 30 ng/mL (cocaetileno y EDDP) a 70 ng/mL (codeína, 6AM, cocaína) en humor vítreo. Para todos los analitos el límite de cuantificación es 100 ng/mL en humor vítreo, la concentración inferior del rango de calibración.

Los resultados obtenidos para los límites de detección y cuantificación de la cocaína y BEG son similares a los reportados por Mackey-Bojack et al [40]. El método propuesto por Fernández et al [38] para estos mismos analitos mostró resultados superiores para el límite de detección y similares para los límites de cuantificación.

En el caso de los opiáceos los estudios revisados [41, 42] utilizan cromatografía de gases-espectrometría de masas, y tanto los valores de LOD como los de LOQ son inferiores a los obtenidos con este método.

4.4.2.3. SELECTIVIDAD

Existen diferentes métodos para validar la selectividad. El más sencillo cuando se trata de cromatografía es demostrar la ausencia de respuesta en una muestra blanco de la matriz biológica en estudio. El análisis de muestras de humor vítreo blanco nos ha permitido concluir que no existen interferencias a los tiempos de retención de nuestros analitos. (Figura 93).

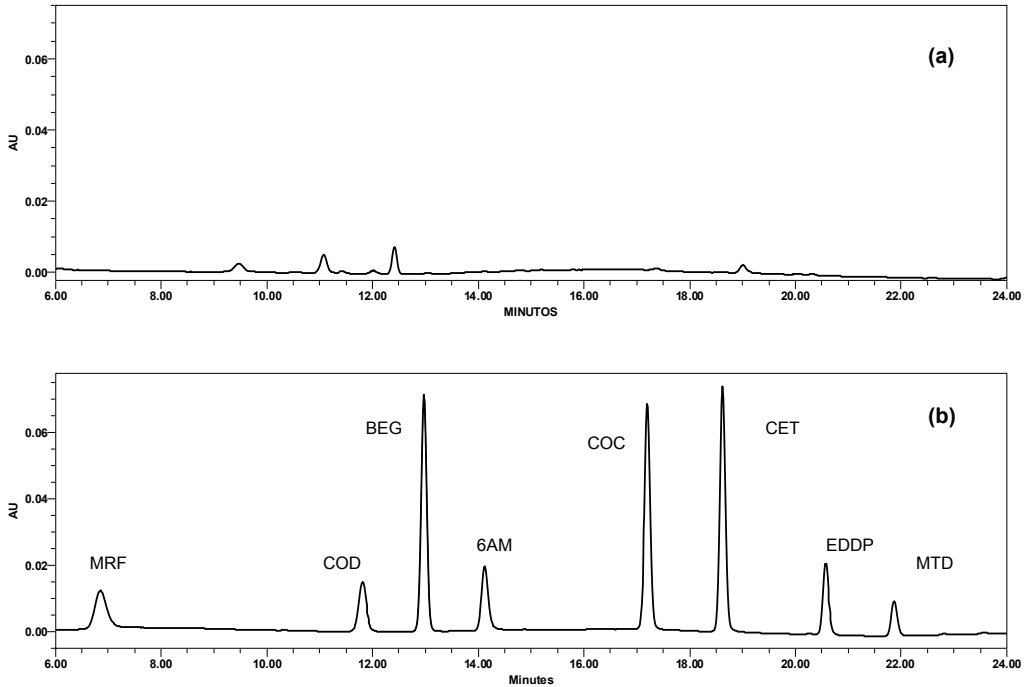


Figura 93. Cromatogramas de un blanco de humor vítreo (a) y un estándar (b)

4.4.2.4. PRECISIÓN Y EXACTITUD

Se eligieron 3 niveles de concentración de las drogas de abuso en humor vítreo para realizar el estudio de la precisión y exactitud inter-día e intra-día. Los valores se calcularon sobre una recta de calibrado inyectada en la misma serie que los patrones en el caso del estudio intra-día, y sobre rectas de calibrado inyectadas en 5 días diferentes en el caso del estudio inter-día. Las tablas 38 y 39 muestran los resultados obtenidos.

Tabla 38. Precisión y exactitud intra-día en humor vítreo (MAE)

	Concentración añadida (µg/mL)	Concentración media medida (µg/mL)	CV (%) (n=5)	Error Relativo (%) (n=5)
MRF	0,1	0,086	5,81	3,24
	1	1,02	1,03	2,39
	4	4,01	1,65	0,23
COD	0,1	0,098	2,78	1,36
	1	1,00	1,91	0,12
	4	4,09	0,89	2,42
6AM	0,1	0,10	2,54	3,48
	1	0,98	1,35	1,64
	4	3,99	0,48	0,27
BEG	0,1	0,10	1,65	2,60
	1	1,02	0,84	2,48
	4	4,02	0,86	0,40
COC	0,1	0,10	3,09	2,76
	1	1,02	2,70	1,76
	4	4,01	0,49	0,37
CET	0,1	0,10	2,66	1,84
	1	1,00	1,31	0,49
	4	3,99	0,49	0,30
EDDP	0,1	0,10	3,81	2,24
	1	1,00	2,42	0,64
	4	4,02	0,46	0,55
MTD	0,1	0,10	3,66	2,32
	1	1,01	2,12	1,17
	4	3,99	0,87	0,19

Tabla 39. Precisión y exactitud inter-día en humor vítreo (MAE)

	Concentración añadida ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración media medida ($\mu\text{g/mL}$)	CV (%) (n=5)	Error Relativo (%) (n=5)
MRF	0,1	0,10	3,17	2,51
	1	0,99	1,80	0,64
	4	4,00	0,27	0,11
COD	0,1	0,10	2,52	1,45
	1	1,00	0,95	0,09
	4	4,01	0,39	0,35
6AM	0,1	0,10	2,33	0,93
	1	1,01	1,08	0,61
	4	4,00	0,37	0,13
BEG	0,1	0,10	2,17	2,54
	1	1,00	0,13	0,25
	4	3,99	0,07	0,25
COC	0,1	0,10	0,59	1,58
	1	1,00	1,77	0,29
	4	4,00	0,55	0,12
CET	0,1	0,10	1,44	1,22
	1	1,01	1,76	1,18
	4	4,00	0,54	0,07
EDDP	0,1	0,10	1,59	0,20
	1	1,01	1,05	1,29
	4	3,98	0,27	0,40
MTD	0,1	0,098	1,59	2,71
	1	1,02	1,47	2,04
	4	4,00	0,57	0,07

En general, se obtienen mejores resultados de precisión y exactitud en los estudios inter-día y para la concentración más alta (4 $\mu\text{g/mL}$). Los valores para la precisión oscilan entre 0,46% y 5,81% (intra-día) y entre 0,07% y 3,17% (inter-día). Los valores para la exactitud están comprendidos entre 0,12% y 3,48% (intra-día) y entre 0,07% y 2,71% (inter-día).

En el método aplicado los valores medios de los coeficientes de variación de la cocaína y BEG para los ensayos inter-día (cocaína-BEG: 0,97–0,79%) e intra-día (cocaína-BEG: 2,1–1,1%) son inferiores a los detectados por Fernández et al [39] (7 y 6%, respectivamente). Al igual que en el método de Mackey-Bojack et al [40], los coeficientes de variación son inferiores al 3% para la cocaína, BEG y cocaetileno. En el caso de la morfina y codeína los valores detectados son inferiores a los determinados por Wyman et al [42].

Al igual que ocurre con la precisión, los errores relativos para cocaína y BEG en los ensayos inter-día (0,66-1,01%) e intra-día (1,63-1,83%) son inferiores a los determinados por Fernández et al [38].

4.4.2.5. RECUPERACIÓN DEL MÉTODO

La recuperación se calcula comparando la señal de la muestra blanco a la que se añadió una determinada cantidad de analito antes de la extracción, con la señal de otras muestras blanco a las que se añadió la misma cantidad de analito después de la extracción. El estudio fue hecho a los tres niveles de concentración utilizados en el estudio de precisión y exactitud. La tabla 40 y la figura 94 recogen los resultados obtenidos.

Tabla 40. Recuperaciones en humor vítreo (MAE)

	Concentración real (µg/mL)	Concentración media obtenida (µg/mL) (n=5)	Recuperación (%) (n=5)
MRF	0,1	0,080	80,00
	1	0,74	74,00
	4	2,78	72,50
COD	0,1	0,092	92,00
	1	0,83	82,80
	4	2,92	73,05
6AM	0,1	0,090	90,00
	1	0,73	73,01
	4	2,80	70,05
BEG	0,1	0,064	64,00
	1	0,58	58,00
	4	2,53	63,15
COC	0,1	0,090	90,00
	1	0,81	81,40
	4	3,08	77,00
CET	0,1	0,072	72,00
	1	0,77	76,90
	4	3,07	76,65
EDDP	0,1	0,058	58,00
	1	0,57	57,20
	4	2,27	56,75
MTD	0,1	0,062	62,00
	1	0,60	60,00
	4	2,32	58,00

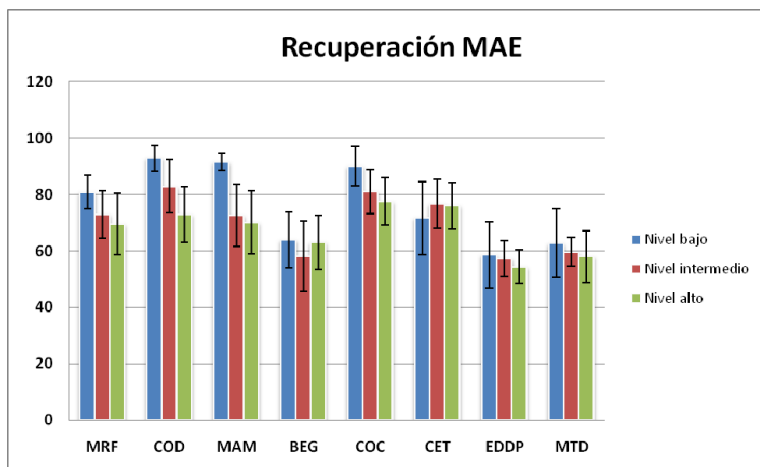


Figura 94. Recuperaciones obtenidas en humor vítreo usando MAE

Los valores de recuperación más elevados se encuentran a la concentración más baja (0,1 µg/mL), a excepción del cocaetileno.

Los resultados medios obtenidos fueron 75,5% para la morfina, 82,6% para codeína, 77,7% para 6AM, 61,7% para BEG, 82,8% para cocaína, 75,2% para cocaetileno, 57,3% para EDDP y 60,0% para metadona. Se pone de manifiesto que la cocaína y codeína son las drogas que se recuperan en mayor medida, seguidas de la 6AM, morfina y cocaetileno; los resultados obtenidos para las tres restantes se encuentran en torno al 60%. La eficacia de extracción del método propuesto es superior a los dos estudios de Fernández et al [38, 39] utilizando como técnica de determinación GC y HPLC, respectivamente.

4.4.3 APLICACIÓN A CASOS REALES

El método de determinación de opiáceos y/o cocaína fue aplicado a 10 muestras de humor vítreo procedentes de individuos consumidores de estas sustancias. La tabla 41 y la figura 95 reflejan los resultados obtenidos. La Figura 96 muestra el cromatograma correspondiente a la muestra número 8.

Tabla 41. Concentraciones en muestras reales de humor vítreo (MAE)

Muestra	Droga	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)
1	Cocaína	0,169
2	Morfina	0,512
	BEG	1,242
	Cocaína	0,274
	Metadona	0,269
3	Morfina	0,450
	Cocaína	0,372
4	Morfina	0,607
	BEG	2,208
	Cocaína	2,699
5	Morfina	0,370
6	Metadona	0,356
7	BEG	1,444
	Metadona	0,224
8	Cocaína	2,443
	BEG	1,711
9	BEG	0,270
10	BEG	1,805
	Cocaína	0,451
	Cocaetileno	0,284

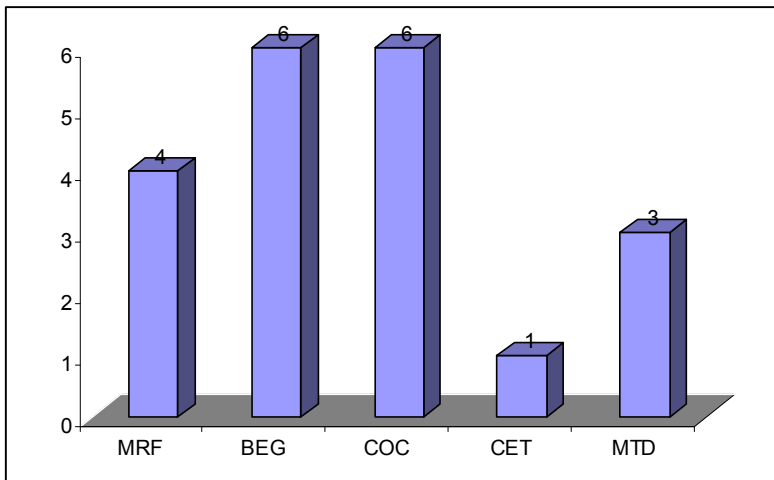


Figura 95. Número de casos positivos para cada droga en humor vítreo

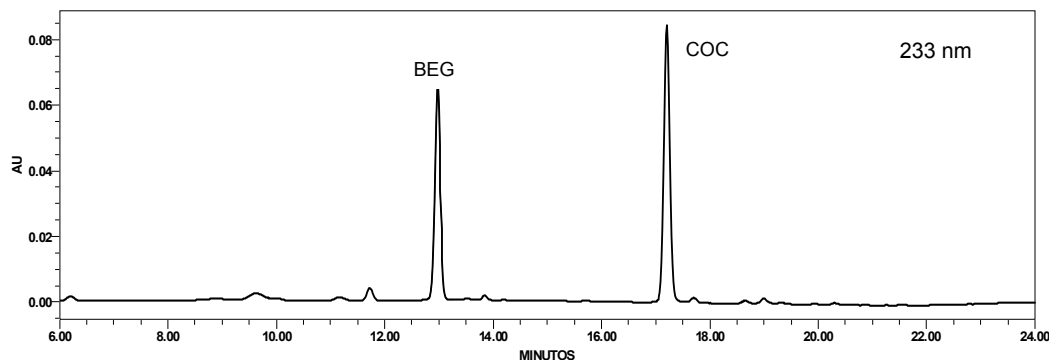


Figura 96. Cromatograma del caso número 8

Del total de 10 muestras analizadas, un 60% han sido positivas a cocaína y BEG, un 40% a morfina y un 30% a metadona. El consumo de cocaína aparece asociado a opiáceos en un 30% de los casos, y en un solo caso está asociado el consumo de opiáceos y cocaína a metadona. Estos resultados son comparables a los datos epidemiológicos recogidos por el OED [44], según los cuales la droga ilegal de mayor consumo es la cocaína.

En relación a los niveles hallados para las sustancias investigadas, se debe señalar lo siguiente: las concentraciones de cocaína y metabolitos oscilaron entre 0,17 y 2,44 $\mu\text{g/mL}$, con una media ($\pm\text{SD}$) de $1,07 \pm 1,17 \mu\text{g/mL}$ y una mediana de 0,41 $\mu\text{g/mL}$ para la cocaína; y entre 0,27 y 1,71 $\mu\text{g/mL}$, con un valor medio ($\pm\text{SD}$) de $1,45 \pm 0,66 \mu\text{g/mL}$ y una mediana de 1,58 $\mu\text{g/mL}$ para la BEG. De acuerdo con los resultados de Logan y Stafford [1] y Mackey-Bojack et al [40] se encuentran niveles más elevados para la cocaína (75% de los casos) que para la BEG, mientras que en otros estudios [38, 45] los valores mayores corresponden a la cocaína en un 75% y 77% de los casos, respectivamente.

En la bibliografía consultada [38, 40, 43, 46] los rangos de niveles hallados en las muertes debidas a cocaína fueron de 0,24 a 7,1 $\mu\text{g/mL}$ para la cocaína y de 0,47 a 10,9 $\mu\text{g/mL}$ para la BEG. Nuestros hallazgos han sido similares, pero de todos modos debemos tener en cuenta la enorme variación en los niveles dados en los distintos casos consultados.

En el caso de los opiáceos y derivados, la concentración de morfina se sitúa entre 0,37 y 0,51 $\mu\text{g/mL}$ con un valor medio ($\pm\text{SD}$) de $0,48 \pm 0,10 \mu\text{g/mL}$ y una mediana de 0,48 $\mu\text{g/mL}$, mientras que la concentración de metadona oscila entre 0,22 – 0,27 $\mu\text{g/mL}$, con un valor medio ($\pm\text{SD}$) de $0,28 \pm 0,07 \mu\text{g/mL}$ y una mediana de 0,27 $\mu\text{g/mL}$. En nuestra serie, a diferencia de los estudios de Lin et al [47], Pragst et al [41] y Wyman et al [42], sólo se detecta morfina y en ningún caso codeína o 6AM. Las concentraciones detectadas para la morfina en este estudio son inferiores a las obtenidas por Pragst et al [41] y superiores a las publicadas por Wyman et al [42] y Fucci et al [45].

4.4.4. COMPARACIÓN DE RESULTADOS EN HUMOR VÍTREO USANDO SPE Y MAE

Se ha realizado la comparación del método de extracción optimizado mediante un diseño experimental (MAE) con un método clásico de SPE para extraer las drogas de abuso a partir de humor vítreo, con el fin de implementar el procedimiento más adecuado para los análisis rutinarios en nuestro laboratorio de Toxicología.

4.4.4.1. LINEALIDAD

La linealidad de ambos métodos se ha analizado elaborando rectas de calibrado de cada analito en humor vítreo en el rango de concentraciones de 0,1 a 4 $\mu\text{g/mL}$ y realizando tres replicados de cada nivel en ambos casos. La comparación entre los coeficientes de correlación para cada una de las drogas empleando la extracción en fase sólida y la extracción asistida por microondas se muestra en la tabla 42.

Tabla 42.-Comparación de los coeficientes de correlación en humor vítreo (SPE-MAE)

	Cfte. correlación (r) para SPE	Cfte. Correlación (r) para MAE
MRF	0,999	0,997
COD	0,999	1,000
6AM	1,000	0,998
COC	0,999	0,998
BEG	1,000	0,998
CET	0,999	0,999
EDDP	0,999	0,996
MTD	0,998	0,994

Como nos indican los coeficientes de correlación, ambos métodos presentan una excelente linealidad en el rango de concentración 0,1-4 µg/mL, siendo superiores en todos los casos a 0,99; aunque se puede observar una mejor correlación en el caso de la extracción en fase sólida.

El rango de trabajo fue elegido en función de la estimación de posibles valores de concentración presentes en el vítreo, y de los intervalos empleados por otros autores: 1 ng/mL–10 µg/mL [41] 0,5–10 µg/mL [39]; 0,5–20 µg/mL [38]. Se debe destacar la importancia de trabajar en un rango adecuado porque las concentraciones de las drogas pueden variar según el tipo de muestra, el período transcurrido entre la muerte y la toma de dicha muestra, etc.

4.4.4.2. LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

La tabla 43 y la figura 97 muestran los límites de detección y cuantificación obtenidos cuando se usa la extracción en fase sólida y la extracción asistida por microondas para la determinación de drogas de abuso en humor vítreo. En ambas técnicas de extracción y para todas las sustancias en estudio se acepta como límite inferior de cuantificación el estándar más bajo de la curva de calibrado que cumple las condiciones de precisión y exactitud requeridas.

Tabla 43. Comparación de los límites de detección y cuantificación en humor vítreo (SPE-MAE)

	LOD (ng/mL) SPE	LOD (ng/mL) MAE	LOQ (ng/mL) SPE y MAE
MRF	29	60	100
COD	14	70	100
6AM	25	70	100
COC	12	70	100
BEG	10	40	100
CET	28	30	100
EDDP	24	30	100
MTD	28	40	100

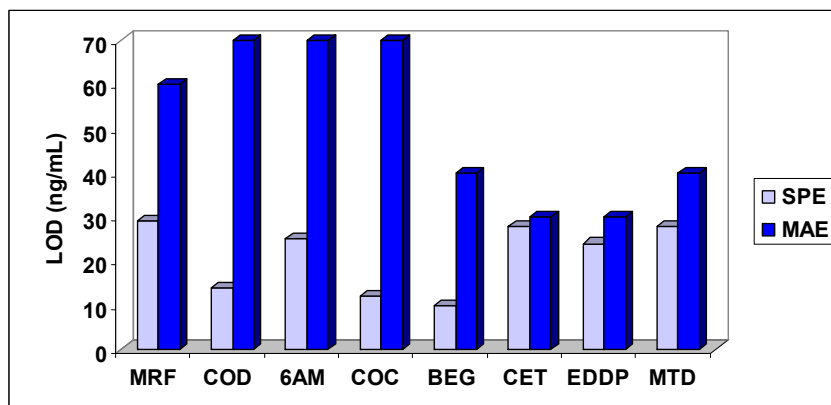


Figura 97. Comparación de los límites de detección en humor vítreo (SPE-MAE)

Como se puede observar, tras realizar la determinación cromatográfica de las drogas en humor vítreo después de una extracción en fase sólida, se obtienen unos límites de detección menores a los conseguidos cuando se usa la extracción asistida por microondas, pero en todos los casos los valores son adecuados para determinar la presencia de las sustancias estudiadas, teniendo en cuenta el rango seleccionado y las concentraciones obtenidas en el análisis de muestras reales [38, 43].

4.4.4.3. PRECISIÓN Y EXACTITUD

La precisión y exactitud cuando se usa MAE y SPE en la determinación de drogas en humor vítreo, muestran que ambos métodos de extracción poseen unos valores adecuados para los coeficientes de variación y los errores relativos, puesto que se ajustan a los criterios internacionales en relación con dichos parámetros. Sin embargo se pueden observar ciertas tendencias, reflejadas en la tabla 44.

Tabla 44. Comparación de la precisión y la exactitud en humor vítreo (SPE-MAE)

	Concent. añadida (µg/mL)	CV (%) (n=5) (SPE)	CV (%) (n=5) (MAE)	Error Relativo (%) (n=5) (SPE)	Error Relativo (%) (n=5) (MAE)
MRF	0,1	9,01	3,17	4,60	2,51
	1	1,23	1,80	1,34	0,64
	4	0,76	0,27	0,39	0,11
COD	0,1	12,87	2,52	2,78	1,45
	1	2,93	0,95	0,94	0,09
	4	0,08	0,39	0,25	0,35
6AM	0,1	5,98	2,33	4,86	0,93
	1	3,16	1,08	1,45	0,61
	4	0,36	0,37	0,45	0,13
BEG	0,1	2,87	2,17	10,04	2,54
	1	3,85	0,13	0,88	0,25
	4	0,58	0,07	0,70	0,25
COC	0,1	12,20	0,59	2,47	1,58
	1	3,85	1,77	1,06	0,29
	4	0,38	0,55	0,39	0,12
CET	0,1	6,25	1,44	5,26	1,22
	1	2,48	1,76	0,18	1,18
	4	0,51	0,54	0,76	0,07
EDDP	0,1	4,13	1,59	1,95	0,20
	1	4,89	1,05	1,21	1,29
	4	0,86	0,27	0,39	0,40
MTD	0,1	4,75	1,59	12,39	2,71
	1	4,59	1,47	2,92	2,04
	4	0,55	0,57	0,83	0,07

Teniendo en cuenta los datos individuales para cada uno de los niveles de concentración estudiados puede resultar complicado comparar la precisión y exactitud de ambos métodos. Tomando como referencia los valores medios correspondientes a cada droga se observa que los dos métodos ofrecen unos resultados muy semejantes, con coeficientes de variación medios entre 2,43 y 5,48 para SPE y entre 0,79 y 1,75 para MAE. Los valores medios de los errores relativos oscilan entre 1,18 y 5,38 para SPE y entre 0,56 y 1,61 para MAE. En términos de exactitud parece que la MAE se muestra algo superior al método de extracción en fase sólida, si bien la diferencia no es remarcable. En cuanto a la precisión ocurre prácticamente lo mismo a la hora de comparar sus coeficientes de variación.

Al contrastar estos datos con otros publicados hay que tener en cuenta el nivel de concentración ya que, como se puede apreciar en la tabla 44, los valores varían notablemente si nos desplazamos desde el nivel más bajo al más alto, en el que los coeficientes de variación y errores relativos son más bajos.

4.4.4.4. RECUPERACIÓN

Las recuperaciones obtenidas para las drogas a partir del humor vítreo, usando MAE o SPE, muestran que ambos procedimientos de extracción proporcionan unos valores que se ajustan a los criterios internacionales en relación con dicho parámetro. Sin embargo se pueden observar ciertas variaciones, reflejadas en la tabla 45 y en la figura 98.

Tabla 45. Comparación de las recuperaciones en humor vítreo (SPE-MAE)

	Concentración (µg/mL)	Recuperación (%) (n=5) (SPE)	Recuperación (%) (n=5) (MAE)
MRF	0,1	91,08	80,00
	1	82,78	72,80
	4	97,81	72,50
COD	0,1	89,78	92,00
	1	97,21	82,80
	4	96,95	73,05
6AM	0,1	95,00	90,00
	1	99,14	72,60
	4	97,27	70,05
BEG	0,1	83,70	64,00
	1	93,34	58,00
	4	98,58	63,15
COC	0,1	98,30	90,00
	1	94,97	81,40
	4	97,73	77,00
CET	0,1	91,30	72,00
	1	96,08	76,60
	4	95,97	76,65
EDDP	0,1	69,08	58,00
	1	52,09	57,20
	4	68,06	54,25
MTD	0,1	86,21	62,00
	1	70,83	59,60
	4	78,71	58,00

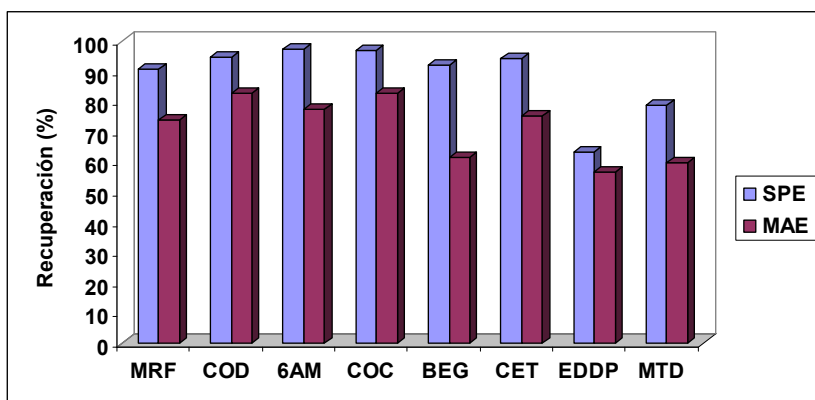


Figura 98. Comparación de las recuperaciones en humor vítreo (SPE-MAE)

Comparando los valores mostrados se observa una clara diferencia a favor de la extracción en fase sólida. En el método de extracción asistida por microondas sólo los valores medios de morfina, codeína, 6AM, cocaína y cocaetileno superan el nivel de recuperación del 75%. Por el contrario, en SPE se observa como todos los valores medios de recuperación superan el 90%, excepto para EDDP y MTD. En ambos casos estas dos drogas son las que peor recuperación presentan, con valores en torno al 60% para MAE y algo superiores para SPE.

4.5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Logan BK, Stafford DT. High-Performance Liquid Chromatography with Column Switching for the Determination of Cocaine and Benzoyllecgonine Concentrations in Vitreous Humor. *J Forensic Sci* 35 (1990) 1303-1309.

[2] Svenson J-O. Determination of benzoyllecgonine in urine from drug abusers using ion pair high-performance liquid chromatography. *J Anal Toxicol* 10 (1986) 122-124.

[3] Theodoridis G, Papadoyannis I, Tsoukali-Papadoulou H, Vasilikiotis G. A comparative study of different solid phase extraction procedures for the analysis of alkaloids of forensic interest in biological fluids by RP-HPLC/diode array. *J Liquid Chromatogr* 18 (1995) 1973-1995.

[4] Achilli G, Cellerino GP, Melzi d'Eril GV, Tagliaro F. Determination of illicit drugs and related substances by high-performance liquid chromatography with an electrochemical coulometric-array detector. *J Chromatogr A* 729 (1996) 273-277.

[5] Ellerbe P, Tai SS-C, Christensen RG, Espinosa-Leniz R, Paule RC, Sander LC, Sniegoski LT, Welch MJ, White VE The certification of cocaine and benzoyllecgonine in a human urine standard reference material. *J Anal Toxicol* 16 (1992) 158-162.

[6] Ferrara SD, Tedeschi L, Frison G, Castagna F. Solid-phase extraction and HPLC-UV confirmation of drugs of abuse in urine. *J Anal Toxicol* 16 (1992) 217-222.

- [7] Zhaohui Z, Chenggong Z, Xiaoli S, Ming M, Bo C, Shouzhuo Y. Carrier-mediated liquid phase microextraction coupled with high performance liquid chromatography for determination of illicit drugs in human urine. *Anal Chim Acta* 621 (2008) 185-192
- [8] Fernandez P, Lafuente N, Bermejo AM, Lopez-Rivadulla M, Cruz A. HPLC determination of cocaine and benzoylecgonine in plasma and urine from drug abusers. *J Anal Toxicol* 20 (1996) 224-228.
- [9] Baliková M, Vercerková J. HPLC confirmation of cocaine and BEG in biological samples using photodiode-array detection after toxicological screening. *J Chromatogr B* 656 (1994) 267-273.
- [10] Clauwaert KM, Van Bocxlaer JF, Lambert WE, De Leenheer AP. Analysis of cocaine, BEG and cocaethylene in urine by HPLC with diode-array detection. *Anal Chem* 68 (1996) 3021-3028.
- [11] Antollini L, Suriano C, Grassi MC, Nencini P. Analysis of cocaethylene, benzoylecgonine and cocaine in human urine by high performance thin layer chromatography with ultraviolet detection: a comparison with high performance liquid chromatography. *J Chromatogr B* 751 (2001) 19-27.
- [12] Brunetto MR, Delgado Cayama Y, Gutiérrez García L, Galignani M, Obando MA. Determination of cocaine and benzoylecgonine by direct injection of human urine into a column switching liquid chromatography system with diode array detection. *J Pharm Biomed Anal* 37 (2005) 115-120.
- [13] Jeanville PM, Estapé ES, Torres Negrón I, Martí A. Rapid confirmation/quantitation of ecgonine methyl ester, benzoilecgonine, cocaine in urine using on-line extraction coupled with fast HPLC and tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 25 (2001) 69-75.

- [14] Berg T, Lundanes E, Christophersen AS, Strand DH. Determination of opiates and cocaine in urine by high pH mobile phase reversed phase UPLC-MS/MS. *J Chromatogr B* 877 (2009) 421-432
- [15] Georv M, Nokua P, Vuori E, Ojanperä I. Simultaneous screening and quantification of 25 opioid drugs in post-mortem blood and urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Forensic Sci Int* 189 (2009) 36-43.
- [16] Coles, R.; Kushnir, M.M.; Nelson, G.J; McMillin, G.A. and Urry, F.M. Simultaneous Determination of Codeine, Morphine, Hydrocodone, Hydromorphone, Oxycodone, and 6-Acetylmorphine in Urine, Serum, Plasma, Whole Blood, and Meconium by LC-MS-MS. *J Anal Toxicol* 31 (2007) 1-14.
- [17] Gustavsson E, Andersson M, Stephanson N, Beck O. Validation of direct injection electrospray LC-MS/MS for confirmation of opiates in urine drug testing. *J Mass Spectrom* 42 (2007) 881-889.
- [18] Concheiro M, De Castro A, Quintela O, Cruz A, López-Rivadulla M. Determination of illicit Drugs and their Metabolites in Human Urine by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Including Relative Ion Intensity Criterion. *J Anal Toxicol* 31 (2007) 573-580
- [19] Shakleya, D.M; Dams R; Choo, R.E , Jones, H, Huestis, M.A. Simultaneous Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Quantification of Urinary Opiates, Cocaine, and Metabolites in Opiate-Dependent Pregnant Women in Methadone-Maintenance Treatment. *J Anal Toxicol* 34 (2010) 17-25.
- [20] Bresolle F, Bromet-Petit M, Audran M. Validation of liquid chromatographic methods. Applications to pharmacokinetics. *J. Chromatogr*, 686 (1996) 3-10.
- [21] U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. "Guidance for industry, bioanalytical method validation" (2001). <http://www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.pdf>.

[22] Shah VP, Midha KK, Findlay JWA, Hill HM, Hulse JD, McGilveray IJ, McKay G, Miller KJ, Patnaik RN, Powell ML, Tonelli A, Viswanathan CT, Yacobi A. Bioanalytical Method Validation - A Revisit with a Decade of Progress. *Pharmaceutical Research*, 17 (2000) 1551-1557.

[23] Peters FT, Maurer HH. Bioanalytical method validation and its implications for forensic and clinical toxicology - A review. *Accred Qual Assur* 7 (2002) 441-449.

[24] Cheng YF, Neue UD, Woods LL. Novel high performance liquid chromatography and solid-phase extraction methods for quantitating methadone and its metabolite in spiked human urine. *J Chromatogr B* 729 (1999) 19-31.

[25] Foulon C, Menet MC, Manuel N, Pham-Huy C, Galons H, Claude JR, Guyon F. Rapid analysis of benzoylecgonine, cocaine and cocaethylene in urine, serum and saliva by isocratic high performance liquid chromatography with diode array detection. *Chromatographia* 50 (1999) 721-727.

[26] Jamdar SC, Pantuck CB, Diaz J, Mets B. A rapid, sensitive assay for cocaine and its metabolites in biological fluids using solid phase extraction and high performance liquid chromatography. *J Anal Toxicol* 24 (2000) 438-441.

[27] Dams R, Benijts T, Lambert WE, De Leenheer AP. Simultaneous determination of in total 17 opium alkaloids and opioids in blood and urine by fast liquid chromatography-diode-array detection-fluorescence detection after solid-phase extraction. *J Chromatogr B* 773 (2002) 53-61.

[28] Johansen SS Bhatia, HM, Quantitative analysis of cocaine and its metabolites in whole blood and urine by high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B* 852 (2007) 338-34.

- [29]. Jagerdeo E, Montgomery MA, Sibum M, Sasaki TA, LeBeau MA. Rapid analysis of cocaine and metabolites in urine using a completely automated solid-phase extraction-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method. *J Anal Toxicol* 32 (2008) 570-576.
- [30] Soriano T, Jurado C, Menéndez M, Repetto M.. Improved solid phase extraction method for systematic toxicological analysis in biological fluids. *J Anal Toxicol* 25 (2001) 137-143.
- [31] Low AS, Taylor RB. Analysis of common opiates and heroin metabolites in urine by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B* 663 (1995) 225-233.
- [32] Li S, Gemperline PJ, Briley K, Kazmierczak S. Identification and quantitation of drugs of abuse in urine using the generalized rank annihilation method of curve resolution. *J Chromatogr B* 655 (1994) 213-223.
- [33] Yawney J, Treacy S, Hindmarsh KW, Burczynsky FJ. A general screening method for acidic, neutral and basic drugs in whole blood using the Oasis MCX[®] column. *J Anal Toxicol* 26 (2002) 325-332.
- [34] Peterson KL, Logan BK, Christian GD. Detection of cocaine and its polar transformation products and metabolites in human urine. *Forensic Sci Int* 73 (1995) 183-196.
- [35] Pereiro C, Bermejo AM, Fernández P, Tabernero MJ. Deaths from drug abuse in Northwestern Spain, 1992-97. *Addiction Biology* 8 (2003) 89-95.
- [36] Moffat AC, Osselton MD, Widdop B. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material. Pharmaceutical Press, London, 2004.

[37] Fernández P, Vázquez C, Morales L, Bermejo AM. Analysis of opiates, cocaine and metabolites in urine by high-performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD). *J Appl Toxicol* 25 (2005) 200-204.

[38] Fernández P, Aldonza M, Bouzas A, Lema M, Bermejo AM, Tabernero MJ. GC-FID determination of cocaine and its metabolites in human bile and vitreous humor. *J Appl Toxicol* 26 (2006) 253-257.

[39] Fernández P, Rodríguez P, Bermejo AM, López-Rivadulla M, Cruz A. Simultaneous Determination of Cocaine and Benzoylcegonine in Vitreous Humor by HPLC. *J Liquid Chromatogr* 17(4) (1994) 883-890.

[40] Mackey-Bojack S, Kloss J, Apple F. Cocaine, cocaine metabolite and ethanol concentrations in postmortem blood and vitreous humor. *J Anal Toxicol* 24 (2000) 59-65.

[41] Pragst F, Spiegel K, Leuschner U, Hagger A. Detection of 6-Acetylmorphine in vitreous humor and cerebrospinal fluid-Comparison with urinary analysis for proving heroin administration in opiate fatalities. *J Anal Toxicol* 23 (1999) 168-172.

[42] Wyman J, Bultman S. Postmortem distribution of heroin metabolites in femoral blood, liver, cerebrospinal fluid, and vitreous humour. *J Anal Toxicol* 28 (2004) 260-263.

[43] Furnari C, Ottaviano V, Sacchetti G, Mancini M. A fatal case of cocaine poisoning in body packer. *J Forensic Sci* 47 (2002) 208-210.

[44] Observatorio Español sobre Drogas (OED). Informe 2009. Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas. <http://www..unad.org/>

[45] Fucci N, De Giovanni N, De Giorgio F, Liddi R, Chiarotti M. An evaluation of the Cozart® RapiScan system as an on site screening tool for drugs of abuse in a non-conventional biological matrix: vitreous humor. *Forensic Sci Int* 156 (2006) 102-105.

[46] Duer WC, Spitz DJ, McFarland S. Relationships between Concentrations of Cocaine and Its Hydrolysates in Peripheral Blood, Heart Blood, Vitreous Humor and Urine. *J Forensic Sci* 51 (2006) 421-425.

[47] Lin DL, Chen CY, Shaw KP, Havier R, Lin RL. Distribution of codeine, morphine and 6-acetylmorphine in vitreous humor. *J Anal. Toxicol* 21 (1997) 258-267.

Capítulo

10

Conclusiones

CONCLUSIONES

A lo largo de esta memoria se presentan varias metodologías analíticas para llevar a cabo la determinación de drogas de abuso y sus metabolitos en matrices biológicas empleando la extracción en fase sólida y la extracción asistida por microondas, y cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de array de diodos (HPLC-DAD) como técnica de determinación. A continuación se muestran las principales conclusiones que pueden extraerse de este trabajo.

PRIMERA

Se propone un método para la determinación de morfina, codeína, 6-acetilmorfina, cocaína, benzoilecgonina, cocaetileno, metadona y 2-etilen-1,5-dimetil-3,3-difenil-pirrolidina en muestras de orina, usando como procedimiento de separación la extracción en fase sólida y la cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de array de diodos.

SEGUNDA

En el proceso de extracción en fase sólida, se estudiaron las condiciones que afectan a cada una de las etapas, obteniéndose unas recuperaciones medias entre 60 y 97% cuando se usan cartuchos Bond Elut Certify y cloroformo-isopropanol (4:1) como eluyente. La validación del método analítico muestra un rango de linealidad de 0,2 a 10 µg/mL, con coeficientes de correlación superiores a determinación de 0,99. Los límites de detección son muy bajos, con unos valores entre 39 y 95 ng/mL. La reproducibilidad del método se ha estudiado a dos niveles de concentración, obteniéndose resultados excelentes, inferiores al 7% para los coeficientes de variación.

TERCERA

La aplicación de este método al análisis de 23 muestras de orina procedentes de sujetos adictos a drogas demuestra consumo de cocaína más metadona en 14 casos, cocaína más heroína en 11 casos y las tres drogas en 5 casos. Se observa una gran variabilidad entre los niveles encontrados, aunque hay una clara prevalencia de benzoilecgonina sobre cocaína en todos los sujetos estudiados, de EDDP sobre metadona en el primero y tercer grupo, y de morfina y 6-acetilmorfina sobre codeína en el segundo y tercer grupo.

CUARTA

Se desarrollaron dos métodos para la determinación de morfina, codeína, 6-acetilmorfina, cocaína, benzoilecgonina, cocaetileno, metadona y 2-etilen-1,5-dimetil-3,3-difenil-pirrolidina en muestras de humor vítreo usando sendos procedimientos de separación: extracción en fase sólida y extracción asistida por microondas, seguidos de cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector de array de diodos.

QUINTA

Se elaboraron las rectas de calibrado en humor vítreo en el rango de 0,1 a 4 µg/mL, aplicando los dos procesos de extracción. Para la extracción en fase sólida se emplearon cartuchos Oasis HLB con lavado a base de metanol, agua e hidróxido amónico, y elución con diclorometano, mostrándose unas recuperaciones medias entre 67% y 97%, unos límites de detección entre 10 y 29 ng/mL y unos coeficientes de variación menores del 13%.

La extracción asistida por microondas fue optimizada mediante un diseño de superficie de respuesta. Cuando se usan 15 mL de diclorometano a 80°C y durante 8 minutos, se obtienen unas recuperaciones medias entre 57% y 83%, unos límites de detección entre 30 y 70 ng/mL y unos coeficientes de variación inferiores al 6%.