



ESCOLA DE DOUTORAMENTO
INTERNACIONAL DA USC

Ana
Suárez García

Tese de doutoramento

Estudo da eliminación de
drogas de abuso do organismo
trala abstinencia, a través da
análise en pelo

Santiago de Compostela, 2024

TESE DE DOUTORAMENTO

**ESTUDO DA ELIMINACIÓN DE
DROGAS DE ABUSO DO ORGANIMO
TRALA ABSTINENCIA, A TRAVÉS DA
ANÁLISE EN PELO**

Ana Suárez García

Director: María Jesús Tabernero Duque

Iván Álvarez Freire

Titora: María Jesús Tabernero Duque

PROGRAMA DE DOUTORAMENTO EN AVANCES E NOVAS ESTRATEXIAS EN CIENCIAS FORENSES.

Conflicto de interese

A doutoranda declara non ter ningún conflito de interese en relación coa tese de doutoramento.

Agradecementos

O camiño para chegar a ser doutora, foi longo e desafiante, pero o apoio tanto persoal como académico de diversas persoas, fixo que se convertese en moito máis levado.

Chegado este momento, gustaríame expresar a miña máis sincera gratitude.

Á miña titora e directora, a Dra. María Jesús Tabernero Duque. En todos estes anos sempre houbo unha resposta ás miñas preguntas e unha solución aos problemas que fun atopando. A súa experiencia, paciencia e dedicación foron fundamentais para poder chegar ata este punto.

Ao meu director, o Dr. Iván Álvarez Freire. Grazas por todos os coñecementos compartidos no laboratorio; todo o apoio ofrecido foi indispensable.

A María Carril Quintas, coordinadora de Proxecto Home Santiago. Sen a súa total implicación e colaboración, sería imposible finalizar este estudo. Grazas por tanta amabilidade.

Á Dra. Ana Bermejo Barrera, por brindarme a oportunidade de realizar este estudo no seu grupo de investigación.

A todas as miñas amizades. Especialmente a aquelas que mostraron interese desde o principio ata o día de hoxe, e me sacaron un sorriso nas horas difíciles, incluso desde a distancia.

E por último, á miña familia. Aos meus pais, que me ensinaron, me valoraron, me quixeron e me proporcionaron todo o que necesitaba. A miña tía María, por tanta empatía e cariño; por rescatar a confianza en min mesma e axudar a non renderme.

*“O mistério das coisas? Sei lá o que é mistério!
O único mistério é haver quem pense no mistério.
Quem está ao sol e fecha os olhos,
Começa a não saber o que é o sol
E a pensar muitas cousas cheias de calor.
Mas abre os olhos e vê o sol,
E já não pode pensar em nada,
Porque a luz do sol vale mais que os pensamentos
De todos os filósofos e de todos os poetas.
A luz do sol não sabe o que faz
E por isso não erra e é comum e boa.”*

Fernando Pessoa

Índice

Abreviaturas e acrónimos	iii
Resumo	v
I. Introducción	1
1. Análise de pelo en Toxicoloxía Forense.....	2
1.1. Anatomía e fisioloxía do pelo.....	3
1.2. Mecanismo de incorporación das drogas no pelo	4
1.3. Limitacións do pelo como matriz biolóxica.....	6
1.4. Aplicacións da análise en pelo en Toxicoloxía Forense.....	6
2. Drogas de abuso	11
2.1. Epidemioloxía do consumo de drogas.....	14
2.2. Cocaína	15
2.2.1. Aspectos xerais.....	15
2.2.2. Estrutura e farmacoloxía.....	15
2.2.3. Formas de abuso	16
2.2.4. Metabolismo e eliminación	16
2.3. Opiáceos	18
2.3.1. Aspectos xerais.....	18
2.3.2. Estrutura e farmacoloxía.....	18
2.3.3. Formas de abuso	19
2.3.4. Metabolismo e eliminación	19
2.4. Cannabis	20
2.4.1. Aspectos xerais.....	20
2.4.2. Estrutura e farmacoloxía.....	21
2.4.3. Formas de abuso	22
2.4.4. Metabolismo e eliminación	22
3. Protocolo de análise das drogas de abuso en pelo.....	24
3.1. Recollida da mostra	24
3.2. Eliminación da contaminación externa	25
3.3. Extracción dos analitos da matriz	25
3.4. Determinación dos compostos estudados	27
4. Importancia do control de pacientes en programas de deshabitación a drogas de abuso.....	28
II. Xustificación e obxectivos	30

III. Metodoloxía	33
1. Material e instrumentación xeral.....	35
2. Determinación de cocaína, benzoilecgonina e cocaetileno en pelo.....	36
2.1. Reactivos e substancias patrón.....	36
2.2. Condicións cromatográficas.....	36
2.3. Procedemento analítico.....	37
3. Determinación da codeína, morfina e 6-MAM en pelo.....	40
3.1. Reactivos e substancias patrón.....	40
3.2. Condicións cromatográficas.....	40
3.3. Procedemento analítico.....	41
4. Determinación de cannabinoides en pelo.....	42
4.1. Reactivos e substancias patrón.....	42
4.2. Condicións cromatográficas.....	42
4.3. Procedemento analítico.....	43
IV. Resultados e discusión	48
1. Estudo da eliminación de cocaína, benzoilecgonina e cocaetileno do organismo trala abstinencia.....	50
1.1. Resultados da validación da metodoloxía analítica.....	50
1.2. Análise de resultados dos casos en programas de rehabilitación.....	52
2. Estudo da eliminación da morfina, codeína e 6-MAM do organismo trala abstinencia.....	57
2.1. Resultados da validación da metodoloxía analítica.....	57
2.2. Análise de resultados dos casos en programas de rehabilitación.....	59
3. Estudo da eliminación de cannabinoides do organismo trala abstinencia.....	63
3.1. Resultados da validación da metodoloxía analítica.....	63
3.2. Análise de resultados dos casos en programas de rehabilitación.....	65
4. Discusión xeral.....	66
5. Dificultades e limitacións do estudo.....	68
V. Conclusións	69
VI. Bibliografía	71
Anexos	82

Abreviaturas e acrónimos

6-MAM	6-Monoacetilmorfina
APA	Asociación Americana de Psicología
BEG	Benzoilecgonina
BSTFA	N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida
CBD	Cannabidiol
CBN	Cannabinol
CE	Cocaetileno
COVID-19	Enfermedade do coronavirus
CV	Coeficiente de variación
DSM-5	Manual Diagnóstico e Estatístico dos Trastornos Mentais
DTT	1,4-Ditiotreitól
EDADES	Enquisa sobre Alcohol e outras Drogas en España
EMCDDA	Observatorio Europeo das Drogas e das Toxicomanías
EME	Ecgonina metil éster
EtG	Etilglucurónido
EtS	Sulfato de etilo
FAEE	Ésteres etílicos de ácidos graxos
FDA	Administración de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos
GC-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
LC-MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas
LLE	Extracción líquido-líquido
LLOQ	Límite inferior de cuantificación
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
LSD	Dietilamida do ácido lisérxico
MDMA	3,4-Metilendioximetanfetamina
MOP	Metoxifenamina
OEDA	Observatorio Español sobre Drogas e Adiccions
RIA	Radioinmunoensaio
RSD	Desviación Estándar Relativa
S/N	Relación Sinal/Ruído
SNC	Sistema Nervioso Central

SoHT	Sociedade da Análise en Pelo
SPE	Extracción en Fase Sólida
THC	Δ^9 -Tetrahidrocannabinol
THC-COOH	(\pm)-11-Nor-9-carboxi- Δ^9 -tetrahidrocannabinol
TMCS	Clorotrimetilsilano
TRIS	Tris(hidroximetil)-aminometano
UE	Unión Europea
UNODC	Oficina das Nacións Unidas contra a Droga e o Delito
VIH	Virus da Inmunodeficiencia Humana
WADA	Axencia Mundial Antidopaxe
WHO	Organización Mundial da Saúde

Resumo

Nos últimos anos, houbo un aumento significativo no uso de matrices biolóxicas alternativas no campo da Toxicoloxía Clínica e Forense. Estas matrices complementan a información obtida mediante a análise de matrices tradicionais coma o sangue e a urina, e ofrecen unha toma de mostra menos invasiva e máis sinxela. O pelo, en particular, destaca coma unha alternativa moi útil debido á súa extensa ventá de detección, que pode abarcar meses ou incluso anos. Isto permite levar a cabo estudos retrospectivos do consumo e establecer perfís cronolóxicos.

Un dos inconvenientes desta mostra é a dificultade para asegurar a existencia dun cese do consumo recente, xa que as drogas de abuso poden seguir incorporándose ao pelo durante un tempo, tralo inicio da abstinencia. Isto ocasiona importantes problemas aos pacientes en períodos de deshabitución, moitas veces inmersos en procesos xudiciais polos que deben demostrar a súa abstinencia. Por isto, o principal obxectivo desta Tese Doutoral foi analizar mostras de pelo de persoas adictas crónicas ás principais drogas de abuso (cocaína, opiáceos, e cannabis) que iniciaron un proceso de deshabitución, para coñecer o período no cal a droga deixa de aparecer no cabelo, e tras o cal se pode afirmar que o resultado da análise da mostra é totalmente negativo. As probas corresponden a pacientes nun programa de rehabilitación de drogas, que comezaron a abstinencia no momento da primeira toma de mostra. Cada suxeito proporcionou mostras de pelo en intervalos de 2 meses, desde o seu ingreso no programa ata os 6 meses.

Desenvolvéronse e validáronse dous métodos analíticos (un para determinación de cocaína e opiáceos, e outro para a determinación de cannabinoides) o suficientemente sensibles e específicos xa que, por unha parte a cantidade de mostra dispoñible non sempre é moi abundante e, por outra, ao estudar a eliminación das drogas no cabelo, as cantidades destas encontradas foron baixas. A técnica analítica empregada foi o GC-MS, debido á súa alta resolución e sensibilidade.

Os resultados obtidos demostran que, tanto para cocaína como para opiáceos, son necesarios 6 meses para poder asegurar a súa completa desaparición do pelo, polo que un resultado positivo obtido neste período no necesariamente obedece a una recaída no consumo da droga estudada.

I. Introducción

1. Análise de pelo en Toxicoloxía Forense

A Toxicoloxía Forense representa un conxunto de disciplinas orientadas a axudar na detección e interpretación de drogas e substancias tóxicas con fins médico-legais. A súa aplicación evolucionou substancialmente nas últimas décadas e converteuse nunha especialidade forense principal que require persoal experimentado con altas habilidades analíticas no uso das técnicas instrumentais, e con criterio para adaptar unha investigación e ofrecer unha visión da posible importancia dos resultados.

A análise de mostras biolóxicas converteuse nun elemento fundamental na identificación e no tratamento do abuso de drogas. A urina e o sangue continúan sendo as matrices biolóxicas principais, debido a que a incorporación de substancias estupefacientes nestes fluídos foi amplamente estudada e a avaliación e interpretación dos resultados é unha práctica habitual nos laboratorios de toxicoloxía. Porén, nos últimos anos comezouse a empregar matrices alternativas que presentan numerosas vantaxes en comparación coas mostras tradicionais. Isto logrouse grazas aos avances recentes de técnicas analíticas altamente sensibles, que permiten o uso de matrices nas que se dispón pouca cantidade de mostra e con baixas concentracións de analito [1].

No que concirne ás mostras biolóxicas alternativas, o pelo comezou a ser utilizado como mostra biolóxica xa nos anos sesenta, cando os avances na química analítica facilitaron a análise de arsénico en fibras de cabelo da cabeza tomadas de Napoleón I despois da súa morte en Santa Helena, iniciando unha longa controversia sobre o que significaban realmente os resultados obtidos [2]. Anos máis tarde, concretamente en 1979 publicouse o primeiro traballo sobre o uso do cabelo para detectar o consumo de drogas; mediante a técnica de radioinmunoensaio (RIA), Baumgartner e colaboradores puideron identificar a morfina no pelo dos consumidores de heroína [3]. A recollida da mostra de forma sinxela e non invasiva, a ampla ventá de detección de drogas e a maior estabilidade post mortem da matriz do cabelo en comparación coas matrices clásicas como o sangue ou urina, contribuíron ao desenvolvemento e refinamento de metodoloxías analíticas específicas.

No ano 1995 fundouse a *Society of Hair Testing* (SoHT), cunha rede mundial de membros involucrados na análise en pelo e que estableceu unha serie de directrices para orientar a análise de todo tipo de xenobióticos (drogas, fármacos, hormonas, contaminantes ambientais, etc.) en toxicoloxía clínica e forense [4]. É importante destacar que a SoHT establece os estándares analíticos para garantir o uso da mostra de pelo e a súa aceptación como proba nun proceso xudicial.

Para comprender e interpretar completamente os resultados das probas de cabelo, é esencial que se teña unha comprensión clara do mecanismo e dos factores que inflúen na incorporación de drogas ao cabelo en crecemento, incluída a contaminación e outros factores que afectan á perda da droga incorporada. Neste apartado abordaranse as rutas de incorporación e a importancia do proceso de extracción da droga, para garantir unha mostra representativa que permita a investigación toxicolóxica, así como as posibles limitacións que afectan á perda do analito en cuestión.

1.1. Anatomía e fisioloxía do pelo

O obxectivo principal do cabelo humano é a protección da superficie da pel de lesións e axudar a regular a temperatura corporal. A fibra de pelo, visible sobre a superficie da pel, está formada por proteínas (65-95 % esencialmente queratina), auga (15-35 %), lípidos (1-9 %) e minerais (<1 %), sendo a cutícula a capa protectora externa [5]. A estrutura externa do pelo está constituída pola envoltura, que abarca a maior parte da fibra do cabelo, e tamén contén células da cutícula onde se encontra a melanina, o pigmento principal do pelo. A rexión máis interna é a medula (Figura 1). O folículo piloso encóntrase a 3-4 mm por debaixo da superficie da pel e é a estrutura clave responsable do crecemento do pelo. As células localizadas na rexión inferior do bulbo da raíz teñen actividade mitótica, e a queratinización ten lugar a medida que os queratinocitos (células especializadas que producen a queratina) se desprazan cara a parte superior do bulbo da raíz. En cambio na base do bulbo atópase a papila dérmica, onde se produce o subministro do sangue [6].

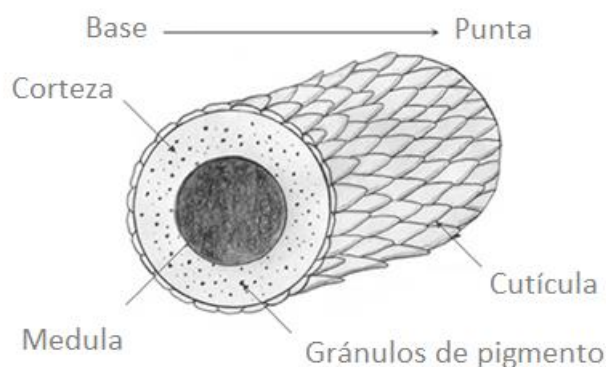


Figura 1. Sección transversal do pelo (Elaboración propia).

Existen diversos factores que afectan ao crecemento do cabelo, como son a idade, a fase de desenvolvemento, o sexo, trastornos metabólicos e xenéticos, a nutrición ou os cambios estacionais [7]. Este crecemento é un proceso cíclico impulsado polos cambios de actividade das citoquinas e divídese en tres fases: anáxena, catáxena e telóxena. A fase anáxena pode durar varios anos e caracterízase pola división das células na base do folículo piloso que dá lugar ao crecemento do cabelo, estimándose que o 85 % do pelo no coiro cabeludo atópase en fase anáxena. A fase catáxena, con duración de varias semanas, é de transición, cesando a actividade celular, polo que se encolle o folículo piloso. A fase telóxena é de repouso xa que o folículo piloso está inactivo e como consecuencia non hai crecemento do pelo. Esta última fase pode durar varios meses e calcúlase que o 10-15 % do cabelo se atopa nela nun momento dado [8].

A SoHT recomenda considerar unha taxa de crecemento promedio de 1 cm por mes para o pelo da cabeza. A zona occipital do coiro cabeludo ten a porcentaxe máis alta de folículos en fase anáxena e é a que presenta menor variabilidade na velocidade de crecemento, por esta razón se recomenda tomar a mostra de pelo desta zona [4].

1.2. Mecanismo de incorporación das drogas no pelo

Os mecanismos exactos polos cales as drogas ou os analitos de interese se incorporan no pelo, ademais dos factores que afectan á súa estabilidade, non se coñecen na súa totalidade. É posible que as drogas circulen polo corpo e se incorporen ao pelo durante períodos de actividade metabólica e división celular, que equivale á fase anáxena do ciclo. Non obstante, hai tres rutas recoñecidas de adhesión das drogas, as cales son a incorporación directa desde o sangue, desde o sebo e a suor, e desde a contaminación externa (Figura 2). Non está claro en que medida cada unha destas rutas contribúe á absorción das drogas no pelo, pero o que si se sabe é que varía dunha droga a outra [6].

Propuxéronse diferentes modelos para explicar estas rutas de incorporación, dos cales o máis sinxelo é a difusión pasiva das drogas directamente desde o sangue ao folículo piloso. Coa difusión pasiva, agardaríase que a concentración das drogas en pelo fose proporcional á concentración en sangue no momento da formación do pelo. Non obstante, este modelo non explica os diferentes perfís metabólicos observados no pelo e no sangue. As drogas principais detéctanse con menor frecuencia no sangue en comparación cos metabolitos primarios correspondentes, mentres que no pelo, a presenza da droga principal é máis común [9].

É evidente que o pelo ten diferente capacidade de unión segundo o tipo de droga. O pK_a do analito, a súa estrutura, tamaño, lipofilidade, capacidade de unión a proteínas e afinidade pola melanina son factores coñecidos que afectan á velocidade de incorporación [10]. As drogas básicas, como as anfetaminas ou a cocaína, únense ao pelo con maior facilidade que as drogas ácidas ou neutras coma os cannabinoides ou as benzodiazepinas. Isto é debido a que o pH do plasma é 7.4, mentres que nos queratinocitos e melanocitos as condicións son moito máis ácidas ($pH = 3-6$), polo que se favorece a incorporación de drogas básicas a través do gradiente de pH.

Tamén se consideran outras rutas xa mencionadas, como son a través da suor e o sebo, dado que ambas secrecións bañan o folículo e polo tanto tamén contribúen á incorporación da droga no pelo. Xeralmente o que se atopou a través destas vías, foi a droga sen metabolizar.

A terceira ruta de incorporación a ter en conta é a contaminación externa. Esta pode ser debida á exposición pasiva ao estar cerca de persoas que consomen drogas, o manexo directo delas ou tocar superficies contaminadas. Segundo a condición na que se atope a mostra de pelo, (pode estar danada debido ao tratamento químico, desgaste natural que afecte á súa porosidade) a incorporación mediante esta ruta pode variar. Este é o principal motivo polo que todos os laboratorios de toxicoloxía que analizan mostras de pelo, incorporen á súa rutina un primeiro paso destinado á eliminación de posibles restos de contaminación externa da superficie do pelo xa que, pola contra, o resultado da análise non sería válido. Este protocolo de lavado inicial do pelo antes do proceso de extracción e análise, é fundamental para asegurara validez do resultado. A SoHT aconsella diversas pautas para o lavado do pelo co fin de eliminar a contaminación externa [4].

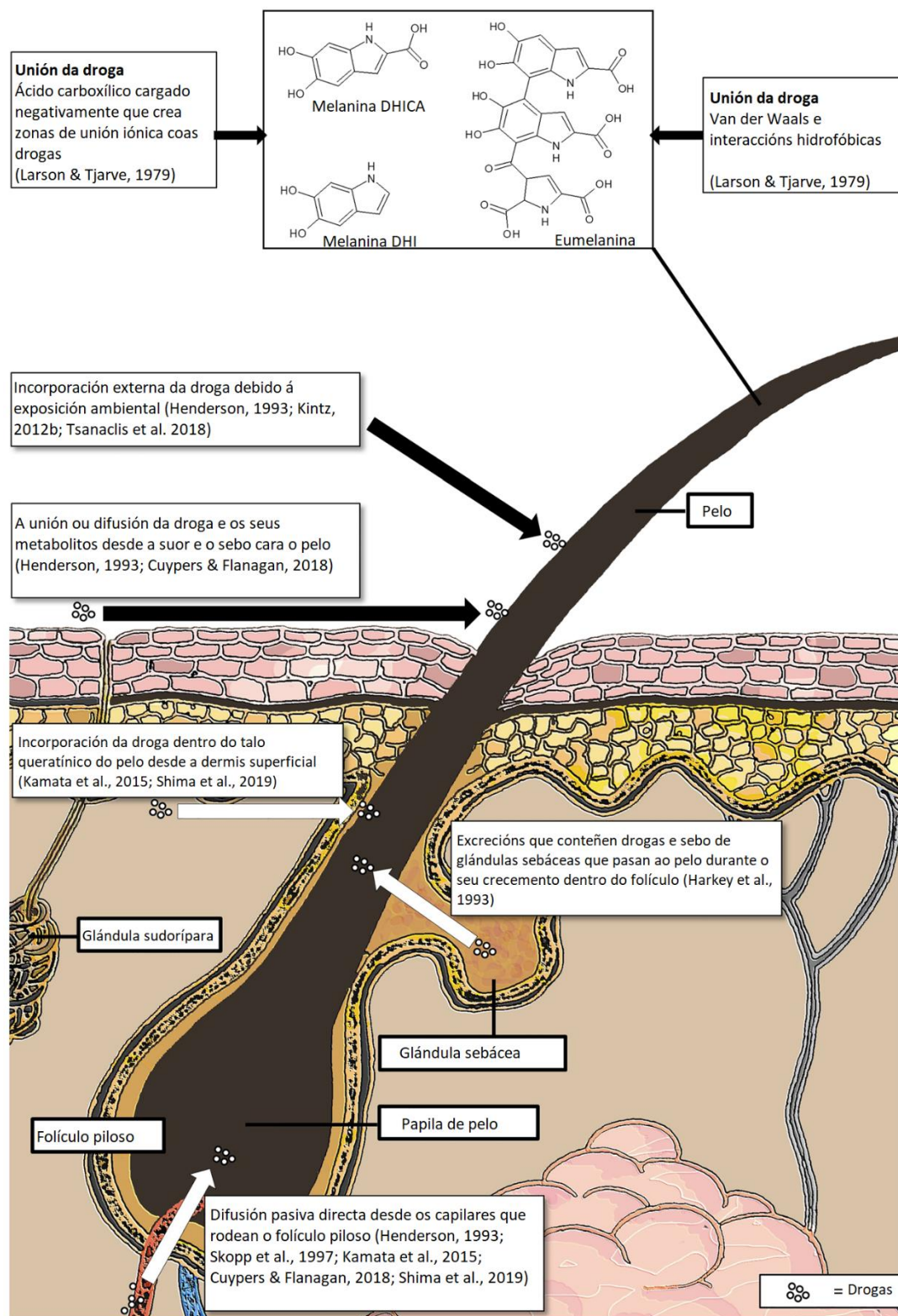


Figura 2. Rutas de incorporación propostas da droga no pelo. (Adaptado co permiso de [10]. Copyright 2020 John Wiley & Sons, Ltd.)

1.3. Limitacións do pelo como matriz biolóxica

É importante sinalar que o pelo empregado como matriz nas análises toxicolóxicas presenta algunhas limitacións. Entre elas destaca a dificultade da interpretación dos resultados da análise, a causa das baixas concentracións da droga e/ou metabolito e a posibilidade de interferencia/contaminación, debido a que son mostras complexas. O pelo funciona como un marcador de consumo crónico, pero non serve para avaliar un único consumo xa que as concentracións serían demasiado baixas, e polo tanto indetectables. Outro inconveniente é que a estimación do tempo e o modo de exposición mediante a análise en pelo aínda presenta un alto nivel de erro, xa que se o consumo se produciu recentemente (o mesmo día ou uns días antes da análise), non serviría como mostra de estudo porque non se detectaría a droga. Polo tanto non é posible determinar se un individuo se encontraba baixo o efecto dunha droga un día concreto; para iso sería necesario a análise doutra matriz, como pode ser o sangue. Este erro de estimación do tempo é debido a varios factores: o ciclo de crecemento do pelo, xa que pode variar dun individuo a outro; o mecanismo de incorporación da droga que, anque principalmente se incorpora á papila dérmica a través do torrente sanguíneo, tamén pode ser a través da secreción das glándulas sudoríparas e sebáceas ou da contaminación externa; e posibles erros na toma da mostra [11].

Por último, pese a que se están realizando numerosos estudos para intentar correlacionar a concentración detectada en pelo e a dose consumida, actualmente non é posible extrapolar a concentración obtida, coa cantidade consumida, posto que existe unha gran variabilidade interindividual na retención das drogas [12]. Polo tanto, a pesar da súa gran utilidade na detección do consumo de drogas, a análise en pelo presenta desafíos considerables que requiren un enfoque coidadoso na súa interpretación e aplicación. Hai factores individuais, como a cor de pelo, que inflúen nos resultados debido a que a melanina pode reter en menor ou maior medida a droga no pelo. Por iso, nos estudos con esta matriz, hai que ter en conta á hora de interpretar os resultados, este tipo de variables individuais que fan que non sexa posible unha estandarización na interpretación dos resultados.

1.4. Aplicacións da análise en pelo en Toxicoloxía Forense

A análise en pelo de substancias de abuso é importante na maioría das situacións clínicas e toxicolóxicas forenses, tanto para avaliar a realidade da exposición/intoxicación como para o estudo dun consumo nun período determinado.

A supervisión do uso de substancias mediante a análise en pelo resulta moito máis sinxela en comparación con outras matrices biolóxicas convencionais, como o sangue ou a urina. No caso do pelo so se require unha toma de mostra e unha análise, mentres que para o sangue e a urina deben tomarse 2-3 mostras por semana. Estas matrices presentan unha ventá de detección máis limitada que o pelo, o que significa que consumidores esporádicos que intercalan períodos de abstinencia, poderían dar resultados negativos nos controis.

Para obter maior información sobre o perfil cronolóxico de consumo de drogas de abuso, pode realizarse a análise en pelo mediante segmentación da mostra de estudo, polo que se deberán seguir os criterios de cut-off establecidos pola SoHT [4]. Como se explicou anteriormente, non é posible establecer unha correlación directa entre a cantidade de droga

consumida e a concentración detectada en pelo, non obstante, si é posible saber se consume cantidades elevadas, moderadas ou baixas en droga. A continuación cítanse os campos de aplicación máis habituais do pelo como matriz biolóxica na Toxicoloxía Forense:

- i. Seguimento dos programas de desintoxicación: O pelo proporciona información sobre exposición a drogas ao longo do tempo, polo tanto a súa análise pode ser útil para verificar historiais de consumo en calquera situación na que se desexe realizar un seguimento. Como se sinalou con anterioridade, a toma de mostra de pelo é menos invasiva e a periodicidade das análises é menor que nas matrices tradicionais. Durante estudos controlados, un usuario non pode ocultar o abuso de substancias, xa que a ventá de detección pode ser de meses. As vantaxes e desvantaxes da detección de droga en pelo e urina preséntanse na Táboa 1. A análise de cabelo permite un estudo retrospectivo no que se require dividir o pelo en segmentos para poder medir o consumo durante períodos de tempo máis curtos. A mostra ten que tomarse o máis cerca posible do coiro cabeludo e hai que ter especial coidado en saber cal é o extremo que está máis cerca da raíz. Este tipo de estudos son habituais en programas de desintoxicación, para verificar que o paciente mantén a abstinencia [13].

Táboa 1. Comparativa da análise en urina e en pelo

	Urina	Pelo
Drogas de abuso e medicamentos detectados ^a	Todos	Todos
Compostos principais	Metabolitos	Droga orixinal
Ventá de detección	2-3 días	Meses, anos
Técnicas analíticas	Inmunoensaio seguido de GC-MS	Inmunoensaio seguido de GC-MS
Toma da mostra	± Invasiva	Non invasiva
Adulteración	Posible	Improbable ^b
Conservación	-20 °C	Temperatura ambiente

^a So hormonas de dopaxe (EPO, GH, etc.) non se incorporan ao pelo

^b Os tratamentos cosméticos poderían reducir concentracións

- ii. Control do abuso de alcohol: Dada a magnitude de problemas asociados ao alcohol, a diagnose dun consumo excesivo ten especial relevancia desde o ámbito médico e legal. Os marcadores principais en pelo para a determinación do seu consumo son o etilglucurónido (EtG), os ésteres etílicos dos ácidos graxos (FAEE)[14,15] e o sulfato de etilo (EtS) [16]. A presenza de EtG no pelo está asociada ao consumo excesivo de alcohol, pero un resultado negativo non exclúe de maneira inequívoca o abuso. Os FAEE tamén se usan para monitorizar o uso excesivo, permitindo descartar o consumo social. Os FAEE fórmanse na presenza de etanol e ácidos graxos libres, triglicéridos, lipoproteínas ou fosfolípidos por unha FAEE sintasa que se encontra no fígado e tamén na raíz do pelo. A

cuantificación de FAEE é de interese debido a que parece responder ao dano orgánico inducido polo alcohol. Hoxe en día, os problemas principais na proba de EtG en pelo, son se a mostra sufriu algún tratamento cosmético [17,18] e a preparación da mostra, en concreto na súa pulverización. Observáronse diferencias significativas nos resultados segundo o tipo de corte aplicado [19].

- iii. Control de prácticas de dopaxe deportivo: A Axencia Mundial Antidopaxe (WADA) e o Comité Olímpico Internacional non considera o pelo como unha mostra válida, anque na maioría dos tribunais de xustiza si se soe aceptar como proba [5]. O pelo pode resultar útil para investigar falsos negativos en probas de sangue ou urina, e mediante análise de segmentos tamén se pode determinar a frecuencia do consumo. A urina, ademais dos falsos negativos, ten outros dous problemas: a degradación da mostra e a súa adulteración. Estes inconvenientes poden solucionarse en gran medida a través da análise en pelo xa que sempre é posible obter unha mostra de pelo idéntica se a mostra inicial se degradou; en cambio con urina non se pode obter unha mostra idéntica nun momento posterior á primeira toma. Outra vantaxe do pelo é que permite diferenciar entre o consumo de nandrolona, substancia prohibida, e outros 19 nonesteroideos, que conducen aos mesmos metabolitos na urina. No pelo pode identificarse a identidade dos compostos principais [20].
- iv. Renovación do permiso de conducir: Nalgúns países, as persoas ás que se lle denegase, suspendese ou revocase a licenza de conducir debido á adicción ás drogas ou por conducir “baixo a influencia”, poden obter o permiso unha vez que un comité médico (mediante unha avaliación psicolóxica) confirme a abstinencia completa. Para proporcionar probas obxectivas desta abstinencia cunha ventá de detección aceptable, a análise en pelo incorporouse nun grupo de probas clínicas, co obxectivo de determinar calquera comportamento asociado ás drogas nos suxeitos [21]. Ademais esta proba permite realizar un estudo do historial de consumo a longo prazo, e para isto o número e a frecuencia das análises redúcese con respecto a outras matrices como a urina.
- v. Delitos cometidos baixo os efectos das drogas: O uso de drogas para modificar o comportamento dunha persoa con fins criminais, non é un fenómeno recente. É máis, actualmente percíbese un aumento dos delitos de submisión química (agresións sexuais, roubos, etc.), o que causa unha gran alarma social. As drogas implicadas poden ser sedantes como as benzodiazepinas (flunitrazepam, lorazepam, etc.), anestésicos (GHB, ketamina), drogas de abuso (éxtase ou etanol) [22]. A súa administración pódese realizar furtivamente de maneira sinxela en bebidas en lugares de ocio. A maioría das substancias citadas posúen propiedades amnésicas e, polo tanto, as vítimas teñen menos capacidade para recordar con precisión as circunstancias nas que ocorreu o delito sexual [23]. Como xeralmente son de duración curta, afectan á persoa rapidamente, pero só durante unhas horas. Nestas situacións as probas de sangue ou incluso urina poden non ser adecuadas, porque o corpo xa puido ter eliminada a substancia. Por esta razón, a análise en pelo pode proporcionar evidencia de exposición previa [24]. De feito, a análise de pelo é a única forma de documentar unha exposición ao GHB cando a recollida

de mostras biolóxicas ocorre despois de máis de 8 horas desde que ocorreu o delito [25,26].

- vi. **Exposición infantil a drogas:** Aínda que a detección de drogas no pelo dun neno mostra de maneira indiscutible a manipulación de drogas no entorno do neno, é difícil distinguir entre a incorporación sistémica no pelo despois da ingestión ou inhalación e a deposición externa no pelo do fume, o polvo ou superficies contaminadas [27]. Ademais, demostrouse que as drogas poden incorporarse durante o embarazo no pelo do feto. Hai estudos que demostran a transferencia a través da placenta, con acumulación no pelo fetal, polo tanto pódese evidenciar se houbo consumo por parte da nai a través da detección da exposición intrauterina á droga [28]. Esta exposición durante a xestación pode desencadear unha serie de complicacións que afectan tanto á saúde obstétrica, cun aumento na incidencia de abortos e partos prematuros, como ao desenvolvemento do feto, coa posibilidade de malformacións e un incremento da mortalidade prenatal [29]. Ademais, pode ter repercusións na saúde do neonato, cun aumento da mortalidade e da morbilidadade e a posibilidade de sufrir síndrome de abstinencia [30]. A longo prazo, tamén pode influír no desenvolvemento físico e psicolóxico do neno, provocando dificultades de aprendizaxe e síntomas de hiperactividade. Polo tanto, resulta fundamental a detección temperá de neonatos expostos durante o embarazo, co obxectivo de mellorar a atención prenatal e neonatal a través das intervencións médicas e piscosociais oportunas [31].
- vii. **Control laboral:** Realizar probas de alcohol e drogas no entorno laboral é fundamental para prever ou, cando menos, diminuír os accidentes laborais e aumentar a eficiencia. A diferenza de Estados Unidos [32], en Europa non existe unha lexislación específica que regule o control de consumo de substancias no lugar de traballo. Non obstante, algúns países europeos e empresas privadas estableceron criterios par supervisar aos empregados. A mostra máis comunmente utilizada para avaliar o consumo de drogas é a urina, anque nos últimos anos implementáronse probas con fluído oral para respectar a privacidade dos traballadores. A análise de cabelo emprégase principalmente na selección de persoal, en probas aleatorias, e para facer unha contraanálise tras obter un positivo en urina ou saliva [33].
- viii. **Análise postmortem:** Durante a realización dunha autopsia, é común recoller cabelo para axudar a determinar factores posiblemente relacionados coa causa da morte e revelar o historial de consumo de drogas e medicamentos, e para iso é necesario realizar unha análise por segmentos que permita obter o perfil cronolóxico. A identificación de patróns de abuso crónico pode explicar manifestacións fisiolóxicas observables durante a autopsia e, por conseguinte, axuda a establecer a causa da morte [34]. Ademais, esta análise permite coñecer o nivel e duración do consumo de substancias que xeran tolerancia e poden provocar unha sobredose tras períodos de abstinencia, coma no caso dos opioides. Ademais, o historial de consumo rexistrado no pelo, aporta información relevante sobre intoxicacións prolongadas, ou envelenamentos agudos. A análise do pelo tamén pode ser útil en casos de descomposición avanzada cando non se dispón das matrices tradicionais [35].

- ix. Exposición a metais: A intoxicación por metais pesados refírese á acumulación de calquera elemento con propiedades metálicas nos tecidos brandos do organismo e que pode causar diferentes enfermidades e incluso a morte. Polo tanto, é crucial ter en conta os riscos asociados á súa toxicidade e realizar análises pormenorizadas para poder levar a cabo un tratamento de forma apropiada. Anque a intoxicación por metais pode ser debida á exposición ambiental, laboral ou accidental, apenas existen diagnósticos na práctica clínica [36]. Dentro dos posibles síntomas, algúns son específicos a un metal en concreto e outros son indistinguibles de outras enfermidades comúns. Por exemplo, as náuseas, os vómitos, a diarrea e a dor abdominal son características da maioría de inxestións agudas de metais, mentres que durante a exposición crónica, os síntomas poden non ser notorios na etapa inicial e vólvense máis graves a medida que pasa o tempo, ao ser acumulables no corpo [37]. Metais pesados como o chumbo, o arsénico, o mercurio, o antimónio ou o talio son coñecidos ao longo da historia debido ao seu uso como velenos; isto débese ás súas características físicas (indoros, insípidos, etc.) que fan que sexan indetectables a simple vista [38]. Anque actualmente existen metodoloxías e instrumentacións avanzadas para detectar facilmente a presenza de cantidades traza, as matrices máis comunmente empregadas seguen sendo o sangue e a urina. Non obstante, estes fluídos só reflexan a exposición recente e non poden proporcionar un rexistro retrospectivo. O pelo, en cambio, permite rexistrar unha posible exposición que tivese lugar nun intervalo de tempo pasado. Isto é debido a que os metais pesados se incorporan desde o torrente sanguíneo nas proteínas de queratina a unha taxa relativamente constante, polo que se pode elaborar un perfil de distribución e xeralmente se correlaciona ben a dose e o tempo de exposición ao elemento [36].

2. Drogas de abuso

A Organización Mundial da Saúde (*World Health Organization, WHO*) emprega o termo “droga” para describir calquera substancia, xa sexa natural ou sintética, que ao ser introducida no organismo ten a capacidade de modificar unha ou varias das súas funcións. Esta definición abarca un amplo rango de substancias químicas que, de forma máis específica, son as que teñen a capacidade de alterar a función cerebral e o comportamento a través da activación ou modulación dos sistemas de neurotransmisión e os circuitos de recompensa do cerebro.

Estas substancias poden clasificarse pola súa orixe (é dicir, como foi obtida), nas categorías de produtos naturais, semi-sintéticos e sintéticos. En química forense, adóitase catalogar as drogas segundo as consecuencias fisiolóxicas do seu consumo e o efecto que producen sobre o Sistema Nervioso Central (SNC). Isto dá lugar a tres categorías [1]:

- a. Substancias psicoestimulantes: Son estimulantes do SNC, polo que aceleran o funcionamento cerebral, así como o ritmo do sistema respiratorio e cardiovascular. Ademais activan o estadio de vixilia e alerta. Como exemplos deste tipo encóntranse a cocaína e as anfetaminas.
- b. Substancias psicodislépticas: Son as que alteran o SNC, provocando alteracións na percepción sensorial, chegando incluso a provocar alucinacións. Dentro deste tipo inclúense derivados anfetamínicos coma o 3,4-metilendioximetanfetamina (MDMA), os derivados do cannabis ou a dietilamida do ácido lisérxico (LSD).
- c. Substancias depresoras do SNC: Son as que provocan sensación de benestar, analxesia, xerando unha diminución da capacidade motora e freando o funcionamento cerebral. As substancias máis consumidas deste tipo son o alcohol etílico, os opiáceos e as benzodiazepinas.

O consumo de drogas refléxase no organismo mediante síntomas de estimulación ou depresión, o que pode ocasionar cambios repentinos na percepción do entorno [39]. As substancias que xeran efectos de relaxación, euforia e desinhibición son propensas a ser consumidas en exceso, o que conduce a unha maior dependencia no individuo. Denomínanse “drogas de abuso” cando se produce un consumo repetido e/ou crónico que pode levar ao desenvolvemento da dependencia, caracterizada por cambios neuroadaptativos no cerebro que resultan na compulsión por consumir a droga; a incapacidade para controlar o consumo a pesares de que o suxeito sabe que ten un problema social, laboral, psicolóxico ou físico; e a aparición de síntomas de abstinencia cando se interrompe o consumo [40].

Ao longo dos anos, diversas organizacións encargadas de supervisar o consumo destas substancias, observaron un aumento ou unha lixeira estabilización na súa prevalencia, pero nunca unha diminución notable, a pesares das políticas aplicadas para previr e desintoxicar en diferentes países.

No contexto internacional, os controis sobre drogas establécense a través de tres tratados das Nacións Unidas:

- I. A Convención Única sobre Estupefacientes de 1961: Este tratado ten como obxectivo loitar contra o abuso de drogas mediante o control da produción, distribución e uso de estupefacientes. Clasifica as substancias en catro categorías segundo o seu uso médico e o seu potencial de abuso.
- II. A Convención sobre Substancias Psicotrópicas de 1971: Este tratado aborda a regulación das substancias psicotrópicas, que inclúen aquelas que poden afectar aos procesos mentais e do comportamento. Establece ademais controis sobre a fabricación, comercio e uso.
- III. A Convención contra o Tráfico Ilícito de Estupefacientes e substancias Psicotrópicas de 1988: Este tratado céntrase na cooperación internacional para previr e loitar contra o tráfico de drogas. Promove medidas para fortalecer a aplicación da lei, a extradición dos delinquentes e a cooperación internacional en investigación e axuízamentos.

Os países signatarios destes tratados son responsables de aplicar medidas de control a través da súa lexislación nacional [41]. Na Táboa 2 móstrase de forma resumida as listas de clasificación das Convencións Internacionais sobre a fiscalización de drogas [42].

Táboa 2: Convencións Internacionais sobre a fiscalización das drogas.

<i>Convención única sobre substancias Estupefacientes de 1961</i>			
Lista I	Lista II	Lista III	Lista IV
Substancias moi adictivas e precursores de converterse en estupefacientes, e que son de probable uso indebido	Substancias menos adictivas e cuxo uso indebido é menos probable que as da Lista I	Preparados que conteñen una cantidade Baixa de compostos da Lista I e/ou II, e son pouco susceptibles de uso indebido	Estupefacientes (tamén clasificados na lista I) perigosos por propiedades adictivas, e escaso ou ningún valor terapéutico
Cannabis, opio, heroína, metadona, cocaína, oxycodona	Codeína	<2.5 % codeína, <0.1 % cocaína	Cannabis, heroína
<i>Convención sobre Substancias Psicotrópicas de 1971</i>			
Lista I	Lista II	Lista III	Lista IV
Estupefacientes que presentan un alto risco de uso indebido e que constitúen unha ameaza especialmente grave para a saúde pública, con escaso ou ningún valor terapéutico	Estupefacientes que presentan un risco de uso indebido e que constitúen unha ameaza grave para a saúde pública, cun valor terapéutico de baixo a moderado	Estupefacientes que presentan un risco de uso indebido e que constitúen unha ameaza grave para a saúde pública, cun valor terapéutico de moderado a alto	Estupefacientes que presentan un risco de uso indebido e que constitúen unha ameaza menor para a saúde pública, con alto valor terapéutico
MDMA, catinona, LSD	Anfetaminas, dronabinol	Barbitúricos, buprenorfina	Benzodiazepinas
<i>Convención contra o tráfico ilícito de estupefacientes e substancias psicotrópicas de 1988</i>			
Táboa I	Táboa II		
Precursores de substancias psicotrópicas, como efedrina, piperonal, safrol, ácido fenilacético, ácido lisérxico e algún reactivos clave usados para a conversión de morfina en heroína, así como o permanganato potásico, usado na extracción de cocaína	Unha ampla gama de reactivos e disolventes que se poden usar na produción ilícita de estupefacientes e substancias psicotrópicas, pero tamén teñen usos industriais ilícitos estendidos, como acetona, éter etílico, tolueno e ácido sulfúrico		

2.1. Epidemioloxía do consumo de drogas

O consumo de drogas de abuso foi un problema que perdurou ao longo da historia da humanidade, e continúa estando vixente cun aumento de consumidores cada ano. Dada a importancia desta problemática, existen diversos organismos que fan estudos periódicos da evolución do consumo de substancias. A nivel mundial, a *United Nations Office on Drugs and Crime* (UNODC) elabora anualmente o *World Drug Report* no que, segundo o último publicado en 2023 [43], o uso de drogas continúa sendo elevado. En 2021, estímase que 296 millóns de persoas do total da poboación mundial consumiu algún tipo de substancia, representando un aumento de consumidores do 23 % con respecto a 2011. O cannabis destaca como a droga máis usada, con arredor de 219 millóns de usuarios a nivel mundial, seguido de anfetaminas (36 millóns), opiáceos (31.5 millóns), e cocaína (22 millóns).

Respecto a Europa, o *European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction* (EMCDDA) elabora un informe anual en base aos datos proporcionados polos países membros da Unión Europea (UE), Turquía e Noruega. O último informe publicado, do 2022, estima que aproximadamente 83.4 millóns (29 %) dos adultos (entre 15 e 64 anos) na UE consumiu algunha vez unha droga ilícita. O cannabis segue sendo a substancia máis consumida, ao igual que a nivel mundial, cun 7.7 % de prevalencia de consumo na poboación adulta durante o último ano. Séguese a cocaína (1.2 %), o éxtase (0.9 %) e as anfetaminas (0.7 %). No caso dos opioides, aínda que a prevalencia de uso é menor que as demais drogas mencionadas, representan o maior parte dos danos atribuídos ao consumo de drogas ilegais. Isto obsérvase en que no 74 % das sobredoses mortais estaban presentes os opioides [44].

En España, o *Observatorio Español de las Drogas y las Adicciones* (OEDA) desde 1995 realiza unha enquisa bianual, *Encuesta sobre alcohol y otras drogas en España* (EDADES) e os resultados recóllense nun informe elaborado polo OEDA. No último informe de 2023 [45], no cal os datos corresponden a 2022, o cannabis é a droga con maior prevalencia (10.6 %), seguido da cocaína (2.3 %), éxtase (0.8 %), anfetaminas (0.6 %) e opioides (0.1 %). Se se comparan estes datos coa media europea, tanto o cannabis como a cocaína teñen unha prevalencia significativamente superior.

A gran maioría de consumidores de cannabis son ocasionais, non obstante, nunha considerable proporción de casos o patrón de consumo aumenta o risco de padecer efectos nocivos sobre a propia saúde, desenvolver dependencia, etc. En 2022, prevalencia deste consumo problemático foi do 1,9 % permanecendo estable desde ou cunha pequena diminución desde 2013.

En canto á cocaína, nos últimos anos obsérvase unha pequena diminución ou estabilización na prevalencia anual de consumo na poboación entre 15 e 64 anos (3 % en 2007 a 2.3 % no 2022).

A heroína mostra unha tendencia á estabilización (0.1 % de prevalencia) desde 1999. Segundo se pode observar nos usuarios nos pacientes admitidos a tratamento por consumo de heroína en 2021, a vía de administración predominante é a pulmonar (fumada) (87.1 %), seguida da intranasal (5.6 %), e a intravenosa (5.0 %). O porcentaxe da vía intravenosa continúa descendendo respecto a anos anteriores, sendo o dato do 2021 o máis baixo da serie histórica.

É importante ter en conta o policonsumo ao estudar a prevalencia das diferentes drogas, pois este patrón potencia os efectos de unhas sobre outras, reforzando a adicción, interferindo no diagnóstico e dificultando o tratamento. En 2022, o 40.9 % da poboación entre 15 e 64 anos

declarou haber consumido dúas ou máis substancias, sendo o alcohol a máis habitual (94.4 %) nos policonsumos, seguida do cannabis (61.4 %).

En virtude de tódolos datos obtidos sobre o consumo de drogas tanto a nivel estatal como internacional, na presente Tese vanse estudar as substancias ilícitas con maior prevalencia e/ou dano xerado na sociedade: cannabis, cocaína e opiáceos.

2.2. Cocaína

2.2.1. Aspectos xerais

A cocaína é un alcaloide que se encontra en diversas plantas do xénero *Erythroxilum* coñecidas como plantas de coca, e que soe crecer como arbusto en climas tropicais en América do Sur, especialmente na rexión dos Andes (a 500-2000 metros sobre o nivel do mar). A altitude e outros factores determinan a porcentaxe de cocaína presente na folla da planta, que soe ser arredor do 0.3-1 % [46].

A pasta de coca fabricase mediante a maceración das follas da planta de coca nun disolvente orgánico e en ácido sulfúrico, contendo esta unha variedade de alcaloides, entre eles o 50-85 % de cocaína e impurezas tóxicas. O seguinte paso no tratamento é engadir ácido clorhídrico á pasta de coca do cal se obtén clorhidrato de cocaína. Da colleita de 100 kg de follas de coca pode producirse arredor de 1 kg de pasta base e 800 g de clorhidrato [42].

A cocaína é unha droga psicoactiva que se leva consumindo desde hai 2000 anos. Aínda habendo numerosos informes sobre a súa toxicidade despois de que se lograse por primeira vez a súa extracción da planta durante o século XIX, non foi ata 1914 cando o seu uso comezou a verse como un grave problema. Actualmente continúa tendo algún uso médico como anestésico local en cirurxías de garganta, oído ou nariz (uso tópico de disolucións da sal de hidrocloreuro), e en procedementos oftalmolóxicos [1].

Segundo o último informe da UNODC [43], a nivel mundial estase experimentando un aumento tanto na oferta como na demanda de cocaína. O cultivo de arbustos de coca cubriu 315000 hectáreas en 2021, alcanzando niveis récord de produción. En canto á demanda, os usuarios foron aumentando de forma constante, en parte debido ao crecemento demográfico global, e agravado polas taxas de prevalencia crecentes das últimas dúas décadas (do 0.32 % en 2004 ao 0.42 % en 2021).

2.2.2. Estrutura e farmacoloxía

A cocaína ou metilbenzoilecgonina é un éster do ácido benzoico e do amino alcohol metilecgonina, que contén tropina, relacionada quimicamente coa atropina. A cocaína é estruturalmente diferente a outros anestésicos locais debido á tropina, pero é similar en canto a que contén unha rexión hidrofóbica (anel bencénico) e outra hidrofílica (amina terciaria). O enlace éster hidrólízase rapidamente, feito que contribúe a que o composto teña unha corta vida media [1].

Como se mencionou anteriormente, a cocaína ten usos médicos como anestésico local por vía tópica. Clinicamente, o seu mecanismo de acción máis importante radica na capacidade para bloquear a iniciación dos impulsos nerviosos ao diminuír a permeabilidade da membrana axonal aos ións de sodio e, desta forma aumentar o límite necesario para xerar un potencial de acción. Por outro lado, a cocaína ten accións adicionais que a fan única entre os anestésicos locais, que son a capacidade para bloquear a recaptación dos neurotransmisores norepinefrina, dopamina e serotonina. A norepinefrina é a responsable dos efectos adrenérxicos clásicos observados co consumo da cocaína, que inclúen a midriasis, vasoconstricción, hipertensión e taquicardia. Os efectos desexados producidos pola dopamina son os que producen a euforia intensa, enerxía psíquica, excitación sexual intensificada e a elevación do estado de ánimo. As consecuencias non desexadas son a paranoia, alucinacións e a disforia [39,47].

Demostrouse que o consumo repetido de cocaína produce tolerancia aguda, o que conduce a un esgotamento da dopamina e unha resposta diminuída. Tamén se pode producir o efecto contrario debido a cambios nos receptores, e o adicto presentaría unha sensibilización ao consumo [48].

O uso crónico de cocaína, aparte das alteracións psiquiátricas, inclúen a rinitis (con posible perforación do tabique nasal), axitación, convulsións, comportamento violento, percepción alterada, taquicardia, disnea, e comportamento hiperquinético. A droga pode danar as arterias cerebrais e un episodio hipertensivo agudo despois dunha soa dose nun usuario crónico pode provocar a rotura dos vasos cerebrais. Ademais, a toxicidade cardiovascular que provoca o uso crónico, pode dar lugar a diversas cardiomiopatías [1].

2.2.3. Formas de abuso

As vías de administración da cocaína son de especial relevancia porque van a condicionar a actividade farmacolóxica así como o grao de adicción á droga. A vía intravenosa é a única que proporciona unha biodispoñibilidade da droga do 100 %. No caso das vías intrapulmonar e intranasal a biodispoñibilidade é bastante variable, non obstante, son as formas de consumo máis habituais porque os efectos da droga son intensos e inmediatos. A sensación de euforia correlaciónase coa concentración de cocaína no corpo estriado, unha rexión do cerebro que está implicada no control da motivación e a recompensa. Despois da administración intravenosa ou intrapulmonar, a resposta eufórica ocorre entre 1 e 5 minutos, alcanzando o punto máximo en 8-12 minutos e cunha duración total de 30 minutos. Mentres que pola vía intranasal os efectos son máis atenuados pero tamén prolongados: o punto máximo de euforia alcázase aos 15-30 minutos e os efectos soen durar varias horas [1,49].

2.2.4. Metabolismo e eliminación

A cocaína metabolízase rapidamente no fígado, mediante a hidrólise do grupo éster alquílico a benzoilecgonina (BEG), e do éster fenílico a ecgonina metil éster (EME), ambas hidrólises por acción das metilesterasas e a benzoilesteras hepáticas. Tanto BEG como EME seguen metabolizándose ata ecgonina, pero o metabolito máis empregado como marcador de consumo da cocaína é a BEG. Ademais, se a cocaína se consume con etanol, tamén se pode observar o cocaetileno (CE), producido pola transesterificación da cocaína con etanol (Figura 3).

Esta conversión ocorre 3.5 veces máis rápido que a conversión de cocaína a BEG, o que fai que aumente a súa toxicidade [50].

A excreción da cocaína e dos seus metabolitos ocorre case exclusivamente a través da urina, sendo a taxa de eliminación da droga proporcional á concentración plasmática. Despois dunha dose única de cocaína, recupérase entre o 64 % e o 69 % na urina en 3 días, independentemente da vía de administración. So unha pequena fracción do excretado sería metilbenzoilecgonina, a maior parte será BEG (26-54 %) e EME (18-41 %). Datos post mortem suxiren que, co consumo crónico, as concentracións de cocaína en urina son moito máis altos do que se agardaría segundo os datos farmacocinéticos [1,49].

Para que a cocaína sexa detectable no pelo necesitanse de 4 a 5 días desde que foi ingerida. Os principais analitos que se determinan en pelo son a propia cocaína, e para minimizar problemas de contaminación ambiental e demostrar o consumo tamén se analiza a BEG e o CE [50].

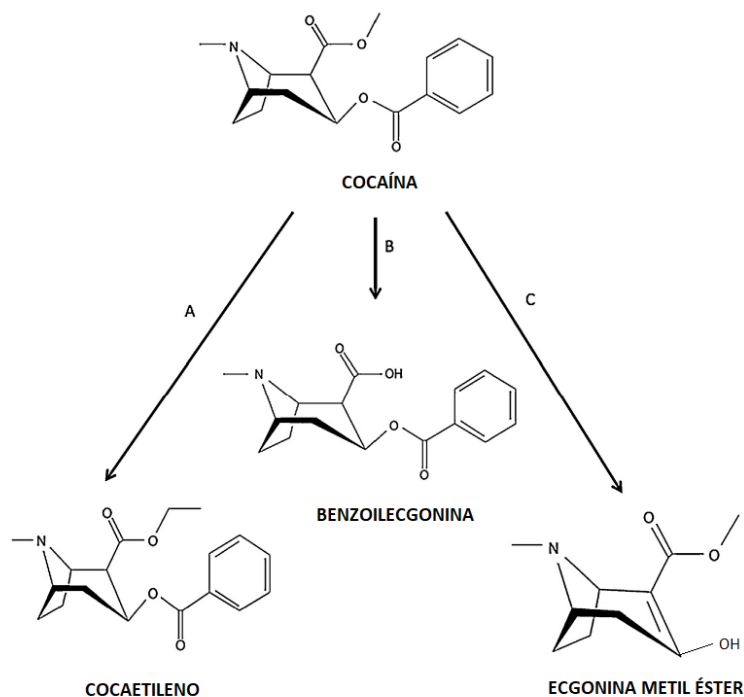


Figura 3. Estrutura química da cocaína xunto co seu metabolito maioritario (BEG), e algún dos derivados (CE, EME). (A) Transesterificación hepática; (B) Hidrólise do éster alquílico; (C) Hidrólise do éster fenílico.

2.3. Opiáceos

2.3.1. Aspectos xerais

O opio é unha substancia natural que se obtén da durmideira, *Papaver somniferum*, cultivada durante séculos debido ás súas propiedades medicinais e recreativas [51]. Mediante o procesamento do opio extráense alcaloides psicoactivos con efectos analxésicos coñecidos como opiáceos. Algúns dos compoñentes maioritarios do opio con propiedades farmacolóxicas específicas son os seguintes derivados fenantrénicos: morfina (10 -15 %), codeína (0.5-2.5 %) ou a tebaína (0.2-1 %) [1].

A morfina, illada por primeira vez en 1804 por Friedrich Sertürner, é o alcaloide principal do opio a partir do cal se desenvolveu a síntese de moitos analxésicos opioides semisintéticos [1]. O termo opioide engloba tanto aos opiáceos alcaloides naturais procedentes da planta durmideira, así como os semisintéticos preparados a partir do opio, e os sintéticos que imitan os efectos farmacolóxicos da morfina [41]. A codeína obtense mediante a metilación da morfina. Trátase dun analxésico de potencia bastante baixa que se soe empregar en combinación con outros analxésicos non opioides [52].

A heroína (diacilmorfina) é un opioide semisintético producido por primeira vez en 1874 a partir da morfina, e estivo dispoñible en 1898 como preparado farmacéutico con propiedades analxésicas e supresoras da tose [1]. Non obstante, máis tarde descubriuse que a heroína se metaboliza no corpo para transformarse en morfina, cun potencial adictivo significativo. A medida que se recoñeceron os seus riscos para a saúde, a heroína foi retirada do mercado como medicamento nas primeiras décadas do século XX, pero o seu uso ilícito persistiu desde a década dos 70 ata a actualidade [53,54]. Os opioides continúan sendo o grupo de substancias con maior contribución aos danos graves relacionados con drogas, sendo os causantes do 70 % das mortes por sobredose. Estímase que 60 millóns de persoas fixeron un uso non médico dos opioides no ano 2021, dos cales 31.5 millóns consumiron opiáceos (principalmente heroína) [43].

2.3.2. Estrutura e farmacoloxía

A morfina pertence ao grupo dos fenantrenos, xa que posúe unha estrutura pentacíclica cun grupo fenantreno de 4 aneis. A morfina tamén é un metabolito da codeína e da heroína, polo que a súa presenza na mostra pode ser indicativo de consumo destes opioides. A heroína (diacilmorfina) é un éster de morfina semisintético, con dous grupos acetilo enlazados aos grupos 3 e 6-hidroxilo de morfina. Ten unha vida media moi corta, de só uns minutos, polo que non se detecta en fluídos biolóxicos nin en pelo. No organismo hidrólízase rapidamente a 6-monoacilmorfina (6-MAM), o seu principal metabolito, xa que a súa presenza é unha proba inequívoca do consumo de heroína [1,55].

Os opiáceos poden ter usos terapéuticos en situacións cirúrxicas onde se require anestesia, ou en situacións de emerxencia como infartos de miocardio, queimaduras, dor posoperatoria, etc., onde se requiren sedantes. O tratamento da dor crónica asociada co cancro ou o as enfermidades terminais son outros casos do seu uso [56].

Os opioides exercen os seus principais efectos farmacolóxicos no SNC. A súa importancia clínica vén de que teñen capacidade de proporcionar analxesia sen que o paciente perda a

conciencia [57]. Pero o seu uso ten riscos asociados como a depresión respiratoria, náuseas, vómitos, hipotermia ou convulsións entre outros. En casos de intoxicación, a insuficiencia respiratoria é a principal causa de morte. Ademais, crean unha gran adicción e dependencia física. Por outra parte, a tolerancia xerada polo medicamento é crecente ao longo do tempo, o que provoca que se requira unha dose cada vez máis alta para lograr un efecto terapéutico equivalente [58,59].

2.3.3. Formas de abuso

Inicialmente a vía intravenosa era a máis común en substancias ilícitas como a heroína, debido a que o inicio dos efectos se produce case de forma instantánea; porén, a crecente pureza das drogas nas rúas e unha maior preocupación pola propagación de enfermidades infecciosas, incluído o virus de inmunodeficiencia humana (VIH), provocou que aparecesen novas formas de administración da droga, como fumar, inhalar ou esnifar [51,58]. Actualmente a vía pulmonar é a máis habitual no consumo de heroína.

2.3.4. Metabolismo e eliminación

O metabolismo ten lugar principalmente no fígado para formar metabolitos polares que se eliminan a través da recirculación enterohepática ou renal.

Con respecto á codeína, despois dunha dose típica, aproximadamente entre o 10 e o 20 % do medicamento excretase na urina como codeína inalterada, ao cabo de 24 horas. Un 10 % metabolízase a morfina, o que explica o efecto analxésico, e inicialmente durante a excreción predominan os metabolitos da codeína. Logo de 3 días, a composición de metabolitos na urina é similar a cando se consome morfina ou heroína, non obstante, a presenza de norcodeína permite diferenciar entre o consumo de codeína e os opioides mencionados [60].

A heroína, debido ás súas características estruturais, atravesa a barreira hematoencefálica rapidamente e experimenta unha deacetilación a 6-MAM, que é aproximadamente 4 veces máis potente que a morfina. O metabolito 6-MAM, que ten unha vida media de 0.6 horas, sofre unha biotransformación a morfina. Polo tanto os efectos analxésicos da heroína atribúense tanto á 6-MAM como á morfina, que trala administración da droga, prolongan os seus efectos debido a que son metabolitos activos (Figura 4). A presenza de 6-MAM é evidencia concluínte do consumo de heroína, porque é un metabolito específico desta; non obstante, só é detectable en urina ata aproximadamente 8 horas despois do consumo. O 80 % da heroína elimínase nas primeiras 24 horas principalmente como morfina-3-glucurónido; só o 0.1 % se elimina como droga libre [55,61,62].

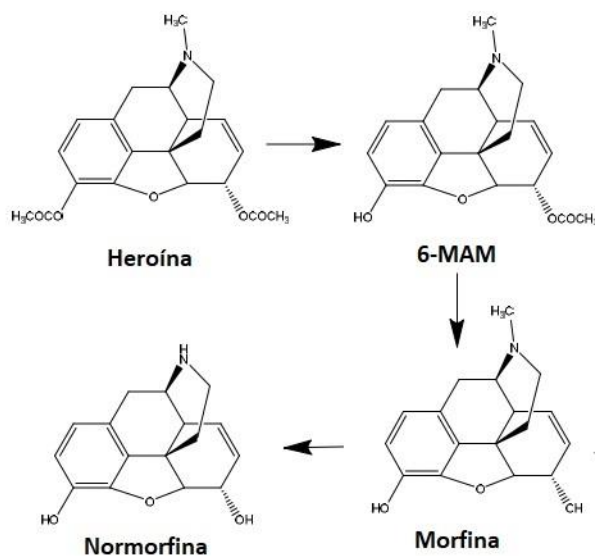


Figura 4. Metabolismo da heroína

2.4. Cannabis

2.4.1. Aspectos xerais

O termo cannabis é a designación xeral que se usa para referirse ás diferentes substancias psicoactivas da planta de marihuana ou cáñamo (*cannabis sativa*), e que abrangue as follas, as resinas derivadas dos tricomas das flores da planta (haxix) e o aceite de haxix que se obtén a través dunha extracción con aceite vexetal. O cannabis contén como mínimo 60 compostos semellantes denominados cannabinoides, formados por 21 átomos de carbono unidos para formar un ciclohexeno, un benceno, un tetrahidropirano, e diferentes substituíntes hidrocarburos. O Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC) é un dos compostos máis importantes dos denominados cannabinoides, debido a que se atopa en maior proporción na planta, podendo chegar a formar un 30 % da composición do aceite de haxix, e ademais é o que produce o efecto psicoactivo asociado ao seu consumo. O THC é altamente soluble en lípidos, o que ocasiona unha liberación lenta e un efecto prolongado durante varios días. Outros cannabinoides como o cannabinal (CBN) ou o cannabidiol (CBD), teñen unha presenza case residual na planta en comparación co THC e teñen un poder adictivo case nulo [42,63].

O consumo de cannabis provoca unha sensación de euforia, modifica as percepcións sensoriais, altera as habilidades motoras e pode dar lugar a situacións de ansiedade, paranoia e, a miúdo, illamento social. Ademais, os seus efectos poténcianse cando se combina con alcol ou outras substancias. Por outro lado, existen varios preparados farmacéuticos con cannabinoides que demostraron a súa eficacia para aliviar a dor crónica, reducir a inflamación, contrarrestar as náuseas na quimioterapia oncolóxica e outros posibles beneficios para a saúde. A investigación sobre cannabinoides e o seu uso terapéutico segue sendo unha área de interese activo na medicina e na ciencia [64].

Por outra parte, o cannabis é a droga máis consumida a nivel mundial, e a que ten maior prevalencia en casos relacionados coa condución de vehículos baixo a influencia de substancias de abuso, así como a fonte de máis resultados positivos en probas de drogas no ámbito laboral. En consecuencia, é esencial que no ámbito da toxicoloxía se comprendan os efectos cognitivos, fisiolóxicos e bioquímicos do cannabis, así como a disposición da droga e os seus metabolitos en fluídos e tecidos biolóxicos [43].

Nas últimas décadas, varios procesos políticos, legislativos e xudiciais avanzaron para permitir o uso do cannabis e os seus derivados con fins medicinais [65]. Os produtos que se empregan actualmente son preparacións farmacéuticas reguladas por marcos xa existentes, mentres que a regulación dos extractos da planta así como as preparacións maxistrais, comezou recentemente [66,67]. Ata 2020, 64 países contaban con lexislación para permitir o uso médico de preparados farmacéuticos de cannabinoides e/ou produtos a base de herba de cannabis [43].

2.4.2. Estrutura e farmacoloxía

O cannabis contén máis de 500 substancias químicas, nas que se inclúen compostos nitroxenados, máis de 109 cannabinoides, aminoácidos, hidrocarburos, glícidos, terpenos e ácidos graxos. No proceso de fumar, cando se realiza a combustión obtéñense máis de 2000 compostos, incluíndo aqueles que producen os efectos farmacolóxicos e toxicolóxicos xa coñecidos [68].

En 1899 illouse o primeiro cannabinoide, o CBN, pero a súa estrutura non se caracterizou correctamente ata 1940. O CBD foi illado en 1940 e caracterizado en 1963. Nos estudos realizados chegouse á conclusión de que tanto o CBN coma o CBD (Figura 5) non eran responsables dos efectos alucinóxicos do cannabis [63].

O CBN é esencialmente un produto de degradación química do THC, e a súa abundancia relativa aumenta a medida que as mostras envellecen. A proporción de THC e CBN depende da idade da mostra, da súa orixe xeográfica e a da cepa da planta.

O sistema endocannabinoide endógeno está involucrado no control da locomoción, no comportamento emocional, a función cognitiva, as respostas cardiovasculares, a dor, o comportamento alimentario e a adicción. O THC estimula os circuítos de recompensa no cerebro, unha das características esenciais das drogas de abuso, e actúa como un agonista da dopamina. O cannabis produce cambios substanciais no comportamento humano, á súa vez vinculados a cambios fisiolóxicos e bioquímicos [69].

Os efectos condutuais do cannabis inclúen sentimentos de euforia e relaxación, percepción alterada do tempo, falta de concentración, deterioro da aprendizaxe e da memoria, e cambios de humor como reaccións de pánico e paranoia. Este espectro de efectos condutuais é único e é o principal motivo de que a droga non se clasifique como estimulante, sedante, tranquilizante ou alucinóxico. O feito de fumar cannabis produce cambios rápidos nos efectos fisiolóxicos, como son o aumento da frecuencia cardíaca, sequidade da boca, aumento de apetito e incluso hipotensión. O déficit cognitivo máis común é a perda de memoria a curto prazo [69,70].

Os efectos tóxicos agudos do cannabis soen ser condutuais como por exemplo ataques de pánico ou psicose. Anque non causa a morte directamente, pode influír en accidentes automobilísticos e outros problemas relacionados co manexo de maquinaria [71].

2.4.3. Formas de abuso

O THC entra no organismo fundamentalmente mediante a inhalación, a través de dispositivos como pipas de auga ou cigarros. A continuación o composto absórbese nos alvéolos pulmonares e posteriormente distribúese por todo o organismo. Unha vez que o THC entrou na circulación sanguínea, a súa afinidade polas lipoproteínas, derivada da súa natureza lipofílica, tradúcese nunha prolongada permanencia no organismo, o que supón súa presenza no corpo humano durante varios días. En particular, obsérvase unha notoria acumulación do THC en órganos e tecidos coma o fígado, riles, bazo e outras áreas ricas en tecido adiposo [42].

2.4.4. Metabolismo e eliminación

O THC pode ser identificado no plasma en cuestión de segundos despois da súa inhalación, e a súa permanencia no corpo varía segundo a frecuencia de consumo, oscilando entre 20 horas e 13 días. Inicialmente, no proceso de metabolismo interveñen enzimas citocromo P450 hepáticas que o converten en derivados hidroxilados. A hidroxilación na posición 11 é especialmente relevante, producindo o 11-hidroxi- Δ^9 -THC, un derivado que pode converterse posteriormente en nor-9-carboxi- Δ^9 -THC (THC-COOH) (Figura 5). Aproximadamente o 70 % da dose de THC elimínase do organismo nun prazo de 72 horas, sendo o 40 % excretado nas feces e o 30 % a través da urina. Identificáronse máis de 100 metabolitos do THC, incluíndo compoñentes di- e trihidroxilados, cetonas, aldehidos e ácidos carboxílicos [72,73].

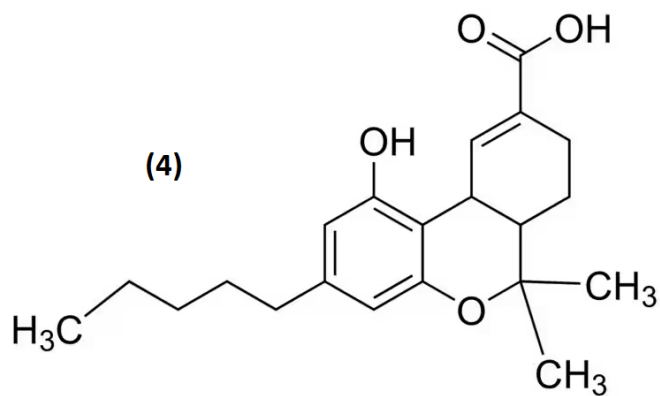
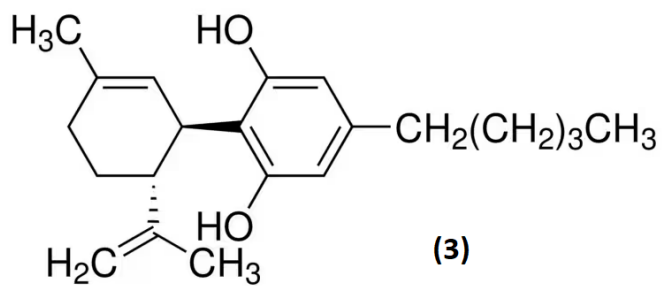
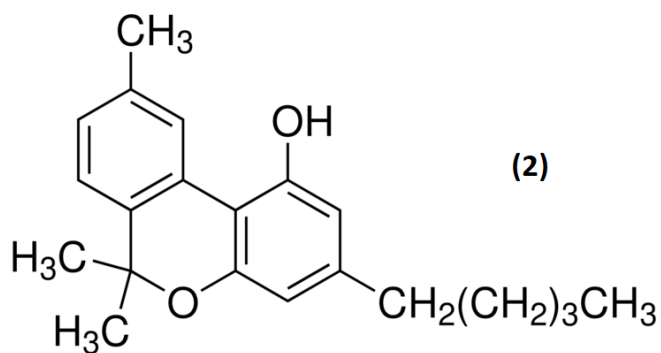
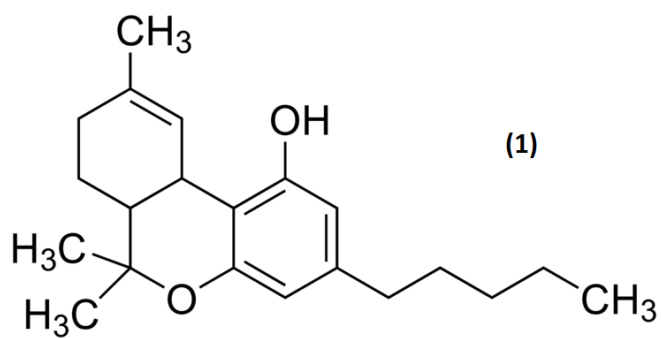


Figura 5. Estructuras químicas do (1) THC; (2) CBN; (3) CBD; (4) THC-COOH

3. Protocolo de análise das drogas de abuso en pelo

A SoHT no 2012 estableceu unha serie de pautas de boas prácticas para que os laboratorios levasen a cabo análises toxicolóxicas de cabelo. Xa con anterioridade a propia SoHT e diversos autores publicaron estudos que ofrecían suxestións sobre o manexo adecuado das mostras capilares, así como diversas consideracións sobre a súa análise [33,34,74]. Estas directrices son necesarias debido a que a análise en pelo require, en contraste con outras matrices biolóxicas, un proceso de pretratamento da mostra complexo. Isto inclúe unha toma de mostra precisa, medidas para evitar a posible contaminación externa, unha extracción adecuada segundo as características dos analitos e o uso de métodos instrumentais suficientemente sensibles para detectar e cuantificar con precisión baixas concentracións dos analitos presentes.

3.1. Recollida da mostra

A toma de mostra de pelo pode realizarse en diferentes partes do corpo, como son o coiro cabeludo, as axila, a pube, etc. Non obstante, cando sexa posible recollerase cabelo como mostra para a análise regular de drogas de abuso. É recomendable que a recollida se faga especificamente no vértex posterior, debido a que nesa zona hai menor variabilidade tanto no crecemento de folículos pilosos, cun 85 % en fase anáxena, como en termos de idade ou xénero. En consecuencia, a mostra nesa rexión é máis consistente e reproducible [34]. Como se explicou anteriormente, considérase a ratio de crecemento do cabelo de 1 cm cada mes.

Ademais, debe axustarse a cantidade de pelo que se recolla aos requisitos específicos de cada metodoloxía analítica e ao número de probas toxicolóxicas necesarias. En liñas xerais, aconséllase unha porción cun diámetro similar ao dun lapis e o corte debe realizarse o máis cerca posible do coiro cabeludo [4]. En situacións onde se pretende facer unha análise por segmentos, como en estudos do patrón cronolóxico de consumo, pode ser necesario recoller pelo cunha maior lonxitude, ou incluso recoller en distintas zonas do vértex posterior nos casos que haxa pouco pelo dispoñible. De forma idéntica a outras mostras toxicolóxicas, é esencial identificar de maneira inequívoca a mostra recadada e manter a cadea de custodia durante todo o proceso [33].

No que concirne ao almacenamento, non son necesarias condicións especiais. As mostras deben conservarse a temperatura ambiente e poden ser gardadas nun sobre de papel, papel de aluminio ou tubo de cristal ou plástico. Recoméndase almacenalas nun lugar seco e escuro, evitando a exposición directa á luz solar.

Dependendo da casuística, existen unha serie de recomendacións para que a toma de mostra de pelo sexa máis efectiva. Para análise postmortem, aconséllase realizar a recollida de pelo ao inicio da autopsia, desta forma obtérase información sobre as substancias consumidas máis próximas ao momento da morte. Nos casos de submisión química, recoméndase que a toma de mostra se leve a cabo cando menos 4-6 semanas despois do incidente, asegurando así a detección de posibles substancias que se puidesen incorporar á fibra en formación durante o incidente. Tamén se aconsella que a persoa afectada pola submisión evite realizar tratamentos cosméticos ou cortar o pelo antes de que conclúan as investigacións toxicolóxicas. Finalmente, suxírese a recollida dunha segunda mostra e analizala nos casos de que os resultados da primeira sexa positivos, co obxectivo de corroborar o resultado inicial [4].

En canto á técnica de segmentación do pelo, baséase na ratio de crecemento medio do pelo (1 cm/mes) e que a toma da mostra se ten que realizar cortando o pelo o máis próximo posible ao coiro cabeludo. Mediante a segmentación poderase obter un patrón cronolóxico de consumo, é dicir, información sobre o uso de substancias ao longo do tempo [13]. Para isto, a

segmentación debe levarse a cabo empregando un regra ou papel milimetrado que permita medir con precisión a lonxitude de cada segmento. Recoméndase realizar cortes de lonxitude crecente porque a concentración dos analitos diminúe proporcionalmente a medida que aumenta a distancia desde a raíz [34,75].

Nos últimos anos apareceron estudos que se basean na segmentación dunha soa fibra de pelo [10,13,76–79]. Este enfoque busca superar desafíos asociados á toma de mostra dunha porción de pelo que contén fibras en diferentes etapas de crecemento. A pesares de que a análise dunha soa fibra facilita o procedemento, é necesario analizar múltiples fibras dun mesmo individuo para evitar falsos negativos e ademais requírese unha técnica instrumental cunha sensibilidade extremadamente alta.

Existen estudos recentes baseados na microsegmentación (0.4 mm) para determinar o día de toma dunha soa dose de droga que ten aplicacións tan importantes como en delitos de submisión química ou no seguimento en programas de desintoxicación [80,81].

3.2. Eliminación da contaminación externa

A contaminación externa está constituída por unha mestura de substancias tanto de orixe esóxena como endóxena que recubren a superficie externa da fibra capilar. Os contaminantes esóxenos inclúen residuos de drogas aos que se expón o pelo de forma pasiva en ambientes contaminados, mentres que os endóxenos son segregados por glándulas sebáceas e sudoríparas, recubrindo tamén a parte externa da fibra de pelo en formación [4,82].

A eliminación desta contaminación externa é un paso esencial antes de realizar calquera análise de pelo, tanto para evitar falsos positivos como para prever interferencias na interpretación dos resultados. O proceso para esta eliminación implica a aplicación de lavados sucesivos, utilizando disolventes orgánicos ou acuosos. Ademais de eliminar a contaminación externa en si mesma, estes procesos de lavado tamén eliminan residuos e produtos cosméticos como xampús, lacas, etc., que poidan interferir na posterior determinación analítica dos compostos de interese, ao reducir a relación sinal/ruído do cromatograma obtido [83,84].

A SoHT dá unha serie de recomendacións para un lavado efectivo, que son as seguintes: realizar sempre o lavado antes da análise; os produtos empregados deben ser disolventes orgánicos e acuosos; o laboratorio debe investigar o grao de eliminación da contaminación que produce o método de lavado; aquel pelo que estea altamente impregnado con fluídos corporais pode requirir lavados adicionais [4].

En consecuencia, e baixo estes criterios, deseñáronse numerosas metodoloxías par a eliminación da contaminación externa, demostrando a súa relevancia para previr a obtención de falsos positivos [83,85,86]. Non obstante, existe o consenso de que os disolventes orgánicos, como o diclorometano e a acetona, unicamente eliminan a contaminación superficial, mentres que as solucións acuosas e o metanol tamén extraen parte das substancias incorporadas no pelo.

3.3. Extracción dos analitos da matriz

No cabelo, ao ser unha matriz sólida, existe unha forte unión das drogas incorporadas desde o sangue coas proteínas, a melanina e os lípidos que constitúen a súa estrutura. Por esta razón, é necesario realizar un procedemento de extracción dos analitos previo á análise, para que se liberen as drogas e se leve a cabo a súa detección. A eficacia desta extracción está suxeita a diversos factores, como o estado de conservación da matriz, a estrutura química dos analitos, a polaridade do disolvente empregado e a duración da modalidade de extracción [87].

Unha vez que o pelo foi lavado e secado para eliminar a contaminación externa, existe un paso de homoxeneización da mostra, previo á extracción. Para isto pode cortarse o pelo en

pequenos fragmentos (inferiores a 5 mm) ou pulverízalo. Estas accións incrementan a superficie de contacto entre o pelo e o disolvente empregado, optimizando así a recuperación dos analitos [19,88,89].

A continuación realízase a extracción mediante solubilización ou dixestión. Observouse a que a dixestión completa da matriz conduce a unha recuperación máis efectiva dos analitos. Non obstante, as técnicas utilizadas soen ser máis agresivas e os extractos resultantes poden conter máis impurezas e interferencias. É crucial considerar varios parámetros fisicoquímicos como son a estrutura molecular dos analitos ou a polaridade dos disolventes empregados, e con isto tratar de maximizar a cantidade de droga extraída, e optimizar o tempo empregado [90,91].

Os principais métodos de extracción son:

- **Disolucións ácidas:** O seu uso favorece a extracción de compostos básicos como a cocaína, os opiáceos ou as anfetaminas. Soen empregarse disolucións acuosas de ácido clorhídrico (0.01-0.05 M). A principal vantaxe fronte a outros métodos é que o extracto obtido ten menos impurezas a nivel analítico. Pero un inconveniente importante é que o emprego dun ácido conduce a que por exemplo a cocaína sufra hidrólise parcial e se transforme en BEG, así como a hidrólise de 6-MAM en morfina [92,93].
- **Disolucións básicas:** Soen ser disolucións acuosas de NaOH que realizan a dixestión completa da matriz. Isto fai que a recuperación dos analitos sexa maior, pero ao igual que nas disolucións ácidas, hai substancias que non son estables a pH básicos como por exemplo a cocaína hidrólizase completamente a BEG [92]. Polo tanto a súa aplicabilidade so é posible para substancias como as anfetaminas [94] ou o THC [70].
- **Disolventes orgánicos:** A diferenza das anteriores, este tipo de extracción é compatible coa maioría de substancias, xa o que disolvente entra no pelo e extrae os analitos por difusión. A alta compatibilidade dos disolventes orgánicos con diversas substancias permite realizar unha extracción multianalito. Pero esta baixa especificidade, ten como inconveniente que os extractos soen ser moi impuros polo que requiren unha etapa de limpeza posterior. A recuperación obtida neste tipo soe ser menor que nos demais [70,95].
- **Dixestión enzimática:** as enzimas empregadas rompen as pontes de hidróxeno e as pontes disulfuro liberando así as substancias retidas. As máis utilizadas son a β -glucuronidasa, a pronasa e a proteinasa K. O seu uso é adecuado para todo tipo de substancias, obténdose boas recuperacións e sen presentar problemas de hidrólises; o maior inconveniente é o seu elevado custo [96].

As dixestións do pelo soen ir acompañadas dunha incubación con calor para favorecer unha maior solubilización. A ultrasonicación tamén favorece ao proceso de extracción pois acelera o proceso de degradación da estrutura do pelo.

Como se acaba de expoñer, ás veces o extracto obtido precisa dunha etapa de limpeza e/ou preconcentración. Os métodos máis frecuentemente utilizados son a extracción líquido-líquido (LLE) [97,98] e a extracción en fase sólida (SPE) [62,99]. A selectividade deste proceso de purificación inflúe no resultado final da análise, xa que ao obter uns extractos máis puros, mellora a súa detectabilidade.

En termos xerais, os métodos SPE son os máis amplamente usados debido á súa capacidade de xerar extractos máis puros, presentar unha maior selectividade e reproducibilidade, así como previr a formación de emulsións [12,100], en comparación coa LLE. Non obstante, é importante sinalar que o uso de cartuchos SPE aumentan os custos de análise.

3.4. Determinación dos compostos estudados

A análise de pelo precisa da aplicación de técnicas instrumentais que permitan a identificación inequívoca de substancias, así como a cuantificación con precisión e exactitude e coa sensibilidade suficiente, debido a que a concentración de drogas en pelo é moi inferior á encontrada en sangue ou urina. Por conseguinte, as dúas metodoloxías máis habituais na análise cuantitativa son a cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas (GC-MS) [101–104] e a cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un espectrómetro de masas en tándem (HPLC-MS/MS) [91,105,106].

O uso da espectrometría de masas como sistema de detección é debido a que presenta un elevado grao de sensibilidade e fiabilidade. A detección baséase na relación masa/carga dos compostos, convertendo a este detector nun identificador practicamente infalible das moléculas. A integración desta técnica coa GC, fai que sexa un método robusto, sensible e selectivo que se utiliza de forma rutineira nos laboratorios de Toxicoloxía. A fragmentación dos compostos mediante impacto electrónico como método de ionización, xera espectros de masas característicos para cada composto, facendo posible a creación de librarías e a realización de *screenings* sistemáticos. Non obstante, as substancias pouco volátiles ou con baixa estabilidade térmica presentan desafíos significativos para o seu análise mediante esta técnica, e requiren procedementos de derivatización para mellorar as propiedades cromatográficas [91,107–109].

A GC-MS presenta vantaxes sobre outras técnicas, como a súa alta eficacia na separación de compostos con estrutura e propiedades similares, así como unha excelente reproducibilidade referida sobre todo aos tempos de retención, e o pequeno volume de mostra necesario (da orde de μL) [110–112].

4. Importancia do control de pacientes en programas de deshabitación a drogas de abuso

O termo drogodependencia foi establecido en 1964 pola WHO como *“un conxunto de fenómenos fisiolóxicos, condutuais, e cognitivos de intensidade variable, nos cales o uso dunha droga psicoactiva adquire unha alta prioridade. Implica a necesidade de doses repetidas da droga e indica que unha persoa ten un control deteriorado do uso de substancias, xa que o seu consumo continúa a pesares das consecuencias adversas.”*

Tradicionalmente establecéronse dous tipos de dependencia: física ou psicolóxica. A dependencia física, tamén coñecida como neuroadaptación, é unha situación fisiopatolóxica na que o consumidor ten unha necesidade urxente de manter uns niveis de droga no organismo, desenvolvéndose unha tolerancia ao uso da mesma, polo tanto o cese do consumo pode ocasionar abstinencia [113,114].

O síndrome de abstinencia determínase como o conxunto de síntomas que aparecen cando un consumidor habituado a unha substancia psicoactiva reduce ou cesa a súa administración (abstinencia por supresión) ou cando se administra a substancia antagonista (abstinencia precipitada). A intensidade desta dependerá de varios factores, como son: tipo e cantidade de substancia, vía e frecuencia de administración, velocidade de absorción e eliminación, existencia de metabolitos activos, etc. Todos estes factores farmacocinéticos son importantes dado que, se a droga se elimina de maneira paulatina, a sintomatoloxía aparecerá de maneira atenuada. En cambio, se se retira o consumo de forma brusca, o síndrome aparecerá intensamente [115,116].

Por outra parte, a dependencia psicolóxica está asociada ao desexo incontrolable de consumo. Este desexo conclúe coa administración repetida da droga, co obxectivo de beneficiarse dos efectos que produce (reforzo positivo), xa sexan evasivos ou pracenteiros, ou para evitar o malestar que produce a abstinencia (reforzo negativo). Este tipo de dependencia é complexa debido a que se adquire rapidamente e é complicado saír da situación xa que depende de varios factores: sociais, educativos, motivacionais, eficacia da droga, vías de administración, etc. [117].

Outro termo relacionado coa drogodependencia é a intoxicación. A American Psychological Association (APA) no seu Manual de Diagnóstico e Estatístico de Trastornos Mentais (DSM-5), trata a intoxicación como un comportamento problemático ou cambios psicolóxicos clinicamente significativos aos que se lle pode atribuír o efecto da substancia sobre o sistema nervioso central”.

Para o tratamento da drogodependencia, pódese concluír en que todas as estratexias están encamiñadas a modificar a conducta da persoa adicta, aportando unha serie de técnicas que poidan axudar a previr e afrontar situacións que conduzan a unha recaída. Dentro das estratexias, a desintoxicación é o paso inicial de calquera terapia e ten como obxectivo que o paciente non sufra os síntomas da abstinencia aguda tras o cese do consumo de calquera tipo de substancia. O seguinte paso sería a deshabitación, que ten como fin dotar ao paciente das ferramentas suficientes que o axuden a contrarrestar calquera situación que provoque a reincidencia no consumo. Trátase dun proceso longo e difícil, que ten como fin a reinserción social, laboral e familiar. Xeralmente este tipo de asistencia está ligada a determinados programas psicoterapéuticos asociados a centros asistenciais ás drogodependencias.

Dependendo do tipo de droga a carga para o sistema sanitario é diferente. A maioría dos trastornos por uso de substancias están relacionadas co cannabis e os opioides, sendo estes últimos os máis letais. Segundo o *World Drug Report* de 2023, no 46 % dos países a maior parte

dos trastornos son causados polo consumo de cannabis, mentres que un 31 % dos países informaron que os opioides, principalmente heroína, eran os que máis problemas de saúde ocasionaban. Esta clasificación en cada país vén determinada por dous factores: a prevalencia no uso, e o potencial de dependencia.

Tamén hai diferencias dependendo da rexión, nos ingresos en programas para o tratamento da adicción: na maior parte de Europa e en Asia, os opioides son a principal causa de ingreso, mentres que en América Latina é a cocaína e nalguna parte de África o cannabis.

Os últimos datos dos que se dispoñen do 2021, mostran que arredor de 39.5 millóns de persoas en todo o mundo sofren trastornos causados polo abuso de drogas, pero só 1 de cada 5 pode recibir un tratamento. Ademais, a pandemia agravou esta problemática, rexistrándose unha diminución no número de persoas que recibiron tratamento durante a situación de emerxencia sanitaria causada pola COVID.

Os impedimentos para acceder a estes tratamentos son múltiples, sendo as mulleres as máis afectadas. Ademais das expectativas e responsabilidades familiares, as mulleres experimentan unha maior problemática que inclúe un maior temor ás sancións legais, como a perda da custodia dos fillos, ou ao aumento de estigma social. Ademais, soen ser membros de certos grupos de exclusión social, como traballadoras sexuais, persoas con comorbilidades, ou membros de minorías étnicas. En síntese, as mulleres son máis vulnerables á discriminación e ao estigma social, polo que se lle dificulta un acceso a un tratamento de desintoxicación.

Como se estudou ao longo desta introdución, existen gran cantidade de investigacións que aportan información sobre a incorporación, acumulación, farmacocinética e estabilidade das drogas de abuso no cabelo. En cambio son escasos os estudos que indaguen sobre a diminución da concentración unha vez que se deixou de consumir durante un período de tempo: é coñecido que, unha vez que se deixa de consumir, pode pasar bastante tempo ata que se deixa de eliminar a droga por parte do organismo e, por iso, párase de incorporar a droga no cabelo. Esta diminución podería dar indicios sobre o cumprimento da abstinencia por parte do suxeito, pero non hai estudos fidedignos sobre este período de eliminación. É importante coñecer como se produce e canto tarda esta eliminación no cabelo, xa que esta é a mostra máis habitualmente empregada para o control do suxeito no período de deshabitación a drogas de abuso.

A análise da mostra de pelo pode realizarse por orde dun Órgano Xudicial para obter información adicional sobre un acto delictivo. De outro modo, estes estudos no ámbito da Toxicoloxía Forense permiten esclarecer feitos naqueles casos nos que se comete un delito baixo o efecto de substancias que afectan á vontade e á capacidade cognitiva do individuo. O pelo aporta información retrospectiva sobre as condicións nas que se atopa o agresor, e tamén a vítima se hai sospeitas de submisión química.

En resumo, a solicitude da análise en cabelo pode realizarse con fin de: verificar o seguimento dun programa de desintoxicación; comprobar se existe consumo en suxeitos cumprindo unha condena; suspender unha condena; ou valorar matices sobre a imputabilidade dun feito delictivo.

II. Xustificación e obxectivos

Nas últimas décadas o fenómeno da drogodependencia alcanzou unha extraordinaria importancia pola súa difusión e polas súas consecuencias sociais e sanitarias. Ademais, é un feito dinámico que está en continuo cambio ao longo do tempo. Na nosa sociedade, esta preocupación evidénciase debido á alta prevalencia do consumo de drogas de abuso.

A análise en cabelo emprégase de maneira moi extensa en Toxicoloxía Forense, xa que permite establecer a relación causa-efecto entre a exposición a unha droga e o seu efecto tóxico; permite realizar análises secuenciais que dean información sobre os patróns de consumo ao longo do tempo; monitorizar fármacos cun estreito rango terapéutico; sinalar a intoxicación como circunstancia cualificadora dun delito; coñecer o posible consumo de drogas no ámbito laboral, etc. O emprego do pelo como matriz aporta importantes vantaxes sobre outras metodoloxías, debido a que unha mostra pode proporcionar unha gran ventá de detección, pode ser facilmente obtida sen violar a privacidade do individuo e pódese almacenar a transportar de forma sinxela. Ademais a súa adulteración é practicamente imposible.

O estudo de drogas de abuso en cabelo non é unha novidade, pero é necesaria unha continua mellora nos procedementos de detección e análise para aumentar a súa eficiencia e rapidez, especialmente cando hai dificultades para obter cantidade suficiente de mostra de pelo do suxeito que se quere analizar.

Existen numerosas investigacións que proporcionan información sobre a incorporación, acumulación, farmacocinética e estabilidade de drogas de abuso no pelo. Non obstante, hai poucos estudos que investigan a diminución da concentración unha vez que se deixou de consumir durante un período de tempo. Sábese que, despois de cesar o consumo, pode pasar bastante tempo antes de que o organismo deixe de eliminar a droga, e polo tanto que cese a súa incorporación no pelo. Esta redución podería ofrecer indicios sobre o cumprimento da abstinencia por parte do individuo, pero apenas hai estudos fidedignos sobre este período de eliminación, incluíndo a súa duración, as concentracións agardadas e as variacións segundo o tipo de droga consumida, entre outros aspectos. É crucial comprender como se leva a cabo e canto tempo tarda en producirse esta eliminación no pelo, dado que esta é a mostra máis comunmente utilizada para monitorizar suxeitos durante o proceso de deshabitación ás drogas de abuso.

A importancia fundamental do presente traballo a nivel social e sanitario, foi poder demostrar se un suxeito se atopaba realmente baixo un período de abstinencia ao consumo de drogas de abuso, o que é de especial relevancia no caso de suxeitos postos a disposición xudicial e pendentos de Sentencias ou Executorias, que deben demostrar de maneira fiable que están abstinentes para poder solucionar os seus requirimentos legais. Por isto, o poder confirmar este feito mediante unha análise toxicolóxica, cunha mostra máis indicada para o asunto, e os mellores e máis sensibles métodos de análise, repercutirá en gran medida na solución destes casos e na incorporación á plena vida social e á reinserción de suxeitos que abandonaron o consumo de drogas.

Tendo en conta todo o anterior, o principal obxectivo desta Tese centrouse en realizar unha análise temporal da diminución da concentración de drogas de abuso en cabelo; en concreto analizouse a cocaína, os opiáceos e o cannabis. Para isto, empregouse cabelo de suxeitos que se atopaban baixo un programa de deshabitación a drogas, o que permitiu levar un control exhaustivo do cumprimento da abstinencia. Polo tanto, analizouse cada mostra ao longo do tempo para coñecer o período no cal a droga deixa de aparecer no pelo, e tras o cal se pode afirmar que o resultado da análise é totalmente negativo.

Outro obxectivo foi levar a cabo o desenvolvemento e validación da metodoloxía analítica empregada para a determinación dos analitos de interese. Para isto estudáronse os parámetros establecidos pola Guía de Validación de Métodos Bioanalíticos para a Industria da Administración Americana de Alimentos e Medicamentos (*Food and Drug Administration, FDA*) [118].

III. Metodoloxía

*As condicións experimentais e a metodoloxía do presente capítulo foron publicadas nos seguintes artigos:

Suárez-García, A.¹, Álvarez-Freire, I.¹, Bermejo-Barrera, A. M.¹, Cabarcos-Fernández, P.¹, & Tabernero-Duque, M. J.¹ (2023). Disappearance of codeine, morphine and 6-MAM in hair after cessation of abuse. *Forensic science international*, 352, 111855.

Elsevier, ISSN: 0379-0738

¹Instituto de Ciencias Forenses, Servicio de Toxicología Forense, Facultade de Medicina, Universidade de Santiago de Compostela, c/San Francisco s/n, 15782 Santiago de Compostela, España.

Suárez-García, A.¹, Álvarez-Freire, I.¹, Bermejo-Barrera, A. M.¹, Cabarcos-Fernández, P.¹, & Tabernero-Duque, M. J.¹ (2020). Duration of detection of cocaine and metabolites in hair after discontinuation of abuse. *Microchemical Journal*, 153, 104335.

Elsevier, ISSN: 0026-265X

¹Instituto de Ciencias Forenses, Servicio de Toxicología Forense, Facultade de Medicina, Universidade de Santiago de Compostela, c/San Francisco s/n, 15782 Santiago de Compostela, España.

1. Material e instrumentación xeral

A continuación, enumérase todo o material e instrumentación empregados no desenvolvemento das metodoloxías de análise das drogas de abuso estudadas nesta Tese, que se describirán a posteriori:

Instrumentación

- Axitador magnético (Velp Scientifica®)
- Axitador mecánico con rotación (Selecta®)
- Balanza BP615 (Sartorius®)
- Balanza analítica SI-234 (Denver Instrument®)
- Baño termostático para tubos, con subministro múltiple de nitróxeno VLM EC1. (Selecta®)
- Cámara frigorífica
- Centrífuga Mixtasel (Selecta®)
- Estufa (Selecta®)
- Micropipetas automáticas de 2-20, 10-100, 20-200, 100-1000, 1000-5000 μ L (Eppendorf®)
- pH-metro Basic 20 (Crison®)
- Sistema de extracción a baleiro para columnas en fase sólida (manifold) (Waters®)

Material

- Columnas de SPE Strata-X 33 μ m Polymeric Reversed Phase (60mg) (Phenomenex®)
- Embudes de vidro
- Espátulas
- Frascos lavadores
- Pousatubos
- Matraces aforados de 1, 5, 10, 100, 500 y 1000 mL
- Micropipetas automáticas de 20-200, 100-1000, 1000-5000 μ L (Gilson® y Kartell®)
- Pipetas Pasteur
- Probetas de 250 y 1000 mL
- Tubos Pyrex® redondo tamaño 15
- Tubos cónicos con tapón de vidro para derivatización
- Tubos de vidro con tapón para lavado de pelo
- Vasos de precipitados de 25, 50 y 100 mL
- Viales de vidro para disolucións patrón
- Vidros de reloxo

2. Determinación de cocaína, benzoilecgonina e cocaetilo en pelo

2.1. Reactivos e substancias patrón

Os patróns comerciais de cocaína, cocaína-d₃, BEG, BEG-d₃, CE e CE-d₃ en metanol (100 µg/mL) obtivéronse de Cerilliant® (Round Rock, TX, U.S.). O clorotrimetilsilano (TMCS), *N,O*-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA), Pronasa-E, 1,4-ditiotreitol (DTT), ácido acético, metanol en grado gradiente e hidróxido de amonio foron subministrados por Merck® (Darmstadt, Alemaña). O tris(hidroximetil)-aminometano (TRIS) foi adquirido a Sigma-Aldrich® (Stemheim, Suíza). Obtívose auga ultra pura dun sistema Milli-Q de Millipore® (Le Mont-sur-Lausanne, Suíza).

2.2. Condicións cromatográficas

As análises cromatográficas realizáronse nun cromatógrafo de gases HP 6890 de Hewlett-Packard® (Little Falls, DF, EE.UU.) equipado cun autoinxección HP 7683B de Agilent® (Las Rozas, España) e conectado a un detector de masas inerte HP 5973 de Agilent®. Para a separación cromatográfica empregouse unha columna capilar HP-5MS (fenilmetilsiloxano ao 5%, 30 m de lonxitude e 250 µm de diámetro interno, cun espesor de 0.5 µm), sendo o gas portador o helio, cun fluxo de 1.0 mL/min. A temperatura do inxección fixouse a 240°C. O modo de inxección é splitless, cun tempo de purga de 2 minutos e un volume de mostra inxección de 2 µL. O programa de temperaturas empregado no forno do cromatógrafo foi de 90°C inicialmente durante 1 minuto e a continuación aumentouse progresivamente a 30°C/min ata 235°C, mantívose durante 10 minutos, e logo aumentou novamente a 15°C/min ata 260°C e mantívose durante 5 minutos. Despois disto, a temperatura incrementouse ata 300°C durante 5 minutos para limpar a columna. O detector de masas selectivo mantívose a unha temperatura constante de 320°C, a fonte de ións a 250°C e o cuadrupolo a 100°C.

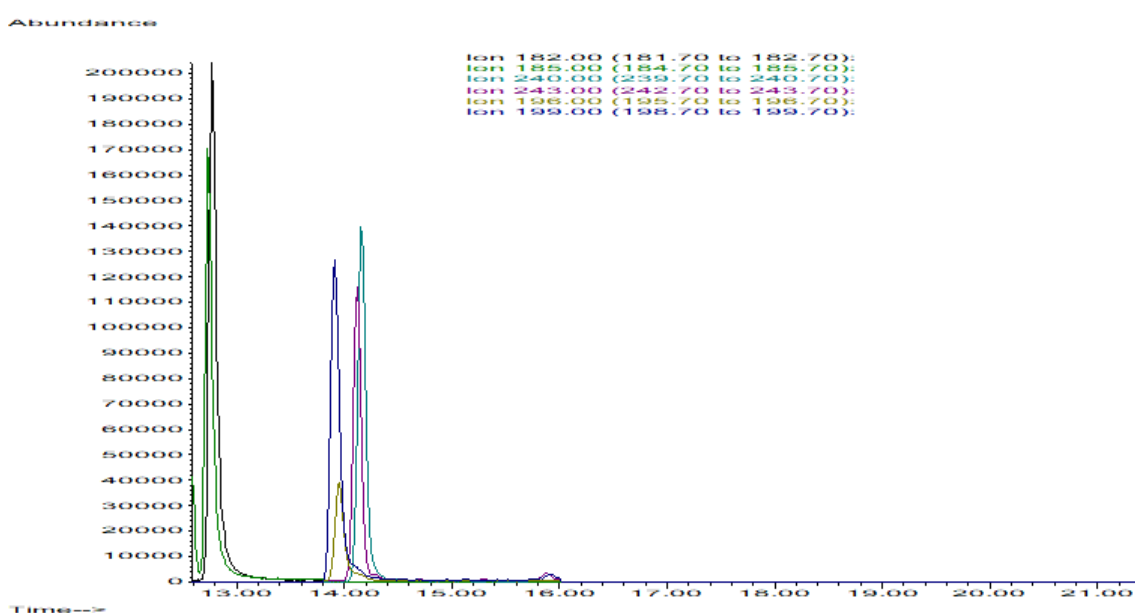
O analizador de masas operou mediante impacto electrónico (70 eV) provocando a ionización das moléculas. A identificación de compostos realizouse a través dos seus tempos de retención e dos espectros de masas. Para obtelos inxeccións en modalidade de barrido ou SCAN 2 µL da disolución patrón de 100 µg/mL de cocaína, BEG e CE, así como 2 µL da disolución dos seus análogos deuterados da mesma concentración. Os espectros de masas obtidos empregáronse para a selección dos ións cuantificadores e cualificadores de cada un dos analitos.

Conseguíuse unha boa separación coas condicións cromatográficas propostas, de modo que se puido monitorizar os ións a partir dos espectros de masas para operar posteriormente na modalidade SIM (*Selected Ion Monitoring*). Para cada analito, empregáronse os ións que se mostran na Táboa 3. Os ións subliñados utilizáronse para a cuantificación.

Táboa 3. Tempos de retención (T_R), e ións monitorizados (m/z) dos analitos de interese.

Compostos	T_R (min)	Ións (m/z)
Cocaína	12.80	<u>182</u> , 303, 198
Cocaína- d_3	12.76	<u>185</u> , 306, 201
BEG	14.20	<u>240</u> , 82
BEG- d_3	14.16	<u>243</u> , 85
CE	13.98	<u>196</u> , 317, 272
CE- d_3	13.93	<u>199</u> , 320

A continuación, móstrase un cromatograma en modo SCAN coa cocaína, BEG e CE e os seus análogos deuterados, e pode observarse que coinciden os seus tempos de retención Figura 6.

**Figura 6.** Cromatograma de cocaína, BEG e CE e os sus análogos deuterados en modo SCAN

2.3. Procedemento analítico

Mostras de pelo

Para o presente estudo as mostras de cabelo obtivéronse de suxeitos ingresados nun programa de rehabilitación de drogas. Os participantes proporcionaron voluntariamente as mostras de pelo e para isto firmaron previamente un consentimento informado (ditos consentimentos foron elaborados de acordo co protocolo aprobado polo Comité de Ética de Investigación Clínica de Galicia, Código de rexistro: 2016/547, (anexo I). O cumprimento do tratamento de desintoxicación foi demostrado mediante análises periódicas de urina. O pelo recolleuse cada 2 meses nun período total de 6 meses desde o inicio do programa por parte dos pacientes. As mostras obtivéronse da seguinte forma: O mesmo día do ingreso do programa de

rehabilitación, tomouse o primeiro segmento (mostra 0). Esta mostra corresponde ao consumo de drogas antes da abstinencia do paciente. Posteriormente, durante os 6 meses seguintes, a pelo recolleuse a intervalos de dous meses (segundo, cuarto e sexto mes). Destas mostras, analizouse 1 cm proximal, na zona vértex posterior o máis cerca posible ao coiro cabeludo.

A recollida de mostras de pelo dos pacientes para levar a cabo o estudo, presentou desafíos significativos que dificultaron a súa obtención. O principal inconveniente para obter un número suficiente de mostras, foi que o estudo requiría un seguimento a longo prazo (6 meses) de cada paciente. Varios centros que se ofreceron a colaborar, non puideron manter a continuidade necesaria. Ademais, algúns dos usuarios que comezaron o programa de desintoxicación, non lograron completalo e por conseguinte a taxa de abandono foi elevada.

Inicialmente dispuxéronse 71 casos en total de pacientes consumidores de cocaína que ingresaron nos centros colaboradores. Deses pacientes, 28 non foron analizados porque so se recibiu o primeiro segmento, ou porque a mostra recibida era insuficiente para a análise. Dos 43 restantes que si foron analizados, houbo que descartar 23 usuarios porque non mantiveron a abstinencia requirida, ou porque non se dispuxo do último segmento e polo tanto non se puido chegar a un resultado concluínte.

Procesado das mostras

Inicialmente sometéronse as mostras a un proceso de descontaminación mediante o lavado en 5 mL dunha solución ao 0.1% de xabón líquido de pH neutro (Tween® 20), e o aclarado con auga destilada para eliminar calquera contaminación externa. Despois de secar nunha estufa a 40°C, o pelo cortouse en segmentos inferiores a 5 mm co obxectivo de expoñer a maior porción de córtex e medula, onde están retidas as drogas, á acción do axente da extracción. A continuación pesáronse alicuotas de 50 mg.

A fase de extracción dos analitos do pelo realizouse mediante hidrólise enzimática. Durante este proceso hai que conseguir unhas condicións que extraian o total das drogas presentes sen que se produza a súa degradación, e para isto engádense 500 µL de DTT nas alicuotas, e déixanse a 37°C durante 1 hora. O DTT actúa como activador da Pronasa E, que é a que realmente dixire o pelo, e da que se engaden tamén 500 µL a continuación do DTT. Esta mestura déixase a 37°C durante 12 horas aproximadamente, conseguindo así a degradación da matriz queratínica do pelo para que se liberen as drogas presentes.

Para a SPE empregáronse cartuchos Strata-X 30 µm *polymeric reversed phase* (60 mg: Phenomenex®). Despois da dixestión engadíuselle a cada mostra 50 µL de cada patrón interno (cocaína, BEG e CE deuterados de concentración 5 µg/mL). Nos cartuchos, previamente acondicionados con 2 mL de metanol e 2 mL de auga, cargouse 1 mL de mostra con 1 mL de tampón borato pH=9.2 para facilitar a retención do analito. A continuación iniciouse a fase de lavado dos cartuchos con 2 mL de metanol ao 5%, seguido de 2 mL dunha disolución do 20% de (2% NH₄OH, metanol) e o 80% de auga. Despois os cartuchos secáronse ao baleiro durante aproximadamente 20 minutos e os analitos absorbidos na columna eluíronse con 2 mL de ácido acético ao 2% en metanol (Figura 7). O eluído evaporouse a seco baixo unha corrente de nitróxeno a 40°C nun bloque calefactor.

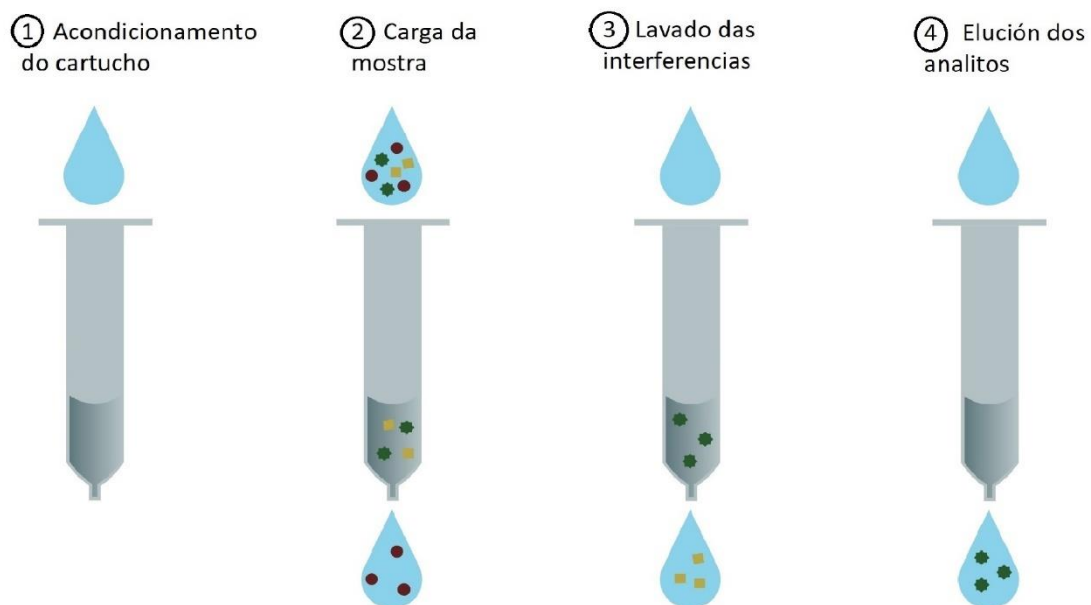


Figura 7. Procedemento da SPE (Elaboración propia).

O residuo obtido despois da evaporación do extracto dissolveuse en 40 μL de BSTFA-TMCS (99:1, v/v) e quentouse a 100°C durante 20 minutos para a súa derivatización previa á inxección no sistema GC-MS.

3. Determinación da codeína, morfina e 6-MAM en pelo

3.1. Reactivos e substancias patrón

Os patróns comerciais de codeína, codeína-d₃, morfina, morfina-d₃, 6-MAM e 6-MAM-d₃ en metanol (100 µg/mL) obtivéronse de Cerilliant® (Round Rock, TX, U.S.). O clorotrimetilsilano (TMCS), *N,O*-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA), Pronasa-E, 1,4-diotreitol (DTT), ácido acético, metanol en grado gradiente e hidróxido de amonio foron subministrados por Merck® (Darmstadt, Alemaña). O tris(hidroximetil)-aminometano (TRIS) foi adquirido a Sigma-Aldrich® (Stemheim, Suíza). Obtívose auga ultra pura dun sistema Milli-Q de Millipore® (Le Mont-sur-Lausanne, Suíza).

3.2. Condicións cromatográficas

As análises cromatográficas realizáronse empregando as mesmas condicións que no método anteriormente descrito para cocaína, BEG e cocaetileno.

O analizador de masas operou mediante impacto electrónico (70 eV) provocando a ionización das moléculas. A identificación de compostos realizouse a través dos seus tempos de retención e dos espectros de masas. Para obtelos inxectáronse en modalidade de barrido ou SCAN 2 µL da disolución patrón de 100 µg/mL de morfina, codeína e 6-MAM, así como 2 µL da disolución dos seus análogos deuterados da mesma concentración. Os espectros de masas obtidos empregáronse para a selección dos ións cuantificadores e cualificadores de cada un dos analitos.

Conseguíuse unha boa separación coas condicións cromatográficas propostas, de modo que se puido monitorizar os ións a partir dos espectros de masas para operar posteriormente na modalidade SIM. Para cada analito, empregáronse os ións que se mostran na táboa 4. Os ións subliñados utilizáronse para a cuantificación.

Táboa 4. Tempos de retención (TR), e ións monitorizados (m/z) dos analitos de interese.

Compostos	T _R (min)	Ións (m/z)
Codeína	18.26	<u>371</u> , 178, 234
Codeína-d ₃	18.22	<u>374</u> , 181, 237
Morfina	19.28	<u>429</u> , 414, 236
Morfina-d ₃	19.24	<u>432</u> , 417, 239
6-MAM	20.69	<u>399</u> , 340, 287
6-MAM-d ₃	20.64	<u>402</u> , 343, 290

A continuación, móstrase un cromatograma en modo SCAN coa codeína, a morfina e o 6-MAM e os seus análogos deuterados. Pode observarse que coinciden os seus tempos de retención (Figura 8).

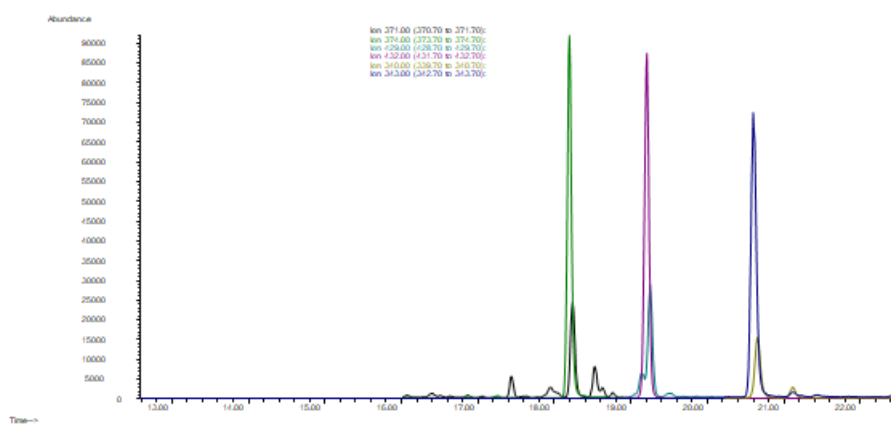


Figura 8. Cromatograma da codeína, morfina e 6-MAM e os seus análogos deuterados en SCAN.

3.3. Procedemento analítico

Tanto o procedemento de recollida das mostras de pelo coma as fases de lavado e extracción son as mesmas que para o método descrito para cocaína e os seus metabolitos.

Para a análise de opiáceos, dispuxéronse inicialmente de 32 casos en total de pacientes consumidores de heroína que ingresaron nos centros colaboradores. Deses pacientes, 8 non foron analizados porque so se recibiu o primeiro segmento. Dos 24 restantes que si foron analizados, houbo que descartar 7 usuarios porque non mantiveron a abstinencia requirida, ou porque non se dispuxo do último segmento e polo tanto non se puido chegar a un resultado concluínte.

4. Determinación de cannabinoides en pelo

4.1. Reactivos e substancias patrón

Os patróns comerciais de Δ^9 -THC, Δ^9 -THC- d_3 , THC-COOH, THCCOOH- d_3 , CBD e CBN en metanol (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), CBD, CBN foron adquiridas de Cerilliant® (Round Rock, TX, U.S.). O axente derivatizante TMCS, o BSTFA, así como os disolventes orgánicos n-hexano, acetato de etilo e metanol en grado gradiente foron subministrados por Merck® (Darmstadt, Alemaña). A auga ultra pura obtívose dun sistema Milli-Q de Millipore® (Le Mont-sur-Lausanne, Suíza).

4.2. Condicións cromatográficas

As análises cromatográficas realizáronse no mesmo equipo que nos anteriores métodos. A temperatura do inxector fíxose a 240°C. O modo de inxección é splitless, cun tempo de purga de 2 minutos e un volume de mostra inxectada de 2 μL . O programa de temperaturas empregado para o THC, o CBD e o CBN no forno do cromatógrafo foi de 90°C inicialmente durante 1 minuto e a continuación aumentouse progresivamente a 40 °C/min ata 210°C, e logo aumentou novamente a 7°C/min ata 250°C e mantívose durante 14 minutos. Despois disto, a temperatura incrementouse ata 285°C durante 5 minutos para limpar a columna. Para o THC-COOH, a temperatura inicial da columna foi de 120 °C durante 1 minuto, logo aumentouse a 40°C/min ata 290°C e mantívose así durante 7 minutos. Finalmente, a temperatura incrementouse ata 300°C durante 5 minutos para limpar a columna. O detector de masas selectivo mantívose a unha temperatura constante de 320°C, a fonte de ións a 250°C e o cuadrupolo a 100°C.

O analizador de masas funcionou mediante impacto electrónico (70 eV) inducendo a ionización das moléculas. A identificación das substancias levouse a cabo mediante a observación dos seus tempos de retención e os espectros de masas. Para obtelos, inxectáronse en modalidade de barrido ou SCAN 2 μL da disolución patrón de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de THC, CBN, CBD e THC-COOH, así como unha disolución de THC- d_3 e THC-COOH- d_3 na mesma concentración. Os espectros de masas obtidos utilizáronse para a selección dos ións cuantificadores e cualificadores de cada un dos analitos.

Logrouse unha boa separación coas condicións cromatográficas propostas, o que permitiu monitorizar os ións a partir dos espectros de masa para logo operar na modalidade SIM. Para cada analito, utilizáronse os ións que se mostran na Táboa 5. Os ións subliñado empregáronse para a cuantificación.

Táboa 5. Tempos de retención (TR), e ións monitorizados (m/z) dos analitos de interese.

Compostos	T_R (min)	Ións (m/z)
THC	16.03	<u>299</u> , 314, 271
THC- d_3	15.98	<u>302</u> , 317, 274
CBD	14.00	<u>231</u> , 246
CBN	18.09	<u>295</u> , 310, 298
THC-COOH	10.90	<u>371</u> , 473, 488
THC-COOH- d_3	10.87	<u>374</u> , 476, 491

Na Figura 9 pode observarse un cromatograma do THC-COOH e o seu análogo deuterado en modo SCAN. O seguinte cromatograma (Figura 10) corresponde ao THC, CBN, CBD e o THC-d₃, tamén en modo SCAN.

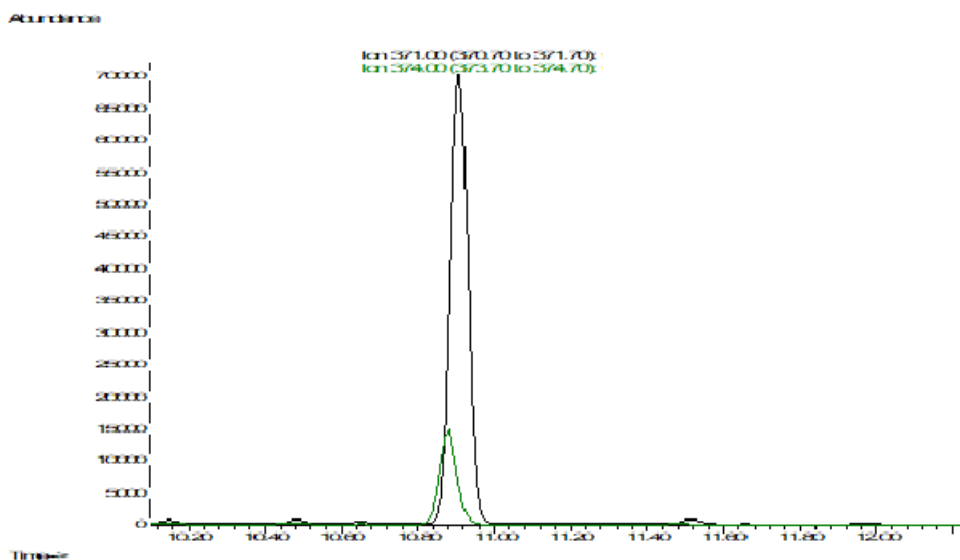


Figura 9. Cromatograma do THC-COOH e o seu deuterado en modo SCAN

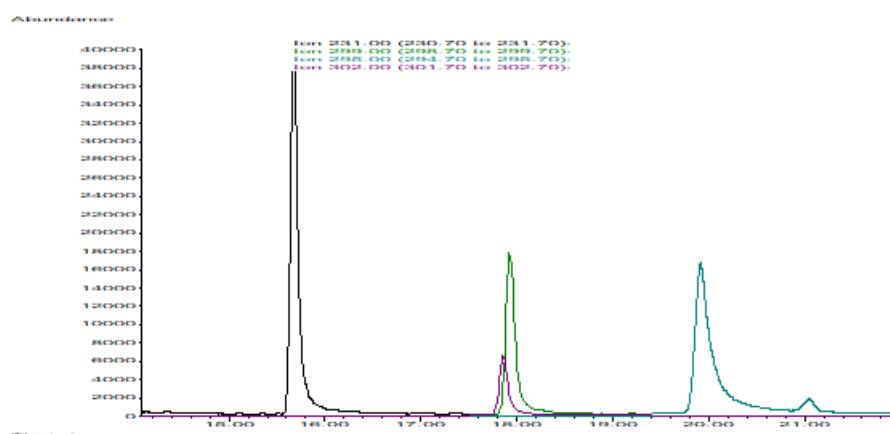


Figura 10. Cromatograma do THC, CBN, CBD e THC-d₃ en modo SCAN.

4.3. Procedemento analítico

Mostras de pelo

Tanto o procedemento de recollida das mostras de pelo coma a fase de lavado son as mesmas que para o métodos anteriormente descritos.

Procesado das mostras

O método de extracción consta dunha fase de hidrólise, na que aos 50 mg de pelo pulverizado previamente, se lle engade 500 µL de NaOH 2 M e se introduce na estufa a 100°C durante 10 minutos, ata que se produce a disolución total da mostra. A continuación engádense a cada mostra 50 µL dunha mestura que contén os patróns internos THC-d₃ e THC-COOH-d₃.

Despois da hidrólise básica, levouse a cabo unha extracción líquido-líquido (LLE) que consta de dúas etapas: na primeira extráense os compostos con propiedades básicas e neutras (THC, CBD e CBN) e na segunda os de propiedades ácidas (THC-COOH).

Para a primeira etapa engádense 5 mL da mestura de disolventes n-hexano/acetato de etilo (9:1, v/v). A continuación sométese a axitación mecánica durante 20 minutos e, para separar completamente a fase acuosa e a fase orgánica, centrifúgase a 8000 rpm durante 10 minutos, separando a continuación as dúas fases cunha pipeta Pasteur. A fase orgánica evapórase a sequidade nun baño termostático a 40°C coa axuda dunha corrente de nitróxeno gasoso. Unha vez que a alícuota está seca, reconstitúese con 40 µL de metanol e procédese a inxectar no GC-MS para a detección de THC, CBN e CBD.

Na segunda etapa, a fase acuosa que se reservou na anterior etapa, acidifícase con 100 µL de HCl 1 M para conseguir un pH= 4-5. Posteriormente realízase unha segunda extracción con 5 mL da mestura de disolventes n-hexano/acetato de etilo (9:1, v/v) aplicando o mesmo procedemento que na etapa anterior para separar as fases. Unha vez obtido o extracto orgánico derivatízase con 40 µL de BSTFA e 1% TMCS a 100°C durante 20 minutos e posteriormente inxéctase no GC-MS para a análise de THC-COOH.

5. Validación da metodoloxía analítica

É imprescindible levar a cabo a validación do método analítico co fin de evidenciar a fiabilidade da análise cuantitativa dos analitos nun rango específico de erro. Para garantir a robustez dun método e realizar a súa validación do forma efectiva, neste estudo seguíronse as directrices internacionais da Guía de Validación de Métodos Bioanalíticos para a Industria da FDA [118]. Estudáronse os seguintes parámetros: linealidade, sensibilidade, selectividade, límites de detección e cuantificación, precisión e a recuperación [87,119–121].

Linealidade

A linealidade dun procedemento analítico defínese como a capacidade para obter resultados directamente proporcionais á concentración do analito. O modelo de calibración debe prepararse para cada analito na mesma matriz biolóxica que as mostras de estudo, mediante a adición de cantidades coñecidas á matriz de mostra branco. Estas concentracións deben elixirse baseándose no rango de concentracións esperado en cada estudo en particular. O número de estándares usado para a preparación da curva de calibrado vén determinado polos valores do rango analítico e a natureza da relación analito/resposta.

Habitualmente, recoméndanse entre 5 e 7 puntos que inclúan o LLOQ para realizar a curva de calibración, ademais dun branco (matriz procesada sen analitos e sen patrón interno) e un cero (matriz procesada con unicamente patrón interno). No presente estudo as curvas de calibrado realizáronse con 7 niveis crecentes de concentración, realizando 7 recalibracións para cada nivel.

Sensibilidade

A sensibilidade dun método analítico mide a súa capacidade para discriminar entre pequenas diferencias na concentración dun analito. Existen dous factores que limitan a sensibilidade: a pendente da curva de calibración e a reproducibilidade do sistema de medida. Para dous métodos que teñan a mesma precisión, o que teña a curva de calibración con maior pendente será o máis sensible, e se dous métodos teñen as curvas de calibración coa mesma pendente, o máis sensible será aquel que presente maior reproducibilidade. A sensibilidade dos métodos analíticos avalíase mediante o límite de detección (LOD) e o límite inferior de cuantificación (LLOQ).

Defínese LOD como a concentración mínima de analito que pode distinguirse do ruído de fondo, para un nivel de confianza dado, sendo estatisticamente diferente dunha mostra branco. A relación sinal/ruído (S/N) determínase comparando os sinais medidos en mostras con concentración de analito baixas e coñecidas con outras mostras branco, e establecendo a mínima concentración coa que o analito pode ser detectado con fiabilidade. O LOD é a concentración mínima á que S/N é superior a 3.

O límite de cuantificación (LOQ) pode definirse como a concentración mínima de analito coa que se poden realizar determinacións cuantitativas, con fiabilidade e repetibilidade aceptables. Como LLOQ debe aceptarse o punto máis baixo da curva de calibración, sempre que S/N sexa 10 veces superior. O pico do analito (resposta) debe ser identificable, diferenciado e reproducible cunha precisión polo menos do 20% e unha exactitude comprendida entre o 80% e o 120%.

En análises forenses é moi importante definir os LOD e os LOQ para cada analito en cuestión, dado que os resultados poden ser positivos ou negativos dependendo de que o valor obtido se encontre por encima ou por debaixo destes límites. Un hipotético resultado positivo

non é suficiente para considerar ser detectado un analito, xa que se necesita coñecer ademais o LOD nas condicións do método.

Selectividade

É a habilidade do método analítico par diferenciar e cuantificar o analito en presenza doutros compoñentes da mostra. Para determinar a selectividade débense analizar individualmente polo menos 6 mostras da matriz branco que procedan de distintos suxeitos, para poder determinar as interferencias.

As substancias potencialmente interferentes na matriz biolóxica inclúen compoñentes endóxenos da matriz, metabolitos, produtos de descomposición e contaminación por outras substancias.

Exactitude e precisión

A exactitude dun método analítico é a capacidade para dar resultados o máis próximos posibles ao valor verdadeiro ou teórico da concentración do analito. É dicir, describe a veracidade dun resultado experimental, anque é un termo relativo, xa que o feito de que un método sexa ou non exacto depende en gran medida das necesidades e da dificultade do problema analítico. A exactitude mide o erro sistemático, o determinado dun método analítico, e exprésase en termos de erro absoluto ou relativo.

Determinase mediante a análise de réplicas das mostras que conteñen cantidades coñecidas de analito. Recoméndase analizar un mínimo de tres concentracións (alta, media e baixa) dentro do rango de concentracións empregado no estudo da linealidade. Deben realizarse un mínimo de cinco determinacións para cada concentración. Ademais, faise para unha concentración no mesmo día (exactitude intra-día) ou en días distintos (exactitude inter-día).

Para o cálculo da exactitude empregárase o erro medio relativo, expresado en porcentaxe:

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

Sendo \bar{x} o valor da media e x_t o valor teórico.

Como criterio de validación o erro medio relativo debe ser menor ou igual ao 15 % con respecto ao valor real, excepto no LLOQ onde a desviación non debe superar o 20%.

A precisión do método analítico describe a reproducibilidade dos resultados, é dicir, a concordancia entre os valores numéricos de varias medidas repetidas, que se fixeron exactamente da mesma forma, ou o que é o mesmo, a distribución dos valores analíticos arredor da súa media. Sempre que se repiten varias medicións analíticas dunha mesma mostra, os datos obtidos dispérsanse debido á presenza dos erros indeterminados ou aleatorios, e a precisión é unha medida deses erros aleatorios. Os parámetros matemáticos a partir dos que se expresa a precisión son a desviación estándar e o coeficiente de variación (CV) tamén chamado desviación estándar relativa. A precisión débese medir utilizando un mínimo de réplicas por cada concentración, aplicadas polo menos a tres niveis de concentración distintos dentro do rango de calibración.

Á súa vez a precisión pode dividirse en: precisión intra-día (repetibilidade) que mide a precisión durante o procesado dunha secuencia de mostras e, a precisión inter-día (reproducibilidade) que mide a precisión do método no tempo. Esta última pode englobar diferentes analistas, equipos, reactivos e incluso laboratorios.

A desviación estándar calcúlase mediante a seguinte fórmula:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Sendo \bar{x} o valor da media, x_i cada unha das medidas individuais e n o número total de medidas realizadas.

A desviación estándar relativa (RSD) é unha medida da variabilidade que se utiliza para referirse á precisión dunha serie de medidas. Tamén se coñece como CV cando se expresa en %.

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

Como criterios de validación, a precisión para cada nivel de concentración non debe superar o 15% agás no LLOQ, onde se permite ata un CV do 20%.

Recuperación

A recuperación ou rendemento de extracción é a relación porcentual entre a resposta do detector obtida a partir dunha cantidade de analito engadido e sometido posteriormente á extracción da mostra biolóxica, e a resposta dese mesmo detector para a mesma concentración verdadeira da substancia estándar pura. A recuperación proporciona unha idea da eficacia da extracción dun método analítico dentro duns límites de variabilidade. Non se busca que a recuperación do analito sexa do 100%, pero si debe ser constante, exacta e reproducible.

O rendemento debe ser calculado polo menos para dúas concentracións do rango (unha baixa e outra alta), e faise con mostras branco ás que se lles engade as cantidades correspondentes de analitos e patrón interno antes da extracción, e con outras mostras branco con patrón interno ás que se lles engade as mesmas cantidades de analitos despois do procedemento de extracción. Estas últimas serán consideradas o 100% do rendemento de extracción. Considéranse valores aceptables de recuperación os que se atopan entre o 70% e o 120%.

IV. Resultados e discusión

*Os resultados do presente capítulo foron publicados nos seguintes artigos:

Suárez-García, A.¹, Álvarez-Freire, I.¹, Bermejo-Barrera, A. M.¹, Cabarcos-Fernández, P.¹, & Tabernero-Duque, M. J.¹ (2023). Disappearance of codeine, morphine and 6-MAM in hair after cessation of abuse. *Forensic science international*, 352, 111855.

Elsevier, ISSN: 0379-0738

¹Instituto de Ciencias Forenses, Servicio de Toxicología Forense, Facultade de Medicina, Universidade de Santiago de Compostela, c/San Francisco s/n, 15782 Santiago de Compostela, España.

Suárez-García, A.¹, Álvarez-Freire, I.¹, Bermejo-Barrera, A. M.¹, Cabarcos-Fernández, P.¹, & Tabernero-Duque, M. J.¹ (2020). Duration of detection of cocaine and metabolites in hair after discontinuation of abuse. *Microchemical Journal*, 153, 104335.

Elsevier, ISSN: 0026-265X

¹Instituto de Ciencias Forenses, Servicio de Toxicología Forense, Facultade de Medicina, Universidade de Santiago de Compostela, c/San Francisco s/n, 15782 Santiago de Compostela, España.

1. Estudo da eliminación de cocaína, benzoilecgonina e cocaetilo do organismo trala abstinencia

Como xa se sinalou previamente, o consumo de cocaína é un problema grave que segue aumentando a nivel mundial. O uso abusivo desta substancia está fortemente asociado a factores de risco tanto físicos como mentais, xerando un impacto directo na saúde e na seguridade pública [43][122]. Na actualidade, acadáronse avances significativos no ámbito das técnicas analíticas empregadas en toxicoloxía forense, o que posibilita que se realicen análises de drogas como a cocaína con alta sensibilidade, rapidez e seguridade cando se trata de matrices complexas como o pelo [11,80,123]. Neste sentido, demostrouse que a análise de pelo é de especial importancia en investigacións sobre o consumo crónico de substancias, xa que permite realizar análises retrospectivas do consumo de drogas[124]. Ademais desta ampla ventá de detección, presenta outras vantaxes xa sinaladas sobre outras matrices convencionais, tales como a súa sinxela recolección e, en casos forenses, a posibilidade de levarse a cabo baixo estrita supervisión para evitar así a súa adulteración [125,126].

Por conseguinte a análise de pelo é útil para abordar diversos problemas clínicos e forenses, como a detección de abuso de drogas, a exposición a drogas durante o embarazo, o seguimento da abstinencia de drogas, a suspensión de permisos de conducir ou a investigación as causas de morte [91,127,128].

Nesta sección avaliarase o tempo de desaparición da cocaína, BEG, e CE no pelo. O método desenvolto baseado en análise por segmentos, aplicarase a mostras de pelo de adictos que se atopaban seguindo un programa de rehabilitación de drogas, co fin de determinar o cumprimento da terapia.

1.1. Resultados da validación da metodoloxía analítica

Como xa se mencionou no apartado de metodoloxía, a validación do método foi realizada seguindo as directrices internacionais da Guía de Validación de Métodos Bioanalíticos para a Industria da FDA [118]. Estudáronse os seguintes parámetros: linealidade, sensibilidade, precisión e exactitude intra- e inter-día, e rendemento do proceso de extracción.

Linealidade

A linealidade avaliouse construíndo curvas de calibrado ($n=7$) para cada analito en mostras de 50 mg pelo branco (sen analitos), engadindo os patróns de cocaína e BEG para os seguintes niveis de concentración: 0-0.2-1-2-4-5-8-10 ng/mg. Para CE, os niveis de concentración foron: 0-0.05-0.1-0.5-1-2-3-5 ng/mg. Estas alícuotas sometéronse ao proceso de extracción anteriormente descrito. Realizouse unha análise de regresión lineal simple, observándose unha linealidade satisfactoria xa que os coeficientes de correlación oscilaron entre 0.997 e 0.998. A Táboa 6 mostra as ecuacións da recta.

Táboa 6. Rectas de calibrado para cada analito.

Substancia	Ecuación	R ²
Cocaína	$y=0.3323x-0.0738$	0.9982
BEG	$y=0.2696x-0.0098$	0.9989
CE	$y=0.169x-0.0073$	0.9977

Sensibilidade

A sensibilidade do método determinouse calculando o límite de detección (LOD) e o límite máis baixo de cuantificación (LLOQ). O LOD obtívose empiricamente mediante a análise de mostras de pelo con concentracións decrecentes dos analitos. O LLOQ é o punto máis baixo da curva de calibración (Táboa 7).

Táboa 7. Límites de detección e límites de cuantificación para cocaína, BEG e CE.

Substancia	LOD (ng/mg)	LOQ (ng/mg)
Cocaína	0.015	0.20
BEG	0.015	0.20
CE	0.025	0.05

Selectividade

A selectividade avaliouose mediante a análise de 8 mostras branco de pelo de diferentes persoas, as cales se sabía con total seguridade que non consumían cocaína. Puido comprobarse que non existían interferencias nos tempos de retención dos analitos.

Exactitude e precisión

Tanto a exactitude como a precisión determináronse mediante ensaios inter-día e intra-día (Táboa 8). Para o estudo inter-día fixéronse 6 determinacións por concentración en diferentes días. Para a cocaína e a BEG as tres concentracións empregadas foron: 0.2-4-10 ng/mg. Para CE os niveis de concentración analizados foron: 0.05-1-5 ng/mg. Nos ensaios intra-día analizáronse 5 réplicas para cada nivel no mesmo día. A precisión, expresada como coeficiente de variación (CV) calculouse como (desviación estándar/media) x 100. Agárdase que sexa inferior ao 15 % en todas as concentracións, agás no LLOQ, onde se acepta ata 20 %.

Táboa 8. Precisión e exactitude intra-día e inter-día.

Concentración (ng/mg)	Intra-día CV (%)	Inter-día CV (%)	Intra-día (%RSD)	Inter-día (%RSD)
Cocaína				
0.2	8.87	9.10	9.54	9.54
4	6.98	6.51	0.24	1.11
10	4.78	5.02	2.38	2.56
BEG				
0.2	9.84	10.10	5.84	6.20
4	2.22	2.03	0.74	2.35
10	6.85	7.05	9.50	10.91
CE				
0.05	7.44	8.11	12.2	10.40
1	1.63	2.73	7.83	9.10
5	2.52	3.90	6.03	6.85

Recuperación

A eficiencia da extracción calculouse en dous niveis de concentración, 5 réplicas da concentración máis baixa e 5 réplicas da concentración máis alta. Nunha primeira quenda engadiuse a mestura de patróns coa concentración coñecida antes do proceso de SPE, mentres que nunha segunda quenda agregouse esta mestura despois da SPE, pero antes da evaporación. Os resultados obtidos móstranse na Táboa 9.

Táboa 9. Porcentaxes de recuperación no procedemento de extracción.

Extr. Rec. (n=5)	0.2 ng/mg	10 ng/mg
Cocaína	95.32	85.50
BEG	97.35	102.1
Extr. Rec (n=5)	0.05 ng/mg	5 ng/mg
CE	101.6	86.60

1.2. Análise de resultados dos casos en programas de rehabilitación

As análises para a detección de drogas en pelo foron utilizadas amplamente no ámbito forense desde a década de 1990 como medio de obtención de probas firmes da inxesta de drogas. En comparación coas matrices convencionais, como o sangue e a urina, o pelo permite documentar o historial de exposición a unha droga a longo prazo, xa que unha vez que se

consume a substancia, vaise acumular na matriz do pelo e polo tanto son difíciles de adulterar [129]. Isto permite obter información cronolóxica do consumo individual de drogas [130]. Outra vantaxe é que posibilita identificar patróns de consumo, así como a súa duración ao longo do tempo [131].

Se se analizan seccións de pelo de persoas que estean ingresadas nun programa de deshabitación e se atopan en abstinencia, será posible avaliar a taxa de desaparición da droga do pelo, despois de interromper o seu consumo. A continuación estudarase o período de desaparición da cocaína e dos seus metabolitos do pelo.

As mostras reais para levar a cabo o estudo da presente Tese, requiriron condicións especiais que dificultaron a súa obtención de forma considerable. O principal desafío foi conseguir un número abundante de mostras, dado que o estudo implica un seguimento de cada paciente a longo prazo. Gran parte dos centros que se ofreceron a colaborar non lograron manter a continuidade necesaria, ou incluso os propios pacientes que comezaban un programa de deshabitación, non permanecían o tempo necesario, sendo a taxa de abandono elevada. Na Táboa 10 preséntase, de todos os pacientes dos que se dispuxeron, o número de casos que resultaron válidos na análise de detección de cocaína. Como se pode observar, recibíronse 71 positivos a cocaína en urina en total, dos cales só foron analizados 43. Os 28 que non se chegaron a analizar foi debido a que abandonaron o programa antes dos 6 meses, ou que a mostra de pelo adquirida non chegaba aos 50 mg requiridos. Nos casos que si se analizaron, descartáronse 23 porque non mantiveron a abstinencia durante todo programa (6 meses), é dicir, observouse un aumento da concentración de cocaína e os seus metabolitos ao longo do tempo; ou abandonaron aos 4 meses, non podendo ser concluíntes as análises dos 3 primeiros segmentos.

Sumado a estes inconvenientes, a pandemia COVID dificultou aínda máis a adquisición de mostras, por iso desde o ano 2020 ata o 2023 non se recibiron casos. Isto foi debido a que a maioría dos programas de deshabitación experimentaron unha interrupción e os participantes non puideron permanecer no centro. Polo tanto, non se puido facer un seguimento exhaustivo para garantir o cumprimento da abstinencia.

Táboa 10. Número de casos reais totais recibidos para a análise.

		Número de participantes por ano				
		2017	2018	2019	2023	Total
Analizados	Válidos	14	2	-	4	20
	Descartados	18	-	5	-	23
Non analizados	Tamaño mostra insuficiente	6	-	-	1	7
	Abandono programa	9	-	4	8	21

A continuación, empregando a metodoloxía descrita na sección anterior, analizáronse segmentos de 1 cm das mostras de pelo para establecer as concentracións residuais de cocaína, BEG e cocaetileno en pelo de individuos en abstinencia. O cut-off da cocaína é 0.5 ng/mg e para BEG e cocaetileno é 0.05 ng/mg segundo o recomendado pola guía da SoHT [4]. Neste estudo seleccionouse como LLOQ 0.2 ng/mg para cuantificar con maior precisión a concentración decrecente de cocaína.

Despois do inicio de dita abstinencia, a concentración detectada de cocaína e os seus metabolitos diminuíu de forma continua como se observa na Figura 11. Anque na maioría dos pacientes as concentracións foron positivas nos 2 primeiros meses, os niveis diminuíron significativamente chegados aos 4 meses de abstinencia. No grupo total estudado de 20 suxeitos, transcorridos 2 meses desde o ingreso no programa, 16 casos foron positivos para cocaína, 13 casos para BEG, e 5 para cocaetilenos. Despois de 4 meses, soamente 4 casos deron valores de concentración maiores ao cut-off para cocaína establecido pola SoHT (0.5 ng/mg). Finalmente transcorridos os 6 meses, todos os suxeitos deron negativo para cocaína, BEG, e cocaetilenos (Táboa 11).

Hai poucas publicacións que investiguen a desaparición da cocaína do pelo en pacientes que se atopan nun programa de deshabitación. En concreto, soamente existen dous estudos que determinan que a duración da detección de cocaína en pelo é de 3-4 meses [132,133]. Na presente Tese seguíronse a pacientes desde o inicio da abstinencia, e segundo os resultados obtidos, as concentracións de cocaína, BEG e CE foron sempre negativas pasados 6 meses da abstinencia controlada polo programa. Así, neste estudo compróbase que aos 3-4 meses de iniciar o programa de deshabitación, aínda nalgúns casos se atoparon concentracións de cocaína superiores ao cut-off, o que demostra a necesidade de agardar 6 meses desde que se deixa de consumir para poder asegurar, con total fiabilidade, que o suxeito abandonou o consumo. Ademais, o que resulta de gran importancia a nivel xudicial, é poder asegurar que o resultado en pelo corresponde verdadeiramente coa realidade, deixando claro que un resultado positivo tras 4 meses de abstinencia pode ser compatible coa afirmación do paciente de que non consumiu durante eses últimos 4 meses.

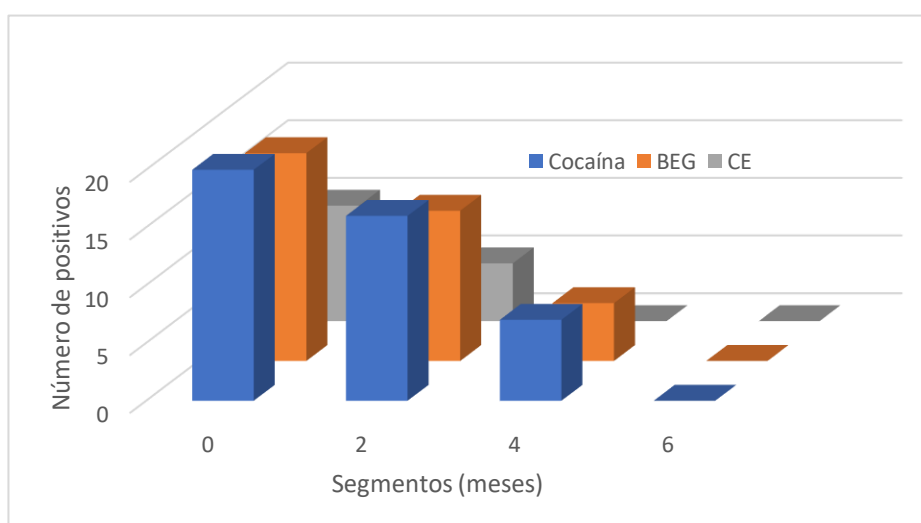


Figura 11. Número de segmentos de pelo positivos para cocaína, BEG e CE.

Táboa 11. Concentracións de cocaína, BEG e CE no segmento 0-1 cm proximal de pelo durante 6 meses de 20 pacientes en abstinencia.

Caso	Idade	Sexo	Último consumo antes de admisión (días)	Tempo de consumo (meses)	Cocaína (ng/mg)				BEG (ng/mg)				Cocaetileno (ng/mg)				Outras drogas consumidas
					Meses en abstinencia												
					0	2	4	6	0	2	4	6	0	2	4	6	
1	27	H	30	120	1.30	0.43	0	0	0.93	0.41	0	0	0	0	0	0	THC, MDMA
2	19	H	30	36	0.56	0	0	0	0.42	0	0	0	0	0	0	0	THC, MDMA
3	40	H	37	168	2.92	0.25	0	0	1.98	0.25	0	0	0.14	0.08	0	0	THC
4	41	H	81	252	0.53	0.25	0.20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	THC
5	43	H	81	264	0.53	0	0	0	0.47	0	0	0	0.27	0	0	0	THC, opiáceos
6	32	H	51	60	0.64	0.42	0.25	0	0.44	0.26	0	0	0.12	0	0	0	Opiáceos
7	51	H	51	360	0.71	0.29	0	0	0.61	0.23	0	0	0.30	0.11	0	0	THC, opiáceos
8	49	H	72	-	2.74	0.85	0.69	0	2.16	0.61	0.38	0	0.59	0	0	0	THC, opiáceos
9	38	M	31	120	19.84	8.26	0.55	0	15.70	5.71	0.55	0	0	0	0	0	THC
10	51	H	7	264	3.31	2.64	0.51	0	3.04	2.40	0.39	0	0	0	0	0	opiáceos
11	35	M	88	72	0.28	0.25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	THC, opiáceos
12	28	H	79	120	1.69	0.28	0	0	1.07	0	0	0	0	0	0	0	THC, opiáceos
13	35	M	20	240	1.90	0.47	0.30	0	1.42	0.86	0.41	0	0	0	0	0	THC, opiáceos
14	31	H	84	60	0.96	0.27	0	0	0.51	0.29	0	0	0	0	0	0	THC, MDMA
15	45	H	90	336	1.33	0.31	0	0	0.81	0.37	0	0	0.48	0.24	0	0	THC, opiáceos
16	47	H	53	24	5.00	0	0	-	2.80	0	0	-	0	0	0	-	-
17	31	M	35	60	4.30	1.50	0.98	0	2.20	0.80	0.27	0	0.60	0	0	0	THC
18	36	H	28	216	2.60	1.74	0	0	0.70	0.40	0	0	0.90	0.50	0	0	THC
19	35	H	31	180	5.0	4.30	0	0	3.50	1.60	0	0	1.40	0.70	0	0	-
20	33	H	30	204	0.75	0	0	-	1.56	0	0	-	0.67	0	0	-	THC

H:Home; M:Muller

A Figura 12 mostra os cromatogramas correspondentes ao paciente 3 da Táboa 11.

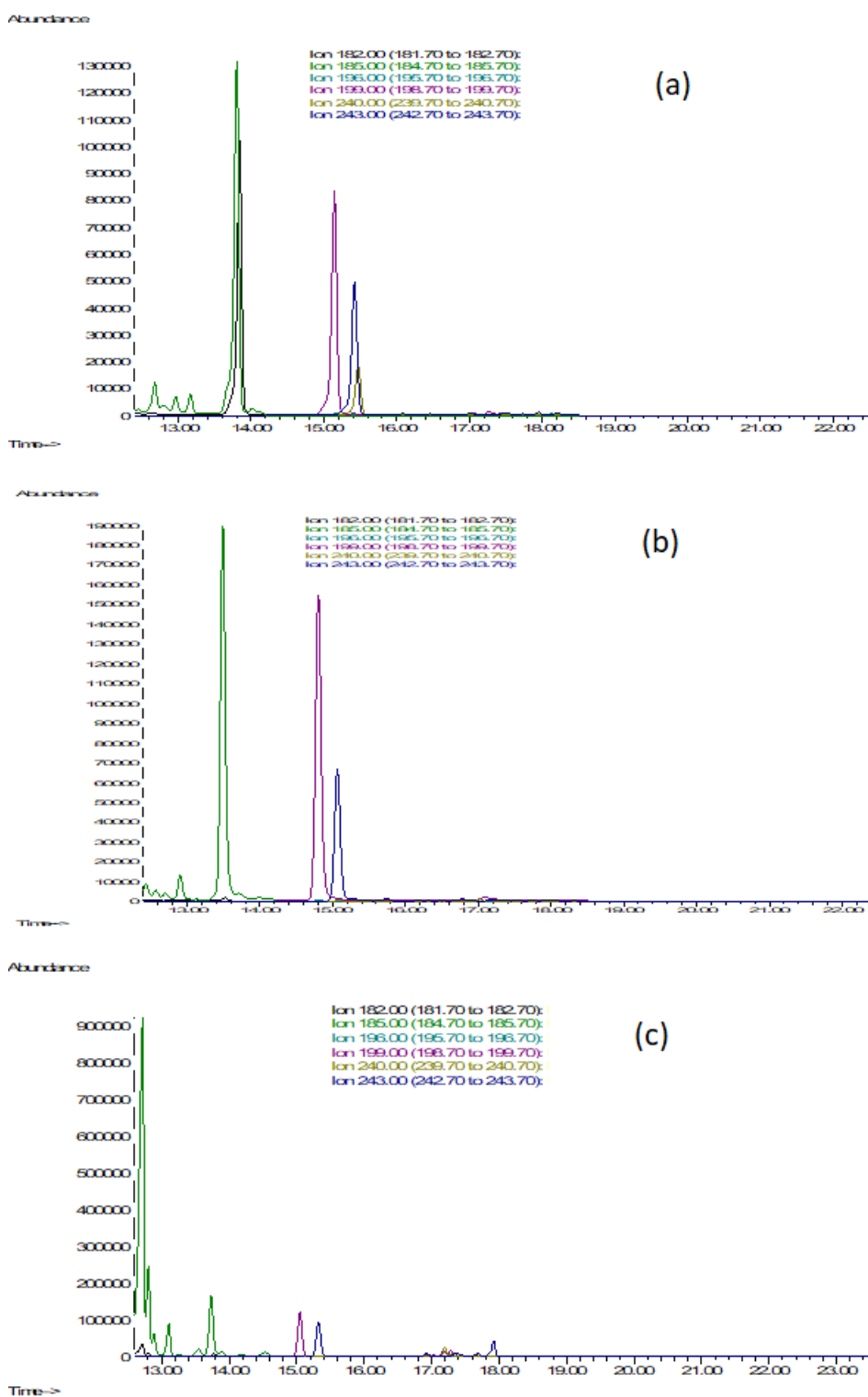


Figura 12. Cromatogramas correspondentes a cada segmento de pelo do paciente 3. (a) Segmento 1 correspondente ao momento do ingreso. (b) Segmento 2, aos 2 meses do ingreso. (c) Segmento 3 aos 4 meses do ingreso.

2. Estudo da eliminación da morfina, codeína e 6-MAM do organismo trala abstinencia

O consumo de opioides segue sendo un problema importante en todo o mundo debido ás graves consecuencias que produce na saúde. A heroína continúa sendo un dos opioides máis consumidos, con arredor de 31 millóns de adictos segundo os últimos datos [43]. Trátase dun opiáceo semisintético da morfina, que debido á súa curta vida media, rara vez é detectable en fluídos corporais. Despois da súa administración, metabolízase rapidamente a 6-MAM, e esta á súa vez transfórmase en morfina [134].

En usuarios crónicos de heroína, hai estudos que demostran que os seus metabolitos poden detectarse en concentracións máis altas do esperado en el pelo durante varios meses despois de deixar o consumo da droga [135]. Unha explicación a isto é que estas substancias permanecen almacenadas nos folículos capilares durante períodos prolongados [103].

Nesta sección avaliarase o tempo total necesario para que a morfina, a codeína e a 6-MAM sexan indetectables no pelo unha vez que cesou o seu consumo. Para lograr este obxectivo, desenvolveuse un método baseado na análise por segmentos de cabelo procedente de persoas ingresadas nun programa de deshabitación de drogas.

2.1. Resultados da validación da metodoloxía analítica

Ao igual que no método anterior, a validación do presente método foi realizada seguindo as directrices da guía da FDA [118]. Estudáronse os seguintes parámetros: linealidade, sensibilidade, precisión e exactitude intra- e inter-día, e rendemento do proceso de extracción.

Linealidade

Para avaliar a linealidade, tomáronse alícuotas de 50 mg de pelo sen drogas, ás cales se lles engadiu un volume determinado de disolucións estándar de morfina, codeína e 6-MAM a diferentes concentracións: 0-0.2-0.5-0.8-1-2-4-5 ng/mg. A curvas de calibración repetíronse 7 veces. As mostras extraéronse seguindo o procedemento previamente descrito. Posteriormente, realizouse unha análise por regresión lineal nas alícuotas. Segundo se reflexa na Táboa 12, os coeficientes de correlación, foron superiores a 0.99 para o rango de concentración estudado. Isto indica a fiabilidade e a precisión da calibración.

Táboa 12. Rectas de calibrado para cada analito.

Substancia	Ecuación	R ²
Codeína	$y=0.1617x-0.0109$	0.9979
Morfina	$y=0.1841x-0.0151$	0.9982
6-MAM	$y=0.1178x-0.0072$	0.9983

Sensibilidade

A sensibilidade do método determinouse calculando o límite de detección (LOD) e o límite máis baixo de cuantificación (LLOQ). O LOD obtívose empiricamente mediante a análise de mostras de pelo con concentracións decrecentes dos analitos. O LLOQ é o punto máis baixo da curva de calibración (Táboa 13).

Táboa 13. Límites de detección e límites de cuantificación para codeína, morfina e 6-MAM

Substancia	LOD (ng/mg)	LOQ (ng/mg)
Codeína	0.15	0.20
Morfina	0.15	0.20
6-MAM	0.15	0.20

Selectividade

A selectividade avalíouse mediante a análise de 8 mostras de pelo de diferentes persoas, as cales se sabía con total seguridade que non consumen opioides. Puido comprobarse que non existían interferencias nos tempos de retención dos analitos.

Exactitude e precisión

A precisión e a exactitude das medicións avaliáronse mediante ensaios inter-día e intra-día. Para a avaliación inter-día, realizáronse 6 determinacións para cada concentración en diferentes días. A precisión e a exactitude intra-día determináronse preparando e analizando cinco réplicas en tres niveis de concentración (baixo, medio e alto) no mesmo día (Táboa 14).

Táboa 14. Precisión e exactitude intra-día e inter-día.

Concentración (ng/mg)	Intra-día CV (%)	Inter-día CV (%)	Intra-día (%RSD)	Inter-día (%RSD)
Codeína				
0.2	10.97	13.20	6.45	5.95
1	3.27	6.19	10.82	9.45
5	10.37	3.25	8.13	7.83
Morfina				
0.2	3.53	12.15	10.30	11.10
1	2.74	3.26	7.22	5.42
5	0.93	5.90	6.97	8.03
6-MAM				
0.2	2.85	6.38	12.65	10.05
1	4.62	4.47	0.59	2.15
5	9.20	6.15	4.87	6.12

Recuperación

A eficiencia da extracción calculouse en dous niveis de concentración, 5 réplicas da concentración máis baixa e 5 réplicas da concentración máis alta. Nunha primeira quenda engadiuse a mestura de patróns coa concentración coñecida antes do proceso de SPE, mentres

que nunha segunda quenda agregouse esta mestura despois da SPE, pero antes da evaporación. Os resultados obtidos móstranse na Táboa 15.

Táboa 15. Porcentaxes de recuperación no procedemento de extracción.

Extr. Rec. (n=5)	0.2 ng/mg	5 ng/mg
Codeína	91.6	86.3
Morfina	101.6	83.0
6-MAM	88.1	84.1

2.2. Análise de resultados dos casos en programas de rehabilitación

De igual modo que no estudo do tempo de desaparición de cocaína, a obtención de mostras reais para o estudo da eliminación de heroína do pelo, foi de especial dificultade. Sumado ás complicacións xa comentadas, como alta taxa de abandono ou a baixa continuidade dos centros, prodúcese un menor número de ingresos en programas de rehabilitación por adicción á heroína. Isto é debido a que afortunadamente, na actualidade, a prevalencia do consumo de heroína é menor que no caso da cocaína.

Na Táboa 16 preséntanse tódolos casos recibidos, un total de 32, dos cales 24 foron analizados. Os 8 casos non analizados foi debido a que abandonaron o programa antes dos 6 meses. Dos 24 estudados, 7 descartáronse debido a que non mantiveron a abstinencia durante os 6 meses en estudio e puido observarse unha concentración crecente dos metabolitos da heroína (morfina, codeína e 6-MAM). Polo tanto, finalmente conseguíronse 17 pacientes con mostras válidas para o estudo.

Táboa 16. Número de casos reais totais recibidos para a análise.

		Número de participantes por ano				Total
		2017	2018	2019	2023	
Analizados	Válidos	13	3	-	1	17
	Descartados	4	-	2	1	7
Non analizados	Tamaño mostra insuficiente	-	-	-	-	-
	Abandono programa	6	-	-	2	8

Utilizando a metodoloxía descrita anteriormente para a determinación de opioides en pelo, analizáronse os segmentos de pelo de 1 cm da zona proximal, enviados secuencialmente ao longo do estudo para a súa determinación, para poder calcular as concentracións residuais de codeína, morfina e 6-MAM durante o período de abstinencia.

Neste traballo elixiuse 0.2 ng/mg como LLOQ para cuantificar a concentración decrecente de opioides nos segmentos consecutivos estudados. Seleccionouse este cut-off porque é o recomendado segundo a guía da SoHT para morfina, codeína e 6-MAM [4]. Como se advirte na Figura 13, despois de cesar o consumo de droga, os niveis de concentración dos metabolitos diminuíron notablemente co tempo.

Observouse que despois dos 2 primeiros meses de abstinencia, dos 17 analizados so 3 de las mostrás analizadas resultaron positivas a codeína, e 4 para morfina e 6-MAM. Despois de 4 meses, soamente 2 mostrás seguían sendo positivas a 6-MAM, 1 a morfina e ningunha a codeína. Finalmente transcorridos 6 meses, en todas as mostrás dos pacientes en estudio a concentración de codeína, morfina e 6-MAM foi negativa (Táboa 17).

Na literatura científica consultada, hai poucos traballos publicados sobre o tempo de desaparición de drogas en cabelo de adictos que comezan a abstinencia. En concreto para os metabolitos da heroína soamente se atopou un estudo [136], que conclúe 3 meses como tempo de eliminación. Na presente Tese seguíronse a 17 pacientes desde o inicio da súa abstinencia nun centro de rehabilitación. Os resultados anteriormente analizados mostraron que, anque despois dos 2 primeiros meses na maioría dos casos as concentracións de codeína, morfina e 6-MAM foron negativas, aínda había algúns casos con resultados positivos, o que demostra que se necesitan 6 meses para asegurar a completa desaparición da heroína, morfina y 6-MAM do cabelo. Estes resultados indican a importancia de coñecer estes intervalos para evitar unha interpretación errónea dun resultado positivo en pacientes en período de deshabitación.

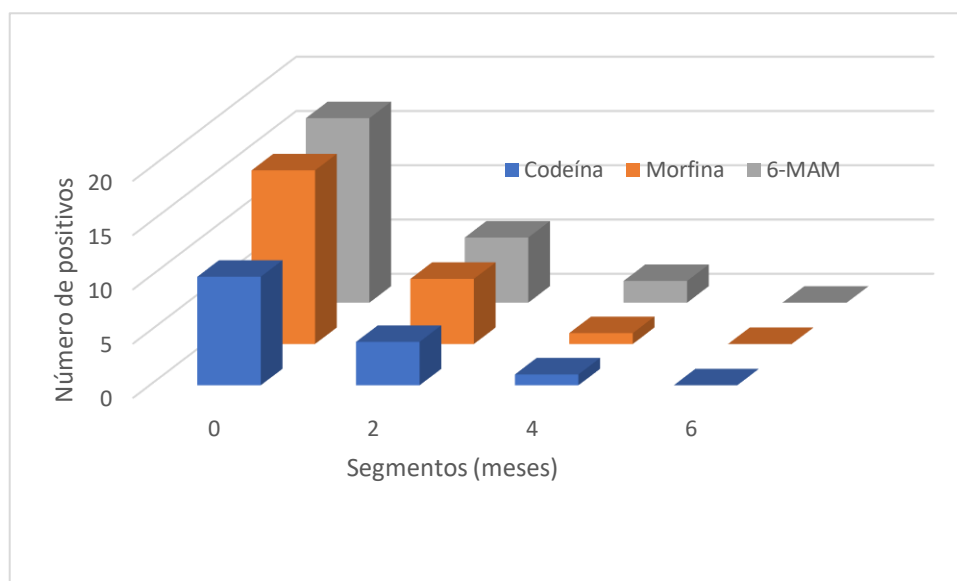


Figura 13. Número de segmentos de pelo positivos para codeína, morfina e 6-MAM.

Táboa 17. Concentracións de codeína, morfina e 6-MAM no segmento 0-1 cm proximal de pelo durante 6 meses, de 17 pacientes en abstinencia.

Mostra	Idade	Sexo	Último consumo antes de admisión (días)	Tempo de consumo (meses)	Codeína (ng/mg)				Morfina (ng/mg)				6-MAM (ng/mg)				Outras drogas consumidas
					Meses en abstinencia												
					0	2	4	6	0	2	4	6	0	2	4	6	
1	55	H	54	480	0.37	0.30	*	0	1.01	0.78	0.45	0	1.13	0.68	0.42	0	THC
2	29	H	79	120	0.31	0	0	0	0.88	0.22	0	0	0.98	*	0	0	THC
3	44	H	26	324	0.78	0.52	0	0	1.49	0.47	0	0	1.33	0.52	0	0	THC, cocaína
4	49	H	72	-	0.40	0.25	0	0	1.20	0.26	0	0	1.17	0.29	0.21	0	THC, cocaína
5	49	M	65	120	0.21	0	0	-	0.60	0	0	-	2.48	0	0	-	Cocaína
6	27	H	-	-	0	0	0	-	0.58	0	0	-	1.12	0	0	-	THC, MDMA
7	19	H	-	-	0	0	0	-	0.54	0	0	-	1.10	0	0	-	THC, cocaína
8	39	H	-	-	0	0	0	-	0.56	0	0	-	1.14	0	0	-	THC, cocaína
9	41	H	-	-	0	0	0	-	0.55	0	0	-	1.25	0	0	-	THC, cocaína
10	43	H	-	15	0	0	0	-	0	0	0	-	1.13	0	0	-	THC, cocaína
11	32	H	25	48	*	0	0	-	0.64	0	0	-	1.27	0	0	-	Cocaína
12	45	M	81	120	*	0	0	0	0.61	*	0	0	1.06	*	0	0	Cocaína
13	34	H	74	144	0.34	0	0	-	1.08	0	0	-	1.63	0	0	-	Cocaína
14	51	H	46	204	0	0	0	-	0.51	0	0	-	0.91	0	0	-	-
15	51	H	66	300	0	0	0	-	1.26	0	0	-	1.24	0	0	-	THC, cocaína
16	51	H	73	12	0.70	0	0	-	2.70	0	0	-	3.38	0	0	-	-
17	46	H	14	360	0.28	*	0	0	1.74	*	0	0	4.30	1.27	0	0	THC

H: Home; M: Muller.

*Valor da concentración entre o LOD e o LLOQ.

A Figura 14 mostra os cromatogramas correspondentes ao paciente 17 da Táboa 17.

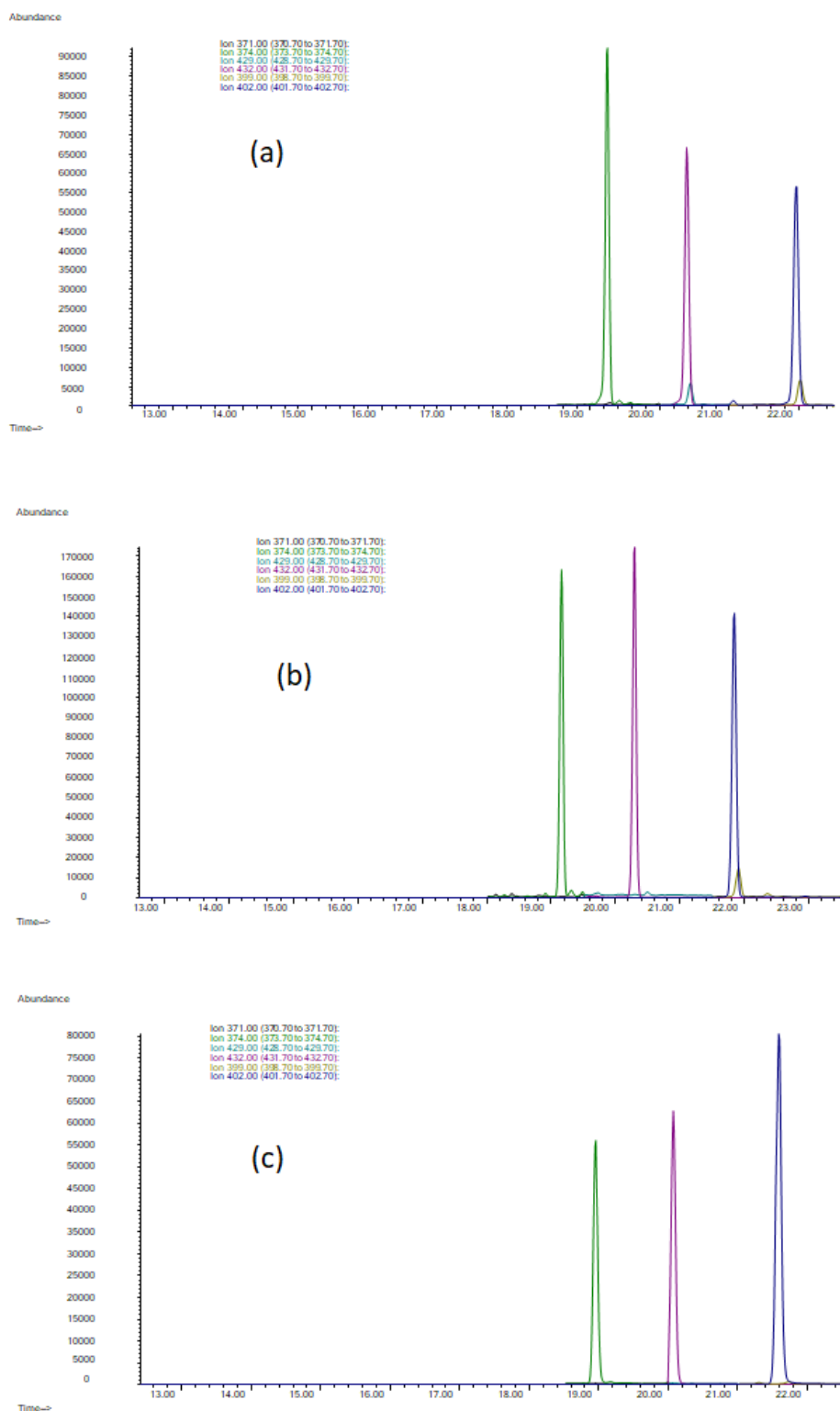


Figura 14. Cromatogramas correspondentes a cada segmento de pelo do paciente 17. (a) Segmento 1 correspondente ao momento do ingreso. (b) Segmento 2, aos 2 meses do ingreso. (c) Segmento 3 aos 4 meses do ingreso.

3. Estudo da eliminación de cannabinoides do organismo trala abstinencia

Ao igual que en moitos países, en España o cannabis é a droga ilícita máis consumida [45]. O termo xeral “cannabis” emprégase para nomear aos diferentes compoñentes psicoactivos da planta *Cannabis sativa*. Non obstante, é o THC, que é un dos compostos presentes na planta máis importantes e o que se atopa en maior proporción, o que lle confire as propiedades psicoactivas. O THC é moi soluble en lípidos o que fai que a súa liberación sexa lenta e o seu efecto se prolongue durante varios días [137]. No ámbito forense soe investigarse a presenza en pelo tanto de THC coma do seu principal metabolito, THC-COOH, que permite distinguir o consumo da exposición pasiva [97]. Ademais, tamén se determinan de forma habitual o CBN e o CBD, os principais cannabinoides non psicoactivos presentes na planta [138].

A continuación preséntase os resultados da validación levada a cabo para determinar a presenza de THC, CBD, CBN E THC-COOH en pelo.

3.1. Resultados da validación da metodoloxía analítica

A validación do presente método realizouse calculando os mesmos parámetros que nos métodos anteriores, acordados pola FDA [118]: linealidade, sensibilidade, selectividade, exactitude, precisión e recuperación.

Linealidade

A linealidade avalíase coma nos métodos anteriores, construindo curvas de calibrado ($n=7$) para cada analito en mostras de 50 mg pelo branco (sen analitos), engadindo os patróns de THC, CBN, CBD e THC-COOH para os seguintes niveis de concentración: 0-0.05-0.1-0.5-1-2-3-5 ng/mg. Estas alícuotas sometéronse ao proceso de extracción anteriormente descrito. Realizouse unha análise de regresión lineal simple, observándose unha linealidade satisfactoria xa que os coeficientes de correlación oscilaron entre 0.998 e 0.999. A Táboa 18 mostra as ecuacións da recta.

Táboa 18. Rectas de calibrado para cada analito.

Substancia	Ecuación	R ²
THC	$y=0.9991x-0.0131$	0.9990
THC-COOH	$y=1.0022x+0.0098$	0.9998
CBD	$y=2.3026x-0.1412$	0.9984
CBN	$y=1.2394x+0.1397$	0.9982

Sensibilidade

A sensibilidade do método determinouse calculando o límite de detección (LOD) e o límite máis baixo de cuantificación (LLOQ). O LOD obtívose empiricamente mediante a análise de mostras de pelo con concentracións decrecentes dos analitos. O LLOQ é o punto máis baixo da curva de calibración (Táboa 19).

Táboa 19. Límites de detección e límites de cuantificación para THC, THC-COOH, CBD e CBN.

Substancia	LOD	LOQ
THC	0.01	0.05
THC-COOH	0.009	0.05
CBD	0.02	0.05
CBN	0.03	0.05

Selectividade

A selectividade avaliouse mediante a análise de 8 mostras de pelo de diferentes persoas, as cales se sabía con total seguridade que non consumen cannabis. Puido comprobarse que non existían interferencias nos tempos de retención dos analitos.

Exactitude e precisión

A precisión e a exactitude determináronse mediante ensaios inter-día e intra-día. A precisión e exactitude inter-día avaliáronse mediante 6 determinacións para cada concentración en diferentes días. A precisión e exactitude intra-día determináronse en tres concentracións (0.05-1-5 ng/mg), preparando e analizando 5 réplicas para cada nivel, no mesmo día. A precisión exprésase como coeficiente de variación (CV) dos valores medidos (Táboa 20).

Táboa 20. Precisión e exactitude intra-día e inter-día.

Concentración (ng/mg)	Intra-día CV (%)	Inter-día CV (%)	Intra-día (%RSD)	Inter-día (%RSD)
THC-COOH				
0.05	10.7	10.8	2.20	2.20
1	4.50	5.50	4.96	5.11
5	4.40	6.10	2.38	2.56
THC				
0.05	10.2	10.4	6.10	6.20
1	5.70	5.50	5.30	6.10
5	3.60	4.20	3.39	3.91
CBD				
0.05	3.40	4.10	19.1	18.2
1	4.60	5.70	8.4	10.3
5	6.90	7.20	5.5	6.80
CBN				
0.05	15.40	14.8	2.00	2.20
1	12.14	12.3	6.63	7.09
5	13.67	13.9	18.07	17.09

Recuperación

A eficiencia da extracción calculouse en dous niveis de concentración, 5 réplicas da concentración máis baixa e 5 réplicas da concentración máis alta. Nunha primeira quenda engadiuse a mestura de patróns coa concentración coñecida antes do proceso de SPE, mentres que nunha segunda quenda agregouse esta mestura despois da SPE, pero antes da evaporación. Os resultados obtidos móstranse na Táboa 21.

Táboa 21. Porcentaxes de recuperación no procedemento de extracción.

Extr. Rec. (n=5)	0.05 ng/mg	5 ng/mg
LLE THC-COOH	70.61	89.5
LLE THC	73.50	78.2
LLE CBD	73.27	100.39
LLE CBN	82.57	84.02

3.2. Análise de resultados dos casos en programas de rehabilitación

Como xa se describiu ao longo dos métodos anteriores, a recollida de mostras reais complicouse debido ás condicións especiais requiridas, o que ocasionou que a presente Tese se prolongase ao longo do tempo. Ademais dos inconvenientes xa mencionados, como a alta taxa de abandono por parte dos participantes e a baixa continuidade dos centros, no caso de consumidores de cannabis apenas hai ingresos por consumo único desta droga. Entón dos poucos casos achegados, na maioría a mostra non foi suficiente porque se tivo que empregar gran parte na análise de cocaína e/ou opiáceos.

O total de casos recibidos para esta Tese foron 75, dos cales soamente 4 ingresaron no programa de deshabitación por consumo exclusivo de cannabis. O número de pacientes con policonsumo entre os que estaba o cannabis foi de 44, pero 23 abandonaron o programa e dos 21 restantes, en 19 a mostra non foi suficiente. Polo tanto, soamente se obtiveron 2 análises válidas no primeiro segmento. Debido a isto, non se pode chegar a ningún resultado concluínte sobre o tempo de desaparición de cannabinoides en pelo, trala abstinencia.

4. Discusión xeral

Existen estudos previos á presente Tese que indicaron diferentes patróns de eliminación do pelo de diversas drogas de abuso e de medicamentos. Estas investigacións foron publicadas e recóllense na Táboa 22. O primeiro artigo publicado data de 1990 onde Nakahara et al. [139] investigaron a diminución dos niveis de metoxifenamina (MOP) no pelo. As concentracións de MOP producidas por doses que se administraron durante 7 días, diminuíron arredor do 50% da concentración inicial despois de 5 a 6 meses.

Táboa 22. Duración da detección de varias drogas de abuso en pelo despois da abstinencia.

Substancias	Meses necesarios para obter resultados negativos en pelo trala abstinencia	Referencias
Metoxifenamina	Redución do 50% aos 5-6 meses	[139]
Metanfetamina	4-5	[140,141]
Anfetamina	4-5	[140,141]
Tramadol	3-4	[142]
THC-COOH	6-7	[142]
Ketamina	6-7	[143]
Heroína	3	[136]
Heroína	6	Presente estudo
Cocaína	3-4	[132,133]
Cocaína	6	Presente estudo

Outra investigación relevante da desaparición de droga no pelo foi publicada por Shen et al. [136]. Neste estudo determinouse o tempo de desaparición da codeína, da morfina e da 6-MAM nun tamaño de mostra de 32 mulleres que deixaron de consumir heroína durante 4-5 meses. Os resultados obtidos suxeriron que un segmento de pelo proximal (1cm) despois dun período de abstinencia de 3 meses, debería estar libre dos analitos cunha concentración por debaixo do nivel de cut-off proposto pola SoHT para 6-MAM e a morfina (0.2 ng/mg).

Felli et al. [132] levaron a cabo un estudo sobre a desaparición de cocaína do pelo durante 10 meses nunha muller que deixou de consumir. Os resultados demostraron que non se encontrou cocaína nas seccións máis próximas á raíz (1.5 cm) analizadas 5 meses despois do último consumo. Existe un segundo estudo sobre a desaparición de cocaína [133], que a diferenza do primeiro tamén incluíu a BEG como principal metabolito da cocaína. Realizouse unha análise retrospectiva con datos de 137 suxeitos que tiñan concentracións gradualmente decrecentes de cocaína e/ou BEG en mostras de pelo secuenciais, nos cales puido observarse que nos segmentos en situación distal (é dicir, máis temperán no tempo) había niveis de concentracións de droga máis altos, e niveis máis baixos non medibles no segmento máis próximo ó coiro cabeludo (máis preto á data de mostraxe). Neste estudo concluíuse que deben pasar de 3 a 4 meses antes de obter un resultado negativo no segmento proximal ao coiro cabeludo.

Outra droga sobre a que se estudou o seu tempo de desaparición no pelo foi a metanfetamina e o seu metabolito anfetamina, nun total de 63 adictos crónicos que recentemente deixaran de consumir durante un programa de rehabilitación [140]. A maioría dos pacientes deron positivo a metanfetamina ata os 90 días de abstinencia informada, pero aos 120 días a taxa de detección diminuíu ata o 16%. Todos os suxeitos deron negativo para metanfetamina despois de 153 días de abstinencia. Para a anfetamina a duración da detección alcanzou os 106 días. Os autores deste estudo concluíron que a análise de pelo de consumidores crónicos de metanfetamina debería dar negativa despois de 6 meses de abstinencia declarada.

Wang et al. [141] tamén investigaron a diminución das concentracións de enantiómeros R/S da metanfetamina e da anfetamina en 13 mulleres en bo estado de saúde que acudiron a un centro de rehabilitación e deixaron de consumir metanfetamina durante 4-5 meses. Os resultados do estudo suxeriron que a R/S-metanfetamina e a R/S-anfetamina pode detectarse no pelo de ex adictos durante aproximadamente 4 meses despois do comezo da abstinencia.

Nun estudo máis recente, Kintz et al. [142] analizaron mostras de pelo de 8 usuarios crónicos de tramadol despois de 3-6 meses de abstinencia, e 15 usuarios de cannabis despois de 8-9 meses de abstinencia. No caso do tramadol obtivéronse resultados negativos transcorridos 3-4 meses, mentres que para o cannabis tiveron que pasar 6-7 meses despois de cesar o consumo.

Por último, unha das drogas na que se estudou máis recentemente a súa desaparición en cabelo foi a ketamina [143]. Para iso investigouse unha paciente que recibira tres doses de ketamina como tratamento para a depresión. Unha vez que cesou a terapia, a ketamina continuou sendo detectable durante máis de 4 meses, cunha diminución de case o 97% aos 6 meses.

No estudo que presenta esta Tese Doutoral, de acordo cos estudos existentes xa mencionados, pode establecerse que a desaparición de droga no pelo despois da abstinencia non é inmediata, xa que a transición de resultados positivos a negativos pode durar algúns meses dependendo das propiedades físicoquímicas da substancias así como factores externos que afecten á matriz. Tanto para a cocaína como para os opiáceos deben pasar como mínimo 6 meses para obter un resultado negativo tras deixar de consumir.

Por conseguinte, pode ser difícil diferenciar a abstinencia da exposición a niveis baixos de droga nos meses seguintes á interrupción do consumo, por iso adquire especial importancia que as mostras aportadas ao estudo estean baixo unha supervisión estrita para certificar que non se produciu consumo esporádico. Fundamentalmente nesta causa radica a maior dificultade para levar a cabo un estudo destas características, e sexa unha posible explicación a que actualmente existan tan poucas investigacións. Das que hai, na súa maior parte, implican un número reducido de pacientes, xa que asegurar a supervisión e cumprimento da abstinencia durante períodos tan longos é verdadeiramente difícil. A aportación principal deste traballo radica precisamente neste número de pacientes incluídos cun seguimento controlado e a constatación de que, ata transcorridos 6 meses do inicio da abstinencia, non se pode asegurar un resultado negativo. Isto ten unha implicación fundamental na interpretación de resultados analíticos neste tipo de pacientes, moitos dos cales están inmersos en procesos xudiciais e deben acreditar a total abstinencia e o cumprimento dos programas de deshabitación.

5. Dificultades e limitacións do estudo

Como se describiu anteriormente, o emprego do cabelo como matriz aporta importantes vantaxes sobre outras metodoloxías, debido a que unha soa mostra proporciona unha gran ventá de detección, pode ser facilmente obtida sen violar a privacidade do individuo e pódese almacenar e transportar de forma sinxela. Ademais, a súa alteración é practicamente imposible.

Para levar a cabo o estudo toxicolóxico proposto nesta Tese, foron necesarias unhas condicións especiais nas que o suxeito que proporcionase a mostra tiña que estar baixo o control dun programa de deshabitación, e así poder confirmar que realmente se atopaba en abstinencia. O principal inconveniente deste traballo foi precisamente a dificultade de obter as mostras necesarias para levalo a cabo, dado que é un estudo a longo prazo e que esixe un seguimento de cada paciente. A maioría dos centros que en principio se ofreceron a colaborar no puideron manter a continuidade necesaria e moitos casos nos que se obtivo unha primeira (e incluso segunda) mostra non terminaron as recollidas e envíos posteriores polo que as mostras analizadas e clasificadas tiveron que ser rexeitadas. Ao final, só se dispuxo dun centro cun programa de rehabilitación que colaborase proporcionando con regularidade as mostras para a análise. Así mesmo, tamén hai que ter en conta non só a dispoñibilidade dos centros senón a dos propios pacientes, que moitas veces comezan un programa de deshabitación pero non todos chegan ao final, sendo moi alta a taxa de abandono. Neste estudo, dos usuarios do centro dispostos a participar, un número considerable abandonou o programa antes dos 6 meses necesarios para que o estudo fose efectivo.

Sumado a estes desafíos, a pandemia da COVID engadiu complexidade ao presente estudo cun contexto tan específico, como son os programas de deshabitación. Os participantes da investigación viron que o acceso ao programa quedou limitado debido ás restricións de mobilidade, e as medidas de distanciamento social dificultaron a comunicación directa cos participantes e a recollida das mostras. As visitas presenciais aos centros de tratamento foron restrinxidas durante a pandemia. Ademais, a maioría dos programas de deshabitación experimentaron unha interrupción que afectou á continuidade do tratamento. Tamén se debe ter en conta que, durante a pandemia, houbo cambio nos patróns de consumo, e no comportamento das persoas adictas. Por isto non se puido levar a cabo un control exhaustivo dos participantes que garantise o cumprimento das restricións no consumo.

Atendendo a estas consideracións, é importante ter en conta e adaptar as estratexias de investigación, así como considerar estes factores na conseguinte análise dos resultados para chegar a conclusións significativas.

V. Conclusiones

1. Desenvolveuse un procedemento de extracción en fase sólida para cocaína e opiáceos, e extracción líquido-líquido para cannabinoides. Resultaron ser técnicas de gran utilidade cando se dispón de pouca cantidade de mostra e os rendementos obtidos foron satisfactorios.
2. Desenvolveuse e validouse un método de determinación mediante GC-MS para a identificación e cuantificación simultánea de cocaína e opiáceos e os seus metabolitos, e tamén para cannabinoides en cabelo. O método demostrou ser específico e sensible, cumprindo cos cut-off recomendados pola SoHT para cocaína, opiáceos e cannabis.
3. Estudáronse 20 pacientes adictos á cocaína desde que iniciaron a súa abstinencia nun programa de deshabitación. Tomouse como LLOQ o valor de 0.20 ng/mg para cocaína e BEG, e 0.05 ng/mg para CE. Analizáronse 4 segmentos de 1 cm cada un para cada paciente, sendo o primeiro segmento recollido no momento do ingreso e os seguintes cada 2 meses.
4. Dos 20 casos iniciais positivos a cocaína, BEG e CE, no segundo segmento tomado aos 2 meses, obtivéronse 16 casos positivos a cocaína, 13 para BEG e 5 para CE. Despois de 4 meses, aínda se puido determinar cocaína en 7 pacientes, BEG en 5 pacientes e para CE foron todos negativos. Finalmente, aos 6 meses todas as análises deron negativo.
5. Os resultados obtidos poñen de manifesto que se necesitan 6 meses de abstinencia verificada para asegurar con total certeza a desaparición de cocaína, BE e CE do pelo.
6. Estudáronse 17 pacientes adictos aos opiáceos que ingresaron nun programa de deshabitación. Tomouse como LLOQ o valor de 0.20 ng/mg para codeína, morfina e 6-MAM. Analizáronse 4 segmentos de 1 cm cada un para cada paciente, sendo o primeiro segmento recollido no momento do ingreso e os seguintes cada 2 meses.
7. Dos 17 casos iniciais, 10 foron positivos a codeína, 16 a morfina e 17 a 6-MAM. Pasados 2 meses, analizouse o segundo segmento de cada paciente, e obtivéronse 4 positivos a codeína, 6 a morfina e 6 a 6-MAM. Despois de 4 meses, soamente 1 caso foi positivo a codeína e a morfina, e 2 casos foron positivos a 6-MAM. Pasados os 6 meses, todos os casos analizados resultaron negativos a morfina, codeína e 6-MAM.
8. Os resultados obtidos para os opiáceos mostran que se necesitan 6 meses de abstinencia controlada para asegurar a total desaparición de codeína, morfina e 6-MAM do pelo.

VI. Bibliografía

- [1] B.S. Levine, S. Kerrigan, Principles of Forensic Toxicology: Fifth Edition, 2020. doi:10.1007/978-3-030-42917-1.
- [2] A. Lugli, M. Clemenza, P.E. Corso, J. Di Costanzo, R. Dirnhofer, E. Fiorini, C. Herborg, J.T. Hindmarsh, E. Orvini, A. Piazzoli, E. Previtali, A. Santagostino, A. Sonnenberg, R.M. Genta, The medical mystery of Napoleon bonaparte: An interdisciplinary exposé, *Adv. Anat. Pathol.* 18 (2011) 152–158. doi:10.1097/PAP.0b013e31820ca329.
- [3] A.M. Baumgartner, P.F. Jones, W.A. Baumgartner, C.T. Black, Radioimmunoassay of hair for determining opiate-abuse histories, *J. Nucl. Med.* 20 (1979) 748–752.
- [4] G.A.A. Cooper, R. Kronstrand, P. Kintz, Society of Hair Testing guidelines for drug testing in hair, *Forensic Sci. Int.* 218 (2012) 20–24. doi:10.1016/j.forsciint.2011.10.024.
- [5] P. Kintz, Hair analysis in forensic toxicology, *WIREs Forensic Sci.* 1 (2018) 1–11. doi:10.1002/wfs2.1196.
- [6] G.A.A. Cooper, *Anatomy and Physiology of Hair, and Principles for its Collection*, Elsevier Inc., 2015. doi:10.1016/B978-0-12-801700-5.00001-7.
- [7] L.J. Wolfram, Human hair: A unique physicochemical composite, *J. Am. Acad. Dermatol.* 48 (2003) 106–114. doi:10.1067/mjd.2003.276.
- [8] H. Wosicka, K. Cal, Targeting to the hair follicles: Current status and potential, *J. Dermatol. Sci.* 57 (2010) 83–89. doi:10.1016/j.jdermsci.2009.12.005.
- [9] F. Musshoff, G. Schwarz, H. Sachs, G. Skopp, T. Franz, Concentration distribution of more than 100 drugs and metabolites in forensic hair samples, *Int. J. Legal Med.* 134 (2020) 989–995. doi:10.1007/s00414-020-02259-3.
- [10] C. Davies, L. Gautam, A. Grela, J. Morrissey, Variability associated with interpreting drugs within forensic hair analysis: A three-stage interpretation, *J. Appl. Toxicol.* 40 (2020) 868–888. doi:10.1002/jat.3959.
- [11] H. Yan, P. Xiang, M. Shen, Current status of hair analysis in forensic toxicology in China, *Forensic Sci. Res.* 6 (2021) 240–249. doi:10.1080/20961790.2021.1921945.
- [12] C. Jurado Montoro, Análisis de drogas de abuso en muestras de pelo. Diagnóstico del consumo crónico, *Trastor. Adict.* 9 (2007) 172–183. doi:10.1016/S1575-0973(07)75644-1.
- [13] X. Wang, S.S. Johansen, M.K.K. Nielsen, K. Linnet, Segmental Hair Analysis— Interpretation of the Time of Drug Intake in Two Patients Undergoing Drug Treatment, *J. Forensic Sci.* 64 (2019) 950–955. doi:10.1111/1556-4029.13947.
- [14] P. Cabarcos, I. Álvarez, M.J. Tabernero, A.M. Bermejo, Determination of direct alcohol markers: A review, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 4907–4925. doi:10.1007/s00216-015-8701-7.
- [15] M. Trius-Soler, G. Praticò, G. Gürdeniz, M. Garcia-Aloy, R. Canali, N. Fausta, E.M. Brouwer-Brolsma, C. Andrés-Lacueva, L.O. Dragsted, Biomarkers of moderate alcohol intake and alcoholic beverages: a systematic literature review, *BioMed Central*, 2023. doi:10.1186/s12263-023-00726-1.
- [16] D. Cappelle, F.Y. Lai, A. Covaci, A. Vermassen, C.L. Crunelle, H. Neels, A.L.N. van Nuijs, Assessment of ethyl sulphate in hair as a marker for alcohol consumption using liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Drug Test. Anal.* 10 (2018) 1566–1572. doi:10.1002/dta.2410.

- [17] J. Gareri, B. Appenzeller, P. Walasek, G. Koren, Impact of hair-care products on FAEE hair concentrations in substance abuse monitoring, *Anal. Bioanal. Chem.* 400 (2011) 183–188. doi:10.1007/s00216-011-4685-0.
- [18] C.L. Crunelle, M. Yegles, M. De Doncker, G. Dom, D. Cappelle, K.E. Maudens, A.L.N. van Nuijs, A. Covaci, H. Neels, Influence of repeated permanent coloring and bleaching on ethyl glucuronide concentrations in hair from alcohol-dependent patients, *Forensic Sci. Int.* 247 (2015) 18–22. doi:10.1016/j.forsciint.2014.11.023.
- [19] A. Salomone, M.R. Baumgartner, T. Lombardo, E. Alladio, D. Di Corcia, M. Vincenti, Effects of various sample pretreatment procedures on ethyl glucuronide quantification in hair samples: Comparison of positivity rates and appraisal of cut-off values, *Forensic Sci. Int.* 267 (2016) 60–65. doi:10.1016/j.forsciint.2016.08.012.
- [20] M. Thevis, H. Geyer, L. Tretzel, W. Schänzer, Sports drug testing using complementary matrices: Advantages and limitations, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 130 (2016) 220–230. doi:10.1016/j.jpba.2016.03.055.
- [21] G. Tassoni, D. Mirtella, M. Zampi, L. Ferrante, M. Cippitelli, E. Cognigni, R. Froidi, M. Cingolani, Hair analysis in order to evaluate drug abuse in driver's license regranting procedures, *Forensic Sci. Int.* 244 (2014) 16–19. doi:10.1016/j.forsciint.2014.07.025.
- [22] K. Skov, S.S. Johansen, K. Linnet, M.K.K. Nielsen, A review on the forensic toxicology of global drug-facilitated sexual assaults, *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 26 (2022) 183–197. doi:10.26355/eurrev_202201_27767.
- [23] N. Almofti, A. Ballesteros-Gómez, E. Girela, S. Rubio, Hair analysis of selected drug-facilitated sexual assault substances using green supramolecular solvent extraction and LC-MS/MS analysis, *Microchem. J.* 193 (2023) 109144. doi:10.1016/J.MICROC.2023.109144.
- [24] A. Carfora, C. Pietro Campobasso, P. Cassandro, R. Petrella, R. Borriello, Long-Term Detection in Hair of Zolpidem, Oxazepam and Flunitrazepam in a Case of Drug-Facilitated Sexual Assault, *J. Anal. Toxicol.* 46 (2022) E16–E20. doi:10.1093/jat/bkaa174.
- [25] F.P. Busardò, S. Pichini, S. Zaami, R. Pacifici, P. Kintz, Hair testing of GHB: An everlasting issue in forensic toxicology, *Clin. Chem. Lab. Med.* 56 (2018) 198–208. doi:10.1515/cclm-2017-0397.
- [26] A. Nebel, G. Mayer, C. Hess, A. Heidbreder, W. Martz, F. Veit, Levels of GHB in hair after regular application, *Forensic Sci. Int.* 325 (2021) 110885. doi:10.1016/j.forsciint.2021.110885.
- [27] J.C. Alvarez, L. Lasne, I. Etting, G. Chéron, V. Abadie, N. Fabresse, I.A. Larabi, Hair analysis does not allow to discriminate between acute and chronic administrations of a drug in young children, *Int. J. Legal Med.* 132 (2018) 165–172. doi:10.1007/s00414-017-1720-5.
- [28] E. González-Colmenero, A. Concheiro-Guisán, M. Lorenzo-Martínez, M. Concheiro, E. Lendoiro, A. de-Castro-Ríos, D. Cañizo-Vázquez, C. Martínez-Reglero, J.R. Fernández-Lorenzo, Drug testing in biological samples vs. maternal surveys for the detection of substance use during whole pregnancy, *J. Addict. Dis.* 39 (2020) 175–182. doi:10.1080/10550887.2020.1831137.
- [29] L.M. Gómez-Ruiz, E. Marchei, M.C. Rotolo, P. Brunetti, G. Mannocchi, A. Acosta-López, R.Y. Ramos-Gutiérrez, M.B. Varela-Busaka, S. Pichini, O. Garcia-Algar, Prevalence of Licit and Illicit Drugs Use during Pregnancy in Mexican Women, *Pharmaceuticals.* 15 (2022) 1–13. doi:10.3390/ph15030382.

- [30] L.J. Langman, A.M. Rushton, D. Thomas, P. Colbourne, I. Seiden-Long, M.M. Brun, D. Colantonio, P.J. Jannetto, Drug testing in support of the diagnosis of neonatal abstinence syndrome: The current situation, *Clin. Biochem.* 111 (2023) 1–10. doi:10.1016/J.CLINBIOCHEM.2022.11.002.
- [31] G.D. Albano, C. La Spina, W. Pitingaro, V. Milazzo, V. Triolo, A. Argo, G. Malta, S. Zerbo, Intrauterine and Neonatal Exposure to Opioids: Toxicological, Clinical, and Medico-Legal Issues, *Toxics.* 11 (2023). doi:10.3390/toxics11010062.
- [32] C. Condon Ellen Kennedy Patrick Mirick Dave Goodman Amoret Bunn Angela Dalton, A Global Perspective of Workplace Drug and Alcohol Testing, (2023). <https://www.ntis.gov/about>.
- [33] A. Salomone, L. Tsanaclis, R. Agius, P. Kintz, M.R. Baumgartner, European guidelines for workplace drug and alcohol testing in hair, *Drug Test. Anal.* 8 (2016) 996–1004. doi:10.1002/dta.1999.
- [34] F. Pragst, M.A. Balikova, State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse, *Clin. Chim. Acta.* 370 (2006) 17–49. doi:10.1016/j.cca.2006.02.019.
- [35] P. Kintz, Value of hair analysis in postmortem toxicology, *Forensic Sci. Int.* 142 (2004) 127–134. doi:10.1016/j.forsciint.2004.02.027.
- [36] R.D. Ash, M. He, Details of a thallium poisoning case revealed by single hair analysis using laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry, *Forensic Sci. Int.* 292 (2018) 224–231. doi:10.1016/j.forsciint.2018.10.002.
- [37] D.E. Rusyniak, A. Arroyo, J. Acciani, B. Froberg, L. Kao, B. Furbee, Heavy metal poisoning: management of intoxication and antidotes., *EXS.* 100 (2010) 365–396. doi:10.1007/978-3-7643-8338-1_11.
- [38] K.D. Watson, Poisoning Crimes and Forensic Toxicology Since the 18th Century, *Acad. Forensic Pathol.* 10 (2020) 35–46. doi:10.1177/1925362120937923.
- [39] S.B. Karch, *Drug Abuse Handbook*, First, CRC Press, San Francisco, 1998.
- [40] J.E. Davies, The pharmacological basis of therapeutics, *Occup. Environ. Med.* 64 (2007) e2–e2. doi:10.1136/oem.2007.033902.
- [41] M.D. Cole, The analysis of controlled substances, 2003. doi:10.1016/s0165-9936(03)01210-x.
- [42] United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC), Terminology and Information on Drugs, Third, New York, 2016. doi:10.18356/0f5bdc21-en.
- [43] United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC), World Drug Report, Vienna, 2023. doi:10.30875/9789287053978-05.zhtml.
- [44] EMCDDA, European Drug Report 2022, Luxembourg, 2022.
- [45] Observatorio Español de las Drogas y las Adicciones (OEDA), Informe 2023: Alcohol, Tabaco y Drogas ilegales en España., 2023.
- [46] R.A. Goldstein, C. DesLauriers, A. Burda, K. Johnson-Arbor, Cocaine: history, social implications, and toxicity: a review, *Semin. Diagn. Pathol.* 26 (2009) 10–17. doi:10.1053/J.SEMDP.2008.12.001.
- [47] M. Hastedt, R. C. Baselt (ed.): Disposition of toxic drugs and chemicals in man, 10th edition, *Forensic Sci. Med. Pathol.* 11 (2015) 147–147. doi:10.1007/s12024-014-9602-3.

- [48] A. Strzelecki, J. Weafer, W.W. Stoops, Human behavioral pharmacology of stimulant drugs: An update and narrative review, *Adv. Pharmacol.* 93 (2022) 77–103. doi:10.1016/BS.APHA.2021.07.001.
- [49] I. Lizasoain Hernández, M.Á. Moro Sánchez, P. Lorenzo Fernández, Cocaína: aspectos farmacológicos, *Adicciones*. 13 (2002) 57–64.
- [50] C. Scholz, B.B. Quednow, M. Herdener, T. Kraemer, M.R. Baumgartner, Cocaine Hydroxy Metabolites in Hair: Indicators for Cocaine Use Versus External Contamination☆, *J. Anal. Toxicol.* 43 (2019) 543–552. doi:10.1093/jat/bkz022.
- [51] A. Escohotado, *Historia general de las drogas*, 8ª Ed., Espasa Calpe, 2008.
- [52] M. Tremlett, B.J. Anderson, A. Wolf, Pro-con debate: Is codeine a drug that still has a useful role in pediatric practice?, *Paediatr. Anaesth.* 20 (2010) 183–194. doi:10.1111/j.1460-9592.2009.03234.x.
- [53] M.S. Milella, G. D’Ottavio, S. De Pirro, M. Barra, D. Caprioli, A. Badiani, Heroin and its metabolites: relevance to heroin use disorder, *Transl. Psychiatry*. 13 (2023) 1–16. doi:10.1038/s41398-023-02406-5.
- [54] G. D’Ottavio, I. Reverte, D. Ragozzino, M. Meringolo, M.S. Milella, F. Boix, M. Venniro, A. Badiani, D. Caprioli, Increased heroin intake and relapse vulnerability in intermittent relative to continuous self-administration: Sex differences in rats, *Br. J. Pharmacol.* 180 (2023) 910–926. doi:10.1111/bph.15791.
- [55] Y. Álvarez, M. Farré, *Farmacología de los opioides*, *Adicciones*. 17 (2005) 21–40.
- [56] B.M. Cox, A concise review of concepts in opioid pharmacology up to the discovery of endogenous opioids, *Mol. Pharmacol.* 98 (2020) 392–400. doi:10.1124/mol.120.119420.
- [57] A. James, J. Williams, Basic Opioid Pharmacology — An Update, *Br. J. Pain.* 14 (2020) 115–121. doi:10.1177/2049463720911986.
- [58] D. Vearrier, O. Grundmann, Clinical Pharmacology, Toxicity, and Abuse Potential of Opioids, *J. Clin. Pharmacol.* 61 (2021) S70–S88. doi:10.1002/jcph.1923.
- [59] N. Marie, C. Canestrelli, F. Noble, Role of pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters in neuroadaptations induced by drugs of abuse, with a focus on opioids and psychostimulants, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 106 (2019) 217–226. doi:10.1016/j.neubiorev.2018.06.006.
- [60] G. Jakobsson, M.T. Truver, S.A. Wrobel, H. Gréen, R. Kronstrand, Heroin-Related Compounds and Metabolic Ratios in Postmortem Samples Using LC–MS–MS, *J. Anal. Toxicol.* 45 (2021) 215–225. doi:10.1093/jat/bkaa157.
- [61] R.J. Dinis-Oliveira, Metabolism and metabolomics of opiates: A long way of forensic implications to unravel, *J. Forensic Leg. Med.* 61 (2019) 128–140. doi:10.1016/j.jflm.2018.12.005.
- [62] C.A. Gouveia, A. Oliveira, S. Pinho, C. Vasconcelos, F. Carvalho, R.F. Moreira, R.J. Dinis-Oliveira, Simultaneous quantification of morphine and cocaine in hair samples from drug addicts by GC–EI/MS, *Biomed. Chromatogr.* 26 (2012) 1041–1047. doi:10.1002/bmc.2775.
- [63] J.A. Ramos Atance, J. Fernandez Ruiz, Cannabinoides: Propiedades químicas y aspectos metabólicos, *Adicciones*. 12 (2000) 41–58.
- [64] A. Hazekamp, *Cannabis; extracting the medicine*, 2007. doi:10.1081/JLC-200028170.

- [65] G.L. Schauer, Cannabis Policy in the United States: Implications for Public Health, *J. Natl. Cancer Inst. - Monogr.* 2021 (2021) 39–52. doi:10.1093/jncimonographs/lgab016.
- [66] M. Sexton, J.M. Garcia, A. Jatoi, C.S. Clark, M.S. Wallace, The Management of Cancer Symptoms and Treatment-Induced Side Effects with Cannabis or Cannabinoids, *J. Natl. Cancer Inst. - Monogr.* 2021 (2021) 86–98. doi:10.1093/jncimonographs/lgab011.
- [67] D. Manns, J. Norwig, K. Reh, Cannabis for medicinal use: development of pharmacopoeia monographs as a quality standard, *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforsch. - Gesundheitsschutz.* 62 (2019) 806–810. doi:10.1007/s00103-019-02963-5.
- [68] R. Valani, Pharmacology of Cannabis, in: *Cannabis Use Med.*, Springer, Cham, 2022: pp. 23–35. doi:https://doi.org/10.1007/978-3-031-12722-9_3.
- [69] I. Koturbash, D. MacKay, Cannabidiol and Other Cannabinoids: From Toxicology and Pharmacology to the Development of a Regulatory Pathway, *J. Diet. Suppl.* 17 (2020) 487–492. doi:10.1080/19390211.2020.1796886.
- [70] H.S. Cho, B. Cho, J. Sim, S.K. Baeck, S. In, E. Kim, Detection of 11-nor-9-carboxy-tetrahydrocannabinol in the hair of drug abusers by LC–MS/MS analysis, *Forensic Sci. Int.* 295 (2019) 219–225. doi:10.1016/j.forsciint.2018.12.013.
- [71] K. Cerne, Toxicological properties of Δ^9 -tetrahydrocannabinol and cannabidiol, *Arh. Hig. Rada Toksikol.* 71 (2020) 1–11. doi:10.2478/aiht-2020-71-3301.
- [72] P. Romero, A. Peris, K. Vergara, J.T. Matus, Comprehending and improving cannabis specialized metabolism in the systems biology era, *Plant Sci.* 298 (2020) 110571. doi:10.1016/j.plantsci.2020.110571.
- [73] E. Perucca, M. Bialer, Critical Aspects Affecting Cannabidiol Oral Bioavailability and Metabolic Elimination, and Related Clinical Implications, *CNS Drugs.* 34 (2020) 795–800. doi:10.1007/s40263-020-00741-5.
- [74] Society of Hair Testing, Recommendations for Hair Testing in Forensic Cases Society of Hair Testing Criteria for mass spectrometric analysis, *Forensic Sci. Int.* 145 (2004) 83–4. http://www.soht.org/pdf/Consensus_on_Hair_Analysis.pdf.
- [75] P. Kintz, Issues About Axial Diffusion During Segmental Hair Analysis, (2013) 2012–2014. <https://insights.ovid.com/pubmed?pmid=23666571>.
- [76] K.N. Günther, J. Banner, K. Linnet, S.S. Johansen, Segmental hair analysis of olanzapine and N-desmethyl-olanzapine in postmortem hair from mentally ill patients by LC–MS/MS, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 190 (2020). doi:10.1016/j.jpba.2020.113510.
- [77] T. Baciú, F. Borrull, C. Aguilar, M. Calull, Findings in the hair of drug abusers using pressurized liquid extraction and solid-phase extraction coupled in-line with capillary electrophoresis, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 131 (2016) 420–428. doi:10.1016/j.jpba.2016.09.017.
- [78] M.C. Rotolo, R. Pacifici, M. Pellegrini, S. Cardullo, L.J.G. Pérez, D. Cuppone, L. Gallimberti, G. Madeo, Hair testing for classic drugs of abuse to monitor cocaine use disorder in patients following transcranial magnetic stimulation protocol treatment, *Biology (Basel).* 10 (2021) 1–9. doi:10.3390/biology10050403.
- [79] E. Han, H. Chung, J.M. Song, Segmental hair analysis for 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid and the patterns of cannabis use., *J. Anal. Toxicol.* 36 (2012) 195–200. doi:10.1093/jat/bks010.

- [80] K. Kuwayama, H. Miyaguchi, T. Kanamori, K. Tsujikawa, T. Yamamuro, H. Segawa, Y. Okada, Y.T. Iwata, Development of the “selective concentration” analytical method for drug-containing hair regions based on micro-segmental analysis to identify a trace amount of drug in hair: hair analysis following single-dose ingestion of midazolam, *Forensic Toxicol.* 39 (2021) 156–166. doi:10.1007/s11419-020-00553-8.
- [81] K. Kuwayama, M. Nariai, H. Miyaguchi, Y.T. Iwata, T. Kanamori, K. Tsujikawa, T. Yamamuro, H. Segawa, H. Abe, H. Iwase, H. Inoue, Micro-segmental hair analysis for proving drug-facilitated crimes: Evidence that a victim ingested a sleeping aid, diphenhydramine, on a specific day, *Forensic Sci. Int.* 288 (2018) 23–28. doi:10.1016/j.forsciint.2018.04.027.
- [82] R. Wennig, Potential problems with the interpretation of hair analysis results, *Forensic Sci Int.* 107 (2000) 5–12. doi:10.1016/S0379-0738(99)00146-2.
- [83] D. Mantiniaks, D. Gerostamoulos, P. Wright, O. Drummer, The effectiveness of decontamination procedures used in forensic hair analysis, *Forensic Sci. Med. Pathol.* 14 (2018) 349–357. doi:10.1007/s12024-018-9994-6.
- [84] P.R. Stout, J.D. Roper-Miller, M.R. Baylor, J.M. Mitchell, External contamination of hair with cocaine: evaluation of external cocaine contamination and development of performance-testing materials., *J. Anal. Toxicol.* 30 (2006) 490–500.
- [85] L. Tsanaclis, M. Andraus, J. Wicks, Hair analysis when external contamination is in question: A review of practical approach for the interpretation of results, *Forensic Sci. Int.* 285 (2018) 105–110. doi:10.1016/j.forsciint.2018.01.028.
- [86] R. Erne, L. Bernard, A.E. Steuer, M.R. Baumgartner, T. Kraemer, Hair Analysis: Contamination versus incorporation from the circulatory system-investigations on single hair samples using time-of-flight secondary ion mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, *Anal. Chem.* 91 (2019) 4132–4139. doi:10.1021/acs.analchem.8b05866.
- [87] F.T. Peters, O.H. Drummer, F. Musshoff, Validation of new methods, *Forensic Sci. Int.* 165 (2007) 216–224. doi:10.1016/j.forsciint.2006.05.021.
- [88] P. Kintz, Hair Analysis in Forensic Toxicology: An Updated Review with a Special Focus on Pitfalls, *Curr. Pharm. Des.* 23 (2017) 5480–5486. doi:10.2174/1381612823666170929155628.
- [89] T. Baciu, F. Borrull, C. Aguilar, M. Calull, Recent trends in analytical methods and separation techniques for drugs of abuse in hair, *Anal. Chim. Acta.* 856 (2015) 1–26. doi:10.1016/j.aca.2014.06.051.
- [90] C. Ferreira, C. Paulino, A. Quintas, Extraction Procedures for Hair Forensic Toxicological Analysis: A Mini-Review, *Chem. Res. Toxicol.* 32 (2019) 2367–2381. doi:10.1021/acs.chemrestox.9b00301.
- [91] S. Fu, A Review of Methodology for Testing Hair for Cocaine, *J. Forensic Investig.* 2 (2014). doi:10.13188/2330-0396.1000007.
- [92] F. Musshoff, B. Madea, Analytical pitfalls in hair testing, *Anal. Bioanal. Chem.* 388 (2007) 1475–1494. doi:10.1007/s00216-007-1288-x.
- [93] S. Gentili, M. Cornetta, T. Macchia, Rapid screening procedure based on headspace solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry for the detection of many recreational drugs in hair, *J. Chromatogr. B.* 801 (2004) 289–296. doi:10.1016/j.jchromb.2003.11.034.

- [94] M.A.O. Madia, L.O. de Oliveira, N.S. Baccule, J.Y. Sakurada, D.T.P. Scanferla, R.G. Aguera, P.P. Moreira, É. Bando, M.M. Junior, C. Marchioni, S.A.G. Mossini, Amphetamine, methamphetamine, and MDMA in hair samples from a rehabilitation facility: Validation and applicability of HF-LPME-GC-MS, *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 119 (2023). doi:10.1016/j.vascn.2022.107212.
- [95] F. Vincenti, C. Montesano, L. Cellucci, A. Gregori, F. Fanti, D. Compagnone, R. Curini, M. Sergi, Combination of pressurized liquid extraction with dispersive liquid liquid micro extraction for the determination of sixty drugs of abuse in hair, *J. Chromatogr. A.* 1605 (2019) 360348. doi:10.1016/j.chroma.2019.07.002.
- [96] M. Míguez-Framil, A. Moreda-Piñeiro, P. Bermejo-Barrera, P. López, M.J. Tabernero, A.M. Bermejo, Improvements on enzymatic hydrolysis of human hair for illicit drug determination by gas chromatography/mass spectrometry, *Anal. Chem.* 79 (2007) 8564–8570. doi:10.1021/ac071337n.
- [97] S. Dulaurent, J.M. Gaulier, L. Imbert, A. Morla, G. Lachâtre, Simultaneous determination of δ 9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol, cannabinol and 11-nor- δ 9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in hair using liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Forensic Sci. Int.* 236 (2014) 151–156. doi:10.1016/j.forsciint.2014.01.004.
- [98] B. Moosmann, N. Roth, M. Hastedt, A. Jacobsen-Bauer, F. Pragst, V. Auwärter, Cannabinoid findings in children hair - what do they really tell us? An assessment in the light of three different analytical methods with focus on interpretation of δ 9-tetrahydrocannabinolic acid A concentrations, *Drug Test. Anal.* 7 (2015) 349–357. doi:10.1002/dta.1692.
- [99] O. López-Guarnido, I. Álvarez, F. Gil, L. Rodrigo, H.C. Cataño, A.M. Bermejo, M.J. Tabernero, A. Pla, A.F. Hernández, Hair testing for cocaine and metabolites by GC/MS: Criteria to quantitatively assess cocaine use, *J. Appl. Toxicol.* 33 (2013) 838–844. doi:10.1002/jat.2741.
- [100] T. Kieliba, O. Lerch, H. Andresen-Streichert, M.A. Rothschild, J. Beike, Simultaneous quantification of THC-COOH, OH-THC, and further cannabinoids in human hair by gas chromatography–tandem mass spectrometry with electron ionization applying automated sample preparation, *Drug Test. Anal.* 11 (2019) 267–278. doi:10.1002/dta.2490.
- [101] L. Nahar, M. Guo, S.D. Sarker, Gas chromatographic analysis of naturally occurring cannabinoids: A review of literature published during the past decade, *Phytochem. Anal.* 31 (2020) 135–146. doi:10.1002/pca.2886.
- [102] V. Auwärter, A. Wohlfarth, J. Traber, D. Thieme, W. Weinmann, Hair analysis for δ 9-tetrahydrocannabinolic acid A-New insights into the mechanism of drug incorporation of cannabinoids into hair, *Forensic Sci. Int.* 196 (2010) 10–13. doi:10.1016/j.forsciint.2009.12.023.
- [103] M.A. Ghauri, F. Hassan, Y. Hassan, N. Atif, A. Adnan, Detection of 6-monoacetylmorphine in hair sample of heroin addicts using gas chromatography–mass spectrometry and significance of rehabilitation program, *Futur. J. Pharm. Sci.* 7 (2021). doi:10.1186/s43094-021-00245-z.
- [104] M. Usman, A. Naseer, Y. Baig, T. Jamshaid, M. Shahwar, S. Khurshid, Forensic toxicological analysis of hair: a review, *Egypt. J. Forensic Sci.* 9 (2019). doi:10.1186/s41935-019-0119-5.

- [105] M.J. Seo, S.H. Song, S. Kim, W.J. Jang, C.H. Jeong, S. Lee, Characteristics of Korean patients with methamphetamine use disorder based on the quantitative analysis of methamphetamine and amphetamine in hair, *Arch. Pharm. Res.* 43 (2020) 798–807. doi:10.1007/s12272-020-01259-6.
- [106] T.J. Raharjo, R. Verpoorte, Methods for the analysis of cannabinoids in biological materials: a review., *Phytochem Anal.* 15 (2004) 79–94. doi:10.1002/pca.753.
- [107] M.M. Madry, A.E. Steuer, C.M. Hysek, M.E. Liechti, M.R. Baumgartner, T. Kraemer, Evaluation of drug incorporation into hair segments and nails by enantiomeric analysis following controlled single MDMA intakes, *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (2016) 545–556. doi:10.1007/s00216-015-9130-3.
- [108] A. Orfanidis, O. Mastrogianni, A. Koukou, G. Psarros, H. Gika, G. Theodoridis, N. Raikos, A GC–MS method for the detection and quantitation of ten major drugs of abuse in human hair samples, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1047 (2017) 141–150. doi:10.1016/j.jchromb.2016.11.011.
- [109] A.M.F. Pego, F.L. Roveri, R.Y. Kuninari, V. Leyton, I.D. Miziara, M. Yonamine, Determination of cocaine and its derivatives in hair samples by liquid phase microextraction (LPME) and gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS), *Forensic Sci. Int.* 274 (2017) 83–90. doi:10.1016/j.forsciint.2016.12.024.
- [110] N. Arbouche, M.O. Batt, J.S. Raul, P. Kintz, Development of a new GC–MS/MS method for the determination of metformin in human hair, *Drug Test. Anal.* 12 (2020) 1380–1386. doi:10.1002/dta.2866.
- [111] N. La Maida, G. Mannocchi, R. Giorgetti, A. Sirignano, G. Ricci, F.P. Busardò, Optimization of a rapid sample pretreatment for the quantification of COC and its main metabolites in hair through a new and validated GC-MS/MS method, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 204 (2021). doi:10.1016/j.jpba.2021.114282.
- [112] Y. Hongkun, L. Jinlei, D. Lina, W. Yue, W. Junmei, A. Wurita, Detection and quantification of psychotropic drug etaqualone in human hair using GC–MS/MS, *Leg. Med.* 53 (2021) 101964. doi:10.1016/j.legalmed.2021.101964.
- [113] I.H.A. Franken, Drug craving and addiction: Integrating psychological and neuropsychopharmacological approaches, *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry.* 27 (2003) 563–579. doi:10.1016/S0278-5846(03)00081-2.
- [114] S.T. Tiffany, J.M. Wray, The clinical significance of drug craving, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1248 (2012) 1–17. doi:10.1111/j.1749-6632.2011.06298.x.
- [115] C.K. Scott, M.L. Dennis, A. Laudet, R.R. Funk, R.S. Simeone, Surviving drug addiction: the effect of treatment and abstinence on mortality., *Am. J. Public Health.* 101 (2011) 737–744. doi:10.2105/AJPH.2010.197038.
- [116] R. Salo, T.E. Nordahl, G.P. Galloway, C.D. Moore, C. Waters, M.H. Leamon, Drug abstinence and cognitive control in methamphetamine-dependent individuals, *J. Subst. Abuse Treat.* 37 (2009) 292–297. doi:10.1016/j.jsat.2009.03.004.
- [117] I. Fredriksson, M. Venniro, D.J. Reiner, J.J. Chow, J.M. Bossert, Y. Shaham, Animal models of drug relapse and craving after voluntary abstinence: a review, *Pharmacol. Rev.* 73 (2021) 1050–1083. doi:10.1124/pharmrev.120.000191.
- [118] U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA), Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, 2018. <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm070107.Pdf>.

- [119] M.J. Valente, F. Carvalho, M.L. Bastos, M. Carvalho, P.G. de Pinho, Development and validation of a gas chromatography/ion trap-mass spectrometry method for simultaneous quantification of cocaine and its metabolites benzoylecgonine and norcocaine: Application to the study of cocaine metabolism in human primary cultured re, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 878 (2010) 3083–3088. doi:10.1016/j.jchromb.2010.09.010.
- [120] SWGTOX, Scientific working group for forensic toxicology (SWGTOX) standard practices for method validation in forensic toxicology, *J. Anal. Toxicol.* 37 (2013) 452–474. doi:10.1093/jat/bkt054.
- [121] AAFS Standards Board, Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology, 2019. <https://www.aafs.org/asb-standard/standard-practices-method-validation-forensic-toxicology>.
- [122] L. Afonso, T. Mohammad, D. Thatai, Crack Whips the Heart: A Review of the Cardiovascular Toxicity of Cocaine, *Am. J. Cardiol.* 100 (2007) 1040–1043. doi:10.1016/j.amjcard.2007.04.049.
- [123] D.T.P. Scanferla, Highly selective HF-LPME-GC-MS for cocaine and biotransformation products in humna hair to monitor drug addicts, *Quim. Nova.* 44 (2021) 921–928.
- [124] E. Cuypers, R.J. Flanagan, The interpretation of hair analysis for drugs and drug metabolites, *Clin. Toxicol.* 56 (2018) 90–100. doi:10.1080/15563650.2017.1379603.
- [125] G. Tassoni, M. Cippitelli, G. Mietti, A. Cerioni, E. Buratti, E. Bury, M. Cingolani, Hair analysis to evaluate polydrug use, *Healthc.* 9 (2021). doi:10.3390/healthcare9080972.
- [126] V. Boumba, K. Ziavrou, T. Vougiouklakis, Hair as a biological indicator of drug use, drug abuse or chronic exposure to environmental toxicants, *Int. J. Toxicol.* 25 (2006) 143–163. doi:10.1080/10915810600683028.
- [127] M. Minoli, S. Casati, I. Angeli, A. Ravelli, P. Rota, P. Allevi, M. Orioli, Analysis of hydroxycocaine metabolites as evidence of cocaine consumption: Identification by parent ion search and quantitation by UHPLC-MS/MS in hair, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 172 (2019) 167–174. doi:10.1016/j.jpba.2019.04.028.
- [128] R. Gottardo, A. Fanigliulo, D. Sorio, E. Liotta, F. Bortolotti, F. Tagliaro, Monitoring compliance to therapy during addiction treatments by means of hair analysis for drugs and drug metabolites using capillary zone electrophoresis coupled to time-of-flight mass spectrometry, *Forensic Sci. Int.* 216 (2012) 101–107. doi:10.1016/j.forsciint.2011.09.004.
- [129] F. Musshoff, F. Driever, K. Lachenmeier, D.W. Lachenmeier, M. Banger, B. Madea, Results of hair analyses for drugs of abuse and comparison with self-reports and urine tests, *Forensic Sci. Int.* 156 (2006) 118–123. doi:10.1016/j.forsciint.2004.07.024.
- [130] C. Vignali, C. Stramesi, M. Vecchio, A. Groppi, Hair testing and self-report of cocaine use, *Forensic Sci. Int.* 215 (2012) 77–80. doi:10.1016/j.forsciint.2011.05.007.
- [131] M. Wada, K. Nakashima, Hair analysis: an excellent tool for confirmation of drug abuse, *Anal. Bioanal. Chem.* 385 (2006) 413–415. doi:10.1007/s00216-006-0332-6.
- [132] M. Felli, S. Martello, R. Marsili, M. Chiarotti, Disappearance of cocaine from human hair after abstinence, *Forensic Sci. Int.* 154 (2005) 96–98. doi:10.1016/j.forsciint.2004.09.113.
- [133] F. Garcia-Bournissen, M. Moller, M. Nesterenko, T. Karaskov, G. Koren, Pharmacokinetics of disappearance of cocaine from hair after discontinuation of drug use, *Forensic Sci. Int.* 189 (2009) 24–27. doi:10.1016/J.FORSCIINT.2009.04.004.

- [134] H. Druid, J.J. Strandberg, K. Alkass, I. Nyström, F.C. Kugelberg, R. Kronstrand, Evaluation of the role of abstinence in heroin overdose deaths using segmental hair analysis, *Forensic Sci. Int.* 168 (2007) 223–226. doi:10.1016/j.forsciint.2006.02.047.
- [135] X. Wang, J. Cui, Y. Zhuo, B. Shen, S. Zhang, W. Liu, M. Shen, P. Xiang, A retrospective of prevalence of drugs of abuse by hair analysis in Shanghai using LC–MS–MS, *J. Anal. Toxicol.* 44 (2020) 482–489. doi:10.1093/JAT/BKAA007.
- [136] M. Shen, P. Xiang, Y. Sun, B. Shen, Disappearance of 6-acetylmorphine, morphine and codeine from human scalp hair after discontinuation of opiate abuse, *Forensic Sci. Int.* 227 (2013) 64–68. doi:10.1016/j.forsciint.2012.10.028.
- [137] M.S. Odell, M.Y. Frei, D. Gerostamoulos, M. Chu, D.I. Lubman, Residual cannabis levels in blood, urine and oral fluid following heavy cannabis use, *Forensic Sci. Int.* 249 (2015) 173–180. doi:10.1016/j.forsciint.2015.01.026.
- [138] S. Heintl, O. Lerch, F. Erdmann, Automated GC-MS determination of Δ^9 -tetrahydrocannabinol, cannabinol and cannabidiol in hair, *J. Anal. Toxicol.* 40 (2016) 498–503. doi:10.1093/jat/bkw047.
- [139] Y. Nakahara, K. Takahashi, Y. Takeda, K. Konuma, S. Fukui, T. Tokui, Hair analysis for drug abuse, part II. Hair analysis for monitoring of methamphetamine abuse by isotope dilution gas chromatography/mass spectrometry, *Forensic Sci. Int.* 46 (1990) 243–254. doi:10.1016/0379-0738(90)90310-U.
- [140] N. Suwannachom, T. Thananchai, A. Junkuy, T.E. O’Brien, P. Sribanditmongkol, Duration of detection of methamphetamine in hair after abstinence, *Forensic Sci. Int.* 254 (2015) 80–86. doi:10.1016/j.forsciint.2015.06.030.
- [141] T. Wang, B. Shen, H. Wu, J. Hu, H. Xu, M. Shen, P. Xiang, Disappearance of R/S-methamphetamine and R/S-amphetamine from human scalp hair after discontinuation of methamphetamine abuse, *Forensic Sci. Int.* 284 (2018) 153–160. doi:10.1016/j.forsciint.2018.01.011.
- [142] P. Kintz, A. Ameline, J.-S. Raul, Disappearance of Tramadol and THC-COOH in Hair After Discontinuation of Abuse. Two Different Profiles, *J. Anal. Toxicol.* (2019) 4–7. doi:10.1093/jat/bkz004.
- [143] I.A. Larabi, I. Etting, J.C. Alvarez, The duration of ketamine detection in hair after treatment cessation: Case study and review of the literature in forensic and clinical casework, *Drug Test. Anal.* 15 (2023) 971–979. doi:10.1002/dta.3444.

ANEXOS

Anexo I: Informe favorable do Comité de Ética de Santiago-Lugo

Anexo II: Publicacións derivadas da Tese

Anexo III: Permiso da revista para incluír as publicacións

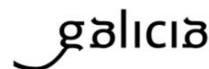
Anexo IV: Permiso para incluír figuras

ANEXO I: Informe favorable do Comité de Ética da Investigación de Santiago-Lugo



XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DE SANIDADE
Secretaría Xeral Técnica

Secretaría Técnica
Comité Autonómico de Ética da Investigación de Galicia
Secretaría Xeral, Consellería de Sanidade
Edificio Administrativo San Lázaro
15703 SANTIAGO DE COMPOSTELA
Tel: 881 546425; ceic@sergas.es



DITAME DO COMITÉ DE ÉTICA DA INVESTIGACIÓN DE SANTIAGO-LUGO

Juan Manuel Vázquez Lago, Secretario do Comité de Ética da Investigación de Santiago-Lugo

CERTIFICA:

Que este Comité avaliou na súa reunión do día 19/01/2017 o estudo:

Título: Estudo para determinar tempo de aclaramento de drogas en mostras capilares de pacientes ingresados en CT"

Promotor: M.^a Jesús Tabernero Duque

Tipo de estudo: Outros

Código de Rexistro: 2016/547

E, tomando en consideración as seguintes cuestións:

- A pertinencia do estudo, tendo en conta o coñecemento dispoñible, así como os requisitos legais aplicables, e en particular a Lei 14/2007, de investigación biomédica, o Real Decreto 1716/2011, de 18 de novembro, polo que se establecen os requisitos básicos de autorización e funcionamento dos biobancos con fins de investigación biomédica e do tratamento das mostras biolóxicas de orixe humana, e se regula o funcionamento e organización do Rexistro Nacional de Biobancos para investigación biomédica, a ORDE SAS/3470/2009, de 16 de decembro, pola que se publican as Directrices sobre estudos Posautorización de Tipo Observacional para medicamentos de uso humano, e o RD 1090/2015, de 4 de decembro, polo que se regulan os ensaios clínicos con medicamentos, os Comités de Ética da Investigación con medicamentos e Rexistro Español de Estudos Clínicos
- A idoneidade do protocolo en relación cos obxectivos do estudo, xustificación dos riscos e molestias previsibles para o suxeito, así como os beneficios esperados.
- Os principios éticos da Declaración de Helsinki vixente.
- Os Procedementos Normalizados de Traballo do Comité.

Emite un **INFORME FAVORABLE** para a realización do estudo polo/a investigador/a do centro:

Centros	Investigadores Principais
Instituto de Medicinas Forenses - USC	Iván Álvarez Freire, Ana Suárez García

En Santiago de Compostela, a 19 de xaneiro de 2017

O secretario

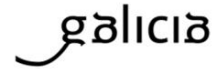


Juan M. Vázquez Lago



XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DE SANIDADE
Secretaría Xeral Técnica

Secretaría Técnica
Comité Autonómico de Ética da Investigación de Galicia
Secretaría Xeral, Consellería de Sanidade
Edificio Administrativo San Lázaro
15703 SANTIAGO DE COMPOSTELA
Tel: 881 546425; ceic@sergas.es



Juan M. Vázquez Lago, Secretario do Comité Territorial de Ética da Investigación de Santiago-Lugo,

FAI CONSTAR QUE:

1. O Comité Territorial de Ética da Investigación de Santiago-Lugo cumpre tanto na súa composición coma nos seus PNTs os requisitos legais vixentes (R.D 1090/2015 de ensaios clínicos, e a Lei 14/2007 de Investigación Biomédica).
2. A composición actual do Comité Territorial de Ética da Investigación de Santiago-Lugo é:

Pilar Rodríguez Ledo (Vicepresidenta). Médico especialista en Medicina Familiar e Comunitaria. Área de Xestión Integrada de Lugo.

Juan M. Vázquez Lago (Secretario). Médico especialista en Medicina Preventiva e Saúde Pública. Área de Xestión Integrada de Santiago.

Lorenzo Armenteros del Olmo. Médico especialista en Medicina Familiar e Comunitaria. Área de Xestión Integrada de Lugo.

Francisco Campos Pérez. Investigador. Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela.

Rosana Castelo Domínguez. Farmacéutica Atención Primaria. Área de Xestión Integrada de Santiago.

Daniel De La Iglesia García. Médico especialista en Dixestivo. Área de Xestión Integrada de Santiago.

Ricardo García Martínez. Licenciado en Dereito. Área de Xestión Integrada de Lugo.

Victor Herrán Carreira. Paciente, ADIL-Asociación de Diabéticos Lucense.

María Jesús Lamas Díaz. Farmacéutica especialista en Farmacia Hospitalaria. Área de Xestión Integrada de Santiago.

María Isabel Loza García. Licenciada en Farmacia. Universidade de Santiago de Compostela.

Guillermo José Prada Ramallal. Médico especialista en Farmacoloxía clínica. Área de Xestión Integrada de Santiago. Fundación "Ramón Domínguez". Santiago

Carlos Rodríguez Moreno. Médico especialista en Farmacoloxía clínica. Área de Xestión Integrada de Santiago.

María Jesús Wandosell Picatoste. Diplomada en Enfermería. Área de Xestión Integrada de Santiago.

Para que conste onde proceda, e a petición do promotor / investigador, en Santiago de Compostela, a 19 de xaneiro de 2017.

O Secretario do Comité Territorial de Ética da Investigación de Santiago Lugo,



ANEXO II: Publicacións derivadas da Tese

Artigo 1

Duration of detection of cocaine and metabolites in hair after discontinuation of abuse

Microchemical Journal, 153, 104335 (2020).

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104335>

Contribución específica na publicación:

Conceptualización, metodoloxía e investigación: formulación e desenvolvemento da parte experimental, validación e análise de resultados. Redacción do manuscrito orixinal.

Índices de calidade:

A revista onde foi publicado o artigo presenta un índice de impacto de 4.8, e está nas seguintes posicións nas seguintes categorías: cuartil 1 (Q1), 16/87 (Química Analítica), percentil 82.18



Duration of detection of cocaine and metabolites in hair after discontinuation of abuse



A. Suárez-García, I. Álvarez-Freire, A.M. Bermejo-Barrera, P. Cabarcos-Fernández, M.J. Tabernero-Duque*

Institute of Forensic Science, Forensic Toxicology Service, Faculty of Medicine, University of Santiago de Compostela, C/San Francisco s/n, 15782 Santiago de Compostela, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Cocaine
Cocaine metabolites
Hair analysis
Abstinence
Drug rehabilitation

ABSTRACT

Researchers in hair analysis have known that abuse drugs test positive in results during a period of time, after subjects had declared the end of use. The objective of this study was to test hair samples from chronic cocaine addicts who had recently given up consuming. The study population ($n = 15$) is made up of patients in a drug rehabilitation program in Santiago de Compostela, Spain. Subjects provided hair samples at 2 months intervals after cocaine discontinuation for 6 months, with the first sample being collected on the admission day of the program. Cocaine and its metabolites benzoylecgonine (BZE) and cocaethylene (CE) were tested by GC/MS with a LOQ at 0.2 ng/mg for cocaine and BZE, and LOQ at 0.05 ng/mg for CE. The hair strands were cut into 1 cm segments and tested for the respective analyte. The older segment was considered as 100% of the response. After cessation of drug consumption, the presence of cocaine and its metabolites in new growing hair segments continued for a certain period. Negative results were obtained 6 months after discontinuation of cocaine abuse.

1. Introduction

Cocaine is a highly addictive drug with potent central nervous system stimulant properties. Its abuse is a serious problem worldwide with multiple consequences and is the cause of public health issues. According to the latest data, it is estimated that there are currently approximately 18.2 million cocaine users around the world [1]. Cocaine is rapidly metabolized to benzoylecgonine (BZE) by spontaneous hydrolysis. Moreover, this drug is frequently taken with ethanol and the resulting product is cocaethylene (CE), formed through transesterification following concomitant intake of cocaine and alcohol [2]. The cardiovascular complications associated with cocaine use are well known [3]. Furthermore, it is also associated with a variety of complications including psychiatric, neurological, renal, pulmonary, gastrointestinal, and obstetrical problems [4].

This situation demonstrates the need to investigate and develop new analysis methodologies, including the use of alternative matrices. Hair analysis has shown its importance in retrospective investigations on the chronic consumption of substances due to its wide window of detection. This is explained because drugs found in blood are spread and incorporated into the hair matrix. The hair has a constant growth of approximately 1 cm/month and the drugs and their metabolites once

incorporated into their matrix can remain unchanged for a long time without undergoing metabolism or degradation. The collection of hair is not invasive, and prevents adulteration, since it can be performed under direct supervision. In addition, hair samples can be stored for a long time at room temperature, without the need for special conditions of preservation or transport [5].

The most important limitation of hair analysis is still external contamination for drugs groups that are usually smoked or snorted. Consequently, removing any possible externally deposited drug is an important part of the analysis. Several wash protocols have been proposed [6,7]. Different studies have evaluated these wash protocols and wash efficacy was acceptable, demonstrating how rarely external contamination affects significantly the interpretation of the results [8].

At this moment, cocaine and its main metabolite BZE are the main targets of the prevailing hair analysis, for the purpose of proving cocaine consumption [9]. Some studies have started to focus attention on another metabolites as norcocaine or hydroxylated cocaine, nevertheless further studies will be necessary to clarify the correlation between hydroxyl metabolites and their precursor in hair [10].

There are several mechanisms for drug incorporation into hair: drugs secreted into sweat or sebum that permeates the hair, the diffusion of drugs from blood supplying the growing follicle, drugs in the

* Corresponding author.

E-mail address: mj.tabernero@usc.es (M.J. Tabernero-Duque).

<https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104335>

Received 17 July 2019; Received in revised form 10 October 2019; Accepted 11 October 2019

Available online 25 October 2019

0026-265X/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

environment that deposit onto the hair fibre. In despite of this, it is poorly understood how drugs adhere to hair fibre. To supply this lack of knowledge, researches have focused on drug properties associated with drug concentrations in hair [11].

Hair grows in a cycle formed of anagen, catagen and telogen stages. Anagen is the active growth phase of the hair cycle and usually lasts from 2 to 6 years. Approximately 85% of adult scalp is in the anagen phase. Inversely, telogen is a reposing stage where the hair follicle stops growing and stays inactive until it falls out and a new hair begins to grow again. Catagen is a transitional phase and is recognized as inappreciable because it lasts less than 3 weeks. The percentage of hair in the telogen stage is around 15%. Consequently, succeeding to drug exposure, a substance will unlikely be found in the same place in every hair, because the section where is found the drug will get away from the scalp in the telogen phase [12]. It has been demonstrated that cocaine and its metabolites could be detected in higher concentrations than expected in older drug users for several months after abstinence. This theoretical event could be consequence of follicular growth patterns previously mentioned.

In our sampling technique, "new growth" hair was collected every two months. Nevertheless, this method is not completely precise. Most locks of hair include strands of old hair that is in a telogenic or stationary phase. Hair in telogen phase, which represents 10–15% of a typical strand, can stay up to 6 months [12]. Hair in the telogen phase probably maintains a record of the previous drug consumption. This could be the reason that explains why in the new hair of subjects who have stopped consuming, a positive analytical result is still obtained. Another probable reason that explains these positive results may be that deposits on the scalp act as reservoirs of substances and continue to eliminate drugs and their metabolites in the hair for a time after giving up the consumption [13,14].

As previously mentioned, hair analysis has several advantages. Thus, it is a useful technique that allows answering several clinical as well as forensic issues, such as the detection of drug abuse [15], gestational exposure to drugs, following drug abstinence [8,9], suspension of driving licenses or the research of causes of death [16].

The objective of this study is to assess the time of disappearance of cocaine, BZE and CE in hair. The developed method was applied to hair samples of cocaine abusers that were following a drug rehabilitation program on the basis of segmental analysis, in order to determine the compliance to the therapy.

2. Material and methods

2.1. Reagents and reference standards

Solutions of cocaine, cocaine- d_3 , BZE, BZE- d_3 , CE and CE- d_3 in methanol (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were purchased from Cerilliant® (Round Rock, TX, U.S.). Chlorotrimethylsilane (TMCS) and N-methyl-tert-butylsilyl-trifluoroacetamide (BSTFA), Pronase E, 1, 4-dithiothreitol (DTT), acetic acid, gradient-grade methanol and ammonium hydroxide were supplied by Merck® (Darmstadt, Germany). TRIS-hydroxymethyl-aminomethane (TRIS) was from Sigma-Aldrich® (Stemheim, Switzerland). Purified water was obtained from a Milli-Q water system from Millipore® (Le Mont-sur-Lausanne, Switzerland).

2.2. Instrumentation

An HP 6890 GC from Hewlett-Packard® (Little Falls, DF, USA) was used, equipped with an HP 7683B autoinjector from Agilent® (Las Rozas, Spain) and connected to an HP 5973 inert mass selective detector from Agilent®. Chromatographic separation was achieved with an HP-5MS capillary column (crosslinked 5% phenylmethylsiloxane, 30 m \times 250 μm i.d., 0.5 μm film thickness). It was used using the

splitless injection mode (2 min) and an injection volume of 2 μL . The injection port was heated at 240 °C, while the temperature of the ion source was set at 300 °C. The initial temperature of the column was 90 °C for 1 min, and then ramped progressively at 30 °C/min up to 235 °C, held for 10 min and then ramped again at 15 °C up to 260 °C and held for 5 min. After that, the temperature was increased to 300 °C for 5 min to clean the column. The mass selective detector was kept at 320 °C, the ion source at 250 °C and the quadrupole at 100 °C. The mass analyzer operated by electron ionization (70 eV) in selected ion monitoring (SIM) acquisition mode. For each analyte the following ions were used: m/z 182, 303, 198 (cocaine); m/z 185, 306, 201 (cocaine- d_3); m/z 240, 82 (BZE); m/z 243, 85 (BZE- d_3); m/z 196, 317, 272 (CE); m/z 199, 320 (CE- d_3). The underlined ions were used for quantification.

2.3. Hair samples

The hair samples for the present study were obtained from a group of subjects ($n = 15$) in a drug rehabilitation program who gave a preliminary informed consent to the enrollment into the study (informed consent was obtained from the participants according to the protocol previously approved by the *Clinical Research Ethics Committee of Galicia, Spain*). The subjects included were competent and accepted to participate in the study voluntarily by supplying the required hair samples. All of them demonstrated that they adequately followed the detoxification treatment and compliance within the treatment protocol was controlled by periodic urine tests. The hair was collected every 2 months during 6 months from when the patients started the program. Samples were collected in the following way: On the same day the enrolment into the rehabilitation program, the first hair segment was taken (sample 0). This sample corresponds to the drug use before abstinence from the patient. Subsequently, during the following six months the sample was collected at two month intervals (second, fourth, and sixth month). From these samples, it was analysed 1 cm proximal (the most recent from segment). Samples were collected from the vertex posterior area as close as possible to the scalp and submitted to an initial procedure of decontamination by washing in 5 mL of a 0.1% solution of neutral soap (Tween 20) rinsing with distilled water to eliminate any external contamination. After drying at 40 °C the hair was cut into 1-mm segments. Then, 50 mg aliquots were weighted.

2.4. Sample preparation

Quantitative hair analysis for cocaine, BZE and CE followed a previously published validated protocol involving solid-phase extraction (SPE) with GC/MS [17]. For SPE polymeric reversed phase cartridges Strata-X 33 μm (60 mg; Phenomenex®, UK) were used. The eluate was evaporated under a stream of nitrogen at 40 °C in a heating block.

The residue obtained after evaporation of the extract was dissolved in 40 μL of the derivatization solution BSTFA-TMCS (99:1). The mixture was heated at 100 °C for 20 min, and immediately thereafter was injected into the GC/MS system.

3. Results and discussion

3.1. Method validation

Analytical validation of the method was performed by establishing linearity, limits of detection and quantification, intraday and interday precision and accuracy, and recovery according to FDA guidelines [18].

3.1.1. Linearity

Standard calibration plots ($n = 7$) were obtained by doping aliquots of 50 mg of free drug hair with standard at the following concentration

Table 1
Linearity, limits of detection and quantification.

Substance	Equation	R ²	LOD (ng/mg)	LOQ (ng/mg)
Cocaine	$y = 0.3323x - 0.0738$	0.9982	0.015	0.2
BZE	$y = 0.2696x - 0.0098$	0.9989	0.015	0.2
CE	$y = 0.169x - 0.0073$	0.9977	0.025	0.05

levels for cocaine and BZE: 0.2-1-2-4-5-8-10 ng/mg (ISTD: 5 ng/mg). For CE concentration levels were: 0.05-0.1-0.5-1-2-3-5 ng/mg (ISTD: 5 ng/mg). These aliquots were subjected to the extraction process as previously described. A simple linear regression analysis was performed. Table 1 shows the calibration plots of the analytes. The coefficients of correlation were higher than 0.99 for the range of concentration studied.

3.1.2. Sensitivity

The sensitivity of the method was determined by calculating the limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LLOQ). LOD was determined by an empirical method in which a series of hair samples containing decreasing amounts of the analytes were analyzed. The LOQ is the lowest concentration of the analyte that can be determined quantitatively with the appropriate precision and accuracy. (Table 1)

3.1.3. Accuracy and precision

Precision and accuracy were determined by interday and intraday assays. Intraday precision and accuracy were evaluated by six determinations per concentration on different days. Intraday precision and accuracy were determined at three concentrations, low, medium and high (0.2-4-10 ng/mg) for cocaine and BZE, and (0.05-1-5 ng/mg) for CE, by preparing and analyzing five replicates for each level on the same day. Precision, expressed as the coefficient of variation (CV) of the measured values, was calculated as (standard deviation/mean) × 100. It is expected to be less than 15% at all concentrations, except at the LOQ for which 20% is acceptable. (Table 2)

3.1.4. Recovery

Extraction efficiency was calculated by adding the standard to one batch ($n = 5$) of low and high control samples before SPE and to a second batch after SPE, but before evaporation. The mean results are shown in Table 3; they were calculated by dividing the mean peak-area ratio target ion/ internal standard for the samples which the standard solution was added before SPE, with the mean peak-area ratio of target ion/ internal standard for the samples in which the standard solution was added after SPE.

Table 2
Precision and accuracy intraday and interday.

Concentration (ng/mg)	Intraday CV (%)	Interday CV (%)	Intraday (%RSD)	Interday (%RSD)
Cocaine				
0.2	8.87	9.10	9.54	9.54
4	6.98	6.51	0.24	1.11
10	4.78	5.02	2.38	2.56
BZE				
0.2	9.84	10.1	5.84	6.2
4	2.22	2.03	0.74	2.35
10	6.85	7.05	9.5	10.91
CE				
0.05	7.44	8.11	12.2	10.4
1	1.63	2.73	7.83	9.1
5	2.52	3.90	6.03	6.85

Table 3
Extraction recovery percentages.

Extr. Rec. ($n = 5$)	0.2 ng/mg	10 ng/mg
Cocaine	95.32	85.5
BZE	97.35	102.1
Extr. Rec ($n = 5$)	0.05 ng/mg	5 ng/mg
CE	101.6	86.6

3.2. Discussion

The objective of this study was to investigate the relationship between drug concentrations at the first stage of abstinence and the prevalence of cocaine and its metabolites BZE and CE detection.

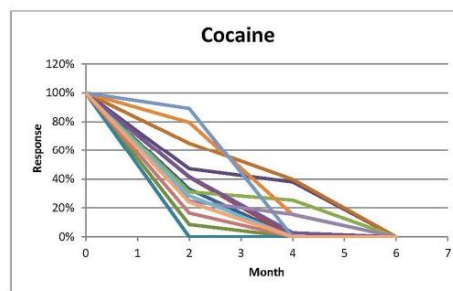
According to some authors, at least 3-4 months have to go by to become negative for hair testing in the segment proximal to the scalp [19]. This study maintains a previous one [20] in which the cocaine did not disappear from the proximal segment until after 3 months post-consumption (obtaining confirmation of withdrawal by urinalysis).

Cocaine cut-off level is 0.5 ng per mg of hair, and for BZE and CE is 0.05 ng/mg, as advised by the guidelines of the Society of Hair Testing [21]. In this work, it has been selected as LLOQ 0.2 ng/mg (smaller than mentioned cut-off) to quantify with better precision the decreasing concentration of cocaine and BZE in consecutive studied segments. All participants ($n = 15$), as previously mentioned, during the course of the study were tested by urine analysis, supporting participant report of total abstinence. Some cases didn't keep the program, and the concentration of cocaine and its metabolites increased in the second segment. These cases were rejected.

Using the methodology described above, 1 cm segments of the hair samples were analyzed to establish residual concentrations of cocaine, BZE and CE in the hair of abstinent individuals. After the beginning of abstinence, the detected concentration of cocaine and its metabolites continuously decreased (Fig. 1, 2 and 3). Although hair analysis results for cocaine and BZE and CE remained positive for most of patients for up two months after last reported cocaine consumption, concentration levels fell severely in the successive two months.

In the studied group of 15 subjects who had stopped cocaine consumption within 2 months of testing, 13 cases were positive for cocaine, 10 cases for BZE and 3 cases for CE. After 4 months, only 3 cases tested over the cut-off for cocaine. After 6 months all subjects for cocaine, BZE and CE tested negative (Tables 4 and 5).

Previous research on the timing of drug uses hair analysis by segments and can perform a retrospective analytical study on hair samples. This retrospective analysis allows for large-scale population studies, and since the samples are easy to collect and store, these studies can span months or even years [13,19].

**Fig. 1.** Segmental response during six months after cocaine discontinuation for fifteen subjects.

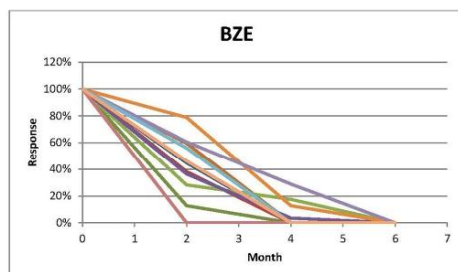


Fig. 2. Segmental response during six months of metabolite BZE for thirteen subjects.

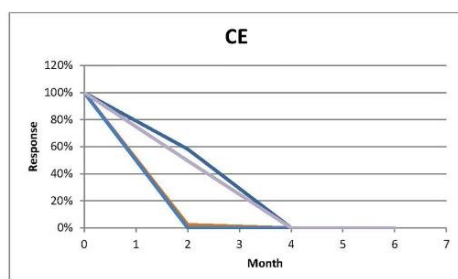


Fig. 3. Segmental response during six months of CE for six subjects.

Table 4
Concentrations of cocaine and its metabolites in hair for positive cases.

		Months of reported abstinence			
		0	2	4	6
Coc (ng/mg)	<i>n</i>	15	13	6	0
	Mean \pm SD	2.62 \pm 4.86	1.0 \pm 2.1	0.17 \pm 0.24	N.D.
	Min-max	0.28–19.84	0.25–8.26	0.20–0.69	N.D.
BZE (ng/mg)	<i>N</i>	13	10	4	0
	Mean \pm SD	1.97 \pm 3.89	0.76 \pm 1.50	0.12 \pm 0.20	N.D.
	Min-max	0.42–15.70	0.23–5.71	0.38–0.55	N.D.
CE (ng/mg)	<i>n</i>	6	3	0	0
	Mean \pm SD	0.12 \pm 0.20	0.03 \pm 0.06	N.D.	–
	Min-max	0.12–0.59	0.08–0.24	N.D.	–

4. Conclusion

There are few publications with patients in the period of abstinence who perform periodic analysis to know the rate of disappearance of drugs in hair. Previous studies indicated that the duration of detection in the hair was 3–4 months for both opiates and cocaine after the beginning of abstinence. [8,15]. The current study followed 15 patients since the beginning of abstinence. The results of this work indicate that after 4 months of abstinence, cocaine, BZE and CE concentrations in hair for some tested subjects were higher than cut-off. Only after 6 months of abstinence these concentrations were negative in all cases. Therefore, we consider that, in order to have total certainty, the limit of duration of detection for cocaine and its metabolites in hair should be established after 6 months of reported abstinence.

Table 5
Levels of cocaine and metabolites in hair samples during six months from 15 cocaine users.

Subject	Cocaine (ng/mg)				BZE (ng/mg)				CE (ng/mg)			
	0	2	4	6	0	2	4	6	0	2	4	6
1	1.30	0.43	0	0	0.93	0.41	0	0	0	0	0	0
2	0.56	0	0	0	0.42	0	0	0	0	0	0	0
3	2.92	0.25	0	0	1.98	0.25	0	0	0.14	0.08	0	0
4	0.53	0.25	0.20	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0.53	0	0	0	0.47	0	0	0	0.27	0	0	0
6	0.64	0.42	0.25	0	0.44	0.26	0	0	0.12	0	0	0
7	0.71	0.29	0	0	0.61	0.23	0	0	0.30	0.11	0	0
8	2.74	0.85	0.69	0	2.16	0.61	0.38	0	0.59	0	0	0
9	19.84	8.26	0.55	0	15.70	5.71	0.55	0	0	0	0	0
10	3.31	2.64	0.51	0	3.04	2.40	0.39	0	0	0	0	0
11	0.28	0.25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	1.69	0.28	0	0	1.07	0	0	0	0	0	0	0
13	1.90	0.47	0.30	0	1.42	0.86	0.41	0	0	0	0	0
14	0.96	0.27	0	0	0.51	0.29	0	0	0	0	0	0
15	1.33	0.31	0	0	0.81	0.37	0	0	0.48	0.24	0	0

5. Compliance with ethical standards

The authors declare that they have not any conflicts of interest.

The use of human biological samples has been necessary in the development of this research. This use has been done always following all applicable legal requirements and in agreement with the ethical standards of the current Helsinki Declaration and the recommendations of the Council of Europe on research on biological material of human origin. To be developed, this study has obtained the permission of the Clinical Research Ethics Committee of Galicia

Those legally responsible of the samples are the researchers, and the samples will not be transferred to third parties nor used in other research projects. All participating researchers have demonstrated their experience and capacity for research.

In order to carry out this study, written informed consent was obtained from all involved participants. A copy of the written consent is available for review if necessary. All biological samples have been treated in the laboratory anonymously. The protocols usually established in all clinical investigations have been followed to access only the data necessary for scientific research. The treatment of the data is in accordance with Law 3/2018 on the protection of personal data and digital rights guarantee developed in Spain by Regulation (EU) 2016/679 of the European Parliament and Council, of April 27, 2016, on the protection of persons with regard to the processing of personal data and on the free movement of such data (which abolish Directive 95/46 / EC: General Data Protection Regulation)

References

- [1] UNODC, United Nations Office on Drugs and Crime, World Drug Report, United Nations Publication, Vienna, 2018 n.d. <https://www.unodc.org/wdr2018/>.
- [2] E. Cognard, S. Rudaz, S. Bouchonnet, C. Staub, Analysis of cocaine and three of its metabolites in hair by gas chromatography-mass spectrometry using ion-trap detection for CI/MS/MS, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 826 (2005) 17–25, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.07.043>.
- [3] L. Afonso, T. Mohammad, D. Thatai, Crack whips the heart: a review of the cardiovascular toxicity of cocaine, *Am. J. Cardiol.* 100 (2007) 1040–1043, <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2007.04.049>.
- [4] J. Glauser, J.R. Queen, An overview of non-cardiac cocaine toxicity, *J. Emerg. Med.* 32 (2007) 181–186, <https://doi.org/10.1016/j.jemermed.2006.05.044>.
- [5] R. Gottardo, A. Fanigliulo, D. Sorio, E. Liotta, F. Bortolotti, F. Tagliaro, Monitoring compliance to therapy during addiction treatments by means of hair analysis for drugs and drug metabolites using capillary zone electrophoresis coupled to time-of-flight mass spectrometry, *Forensic Sci. Int.* 216 (2012) 101–107, <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2011.09.004>.
- [6] T. Baeza, F. Borrull, C. Aguilár, M. Calull, Recent trends in analytical methods and separation techniques for drugs of abuse in hair, *Anal. Chim. Acta.* 856 (2015) 1–26, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.06.051>.

- [7] D.A. Kidwell, F.P. Smith, A.R. Shepherd, Ethnic hair care products may increase false positives in hair drug testing, *Forensic Sci. Int.* 257 (2015) 160–164, <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2015.07.023>.
- [8] L. Tsanaclis, M. Andraus, J. Wicks, Hair analysis when external contamination is in question: a review of practical approach for the interpretation of results, *Forensic Sci. Int.* 285 (2018) 105–110, <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2018.01.028>.
- [9] S. Fu, A review of methodology for testing hair for cocaine, *J. Forensic Investig.* 2 (2014), <https://doi.org/10.13188/2330-0396.1000007>.
- [10] M. Minoli, S. Casati, I. Angeli, A. Ravelli, P. Rota, P. Allevi, M. Orioli, Analysis of hydroxy-cocaine metabolites as evidence of cocaine consumption: identification by parent ion search and quantitation by UHPLC-MS/MS in hair, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 172 (2019) 167–174, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.04.028>.
- [11] D. Mantiniéks, D. Gerostamoulos, P. Wright, O. Drummer, The effectiveness of decontamination procedures used in forensic hair analysis, *Forensic Sci. Med. Pathol.* 14 (2018) 349–357, <https://doi.org/10.1007/s12024-018-9994-6>.
- [12] F. Pragst, M.A. Balikova, State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse, *Clin. Chim. Acta.* 370 (2006) 17–49, <https://doi.org/10.1016/j.cca.2006.02.019>.
- [13] N. Suwannachom, T. Thananchai, A. Junkuy, T.E. O'Brien, P. Sribanditmongkol, Duration of detection of methamphetamine in hair after abstinence, *Forensic Sci. Int.* 254 (2015) 80–86, <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2015.06.030>.
- [14] M. Shen, P. Xiang, Y. Sun, B. Shen, Disappearance of 6-acetylmorphine, morphine and codeine from human scalp hair after discontinuation of opiate abuse, *Forensic Sci. Int.* 227 (1–3) (2013) 64–68, <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2012.10.028>.
- [15] P. Kintz, Hair analysis in forensic toxicology: an updated review with a special focus on pitfalls, *Curr. Pharm. Des.* 23 (2018) 5480–5486, <https://doi.org/10.2174/1381612823666170929155628>.
- [16] J. Morichon, G. Lachâtre, J.-M. Gaulier, S. Dulaurent, M. Merceroles, L. Imbert, Development and validation of a single LC-MS/MS assay following SPE for simultaneous hair analysis of amphetamines, opiates, cocaine and metabolites, *Forensic Sci. Int.* 234 (2013) 132–138, <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2013.11.004>.
- [17] O. López-Guarnido, I. Álvarez, F. Gil, L. Rodrigo, H.C. Cataño, A.M. Bermejo, M.J. Taberero, A. Pla, A.F. Hernández, Hair testing for cocaine and metabolites by GC/MS: criteria to quantitatively assess cocaine use, *J. Appl. Toxicol.* 33 (2013) 838–844, <https://doi.org/10.1002/jat.2741>.
- [18] U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA), Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, (2013) <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm070107.pdf>.
- [19] F. Garcia-Bournissen, M. Moller, M. Nesterenko, T. Karaskov, G. Koren, Pharmacokinetics of disappearance of cocaine from hair after discontinuation of drug use, *Forensic Sci. Int.* 189 (2009) 24–27, <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2009.04.004>.
- [20] M. Felli, S. Martello, R. Marsili, M. Chiarotti, Disappearance of cocaine from human hair after abstinence, *Forensic Sci. Int.* 154 (2005) 96–98, <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.09.113>.
- [21] G.A.A. Cooper, R. Kronstrand, P. Kintz, Society of hair testing guidelines for drug testing in hair, *Forensic Sci. Int.* 218 (2012) 20–24, <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2011.10.024>.

Artigo 2

Disappearance of codeine, morphine and 6-MAM in hair after cessation of abuse

Forensic Science International, 352, 111855 (2023).

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2023.111855>

Contribución específica na publicación:

Conceptualización, metodoloxía e investigación: formulación e desenvolvemento da parte experimental, validación e análise de resultados. Redacción do manuscrito orixinal.

Índices de calidade:

A revista onde foi publicado o artigo presenta un índice de impacto de 2.2, e está nas seguintes posicións nas seguintes categorías: cuartil 1 (Q1), 4/17 (Medicina Legal), percentil 79.4



Contents lists available at ScienceDirect

Forensic Science International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/forensi

Disappearance of codeine, morphine and 6-MAM in hair after cessation of abuse

A. Suárez-García, I. Álvarez-Freire^{*}, A.M. Bermejo-Barrera, P. Cabarcos-Fernández, M.J. Taberero-Duque

Institute of Forensic Science, Forensic Toxicology Service, Faculty of Medicine, University of Santiago de Compostela, C/San Francisco s/n, 15782 Santiago de Compostela, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Abstinence time
Opioids
Cessation drug use
Hair analysis

ABSTRACT

Research on the determination of drugs of abuse in hair has established that drugs can be detected in hair even long after cessation of use. The purpose of this study was to analyze hair samples from chronic opioid users who were beginning a controlled drug cessation program. The study population ($n = 15$) is involved in a drug rehabilitation program in Santiago de Compostela, Spain. Over a 6-month period, subjects provided hair samples at 2-month intervals, with the first sample collected on the day they began the program. Codeine, morphine, and 6-MAM were analyzed by GC/MS (LOQ = 0.2 ng/mg). Hair tresses were divided into 1 cm segments and analyzed for all analytes 0–1 cm corresponding to the proximal portion to the scalp. Following cessation of opioid use, traces of codeine, morphine, and 6-MAM still remained in the newly growing hair segments for a specified period. After 2 months, still 27 % of the users tested positive, and at 4 months, 20 % were positive but only for 6-MAM. However, after 6 months of abstinence, the results were negative for all analytes.

1. Introduction

Opioids use remains a major concern around the world due to potentially severe health consequences. An estimated 31 million people worldwide consumed opiates, mainly heroin, according to most recent data [1]. Heroin is a semisynthetic opioid of morphine, which is an alkaloid naturally extracted from seed pod of the opium poppy plant. The chemical structure of heroin is like morphine with the addition of 2 acetyl groups (diacetylmorphine), which increase its permeability into the central nervous system [2].

Due to its short half-life of just a few minutes, heroin is rarely detectable in body fluids. After administration, the drug is rapidly metabolized to form 6-monoacetylmorphine (6-MAM), which is then converted to morphine, the predominant metabolite of heroin [3].

The presence of 6-MAM in urine is considered a definitive proof of heroin use since it cannot be produced by the metabolism of morphine or codeine. However, its detection window is limited to around 8 h after the drug is taken. This situation highlights the need to explore and develop new techniques for analysis, such as the use of different matrices [4]. Hair analysis has shown its importance in retrospective investigation of long-term substance use due to its wide detection

window. The reason behind this is that substances present in the bloodstream are distributed and integrated into the hair matrix. Hair grows at a steady rate of approximately 1 cm per month, and once substances and their metabolites are incorporated into the hair matrix, they can persist without being metabolized or broken down for a significant period. The collection of hair is non-invasive, and it prevents adulteration because it can be done under direct supervision. Additionally, hair samples can be kept at room temperature for an extended period without the need for special transport or storage conditions [5]. Hair analysis offers other benefits, making it a valuable method for addressing various clinical and forensic concerns. These include identifying drug use [6], detecting prenatal exposure and monitoring withdrawal treatment, revoking driving privileges, and investigating causes of death [7] [8].

External contamination remains one of the most significant limitations in hair analysis for groups of drugs that are typically smoked or inhaled. Therefore, the removal of possible drugs that have been deposited externally is crucial during the analysis. Various washout methods have been suggested to address this issue [9,10]. Several studies have evaluated the effectiveness of these wash protocols, and the results have shown that they were effective enough, indicating that the

^{*} Corresponding author.

E-mail address: ivan.alvarez@usc.es (I. Álvarez-Freire).

<https://doi.org/10.1016/j.foresci.2023.111855>

Received 18 July 2023; Received in revised form 18 September 2023; Accepted 8 October 2023

Available online 11 October 2023

0379-0738/© 2023 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

Table 1
Linearity, limits of detection and quantification.

Substance	Equation	R ²	LOD (ng/mg)	LOQ (ng/mg)
Codeine	y = 0.1617x-0.0109	0.9979	0.15	0.2
Morphine	y = 0.1841x-0.0151	0.9982	0.15	0.2
6-MAM	y = 0.1178x-0.0072	0.9983	0.15	0.2

Table 2
Precision and accuracy intraday and interday.

Concentration (ng/mg)	Intraday CV (%)	Interday CV (%)	Intraday (%RSD)	Interday (%RSD)
Codeine				
0.2	10.97	13.2	6.45	5.95
1	3.27	6.19	10.82	9.45
5	10.37	3.25	8.13	7.83
Morphine				
0.2	3.53	12.15	10.3	11.1
1	2.74	3.26	7.22	5.42
5	0.93	5.9	6.97	8.03
6-MAM				
0.2	2.85	6.38	12.65	10.05
1	4.62	4.47	0.59	2.15
5	9.20	6.15	4.87	6.12

Table 3
Extraction recovery percentages.

Extr. Rec. (n = 5)	0.2 ng/mg	5 ng/mg
Codeine	91.6	86.3
Morphine	101.6	83.0
6-MAM	88.1	84.1

interpretation of the results is rarely affected by external contamination [11].

Drug incorporation into hair can occur through several mechanisms, such as drugs excreted in sweat or sebum seeping into the hair, drug diffusion from blood vessels that supply the hair follicle, or drugs in the surrounding environment that deposit on the hair strand. However, the exact process of how the drugs are incorporated to the hair fibers is not well understood. Therefore, researchers are currently studying the chemical properties of drugs that bind to hair in order to gain a deeper understanding of how these drugs are incorporated into the hair [12].

Hair growth occurs in a cycle that consists of three stages: anagen, catagen and telogen. The anagen phase is the active growth phase and

can last for up to 6 years. About 85 % of the scalp hair is in the anagen phase at any given time. During the telogen phase, which is a resting stage, the hair follicle stops growing and remains inactive until a new hair grows and the old one falls out. This stage accounts for approximately 15 % of the hair on the scalp. The catagen phase is a transitional phase that lasts less than 3 weeks and is not easily noticed. After drug exposure, it is unlikely that a substance will be found in the same location on all hairs because, in contrast to anagen hair, the section of telogen hair where the drug is present will not move away from the scalp. [13]. In chronic heroin users, studies have shown that its metabolites can be detected in higher than expected concentrations for several months after they stop using the drug [14]. This may be due to the aforementioned hair follicle growth patterns.

One possible explanation for why people who have stopped using drugs may still test positive for them in their new hair, is that the drugs and their metabolites can remain in the body's hair follicles for an extended period. Furthermore, it is possible that substances deposited on the scalp can serve as a storage site for these drugs, leading to their continued presence in the hair after the individual has stopped using them. These factors may contribute to positive drug test results even after the cessation of drug use [4,15]. Since scalp hair strands often contain old hair in a telogenic or stationary phase. Hair in the telogen phase, which makes up around 10–15 % of a typical hair strand, can remain in this phase for up to 6 months [13]. It is likely that hair in the telogen phase can serve as an indicator of past drug consumption.

The aim of this research is to assess how long it takes for opioids (6-MAM, morphine, and codeine) to become undetectable in hair. To achieve this, a method based on the analysis of hair by segments was developed. Hair samples from people who entered a drug cessation program were used. The goal was to determine the total time it took for opiates to completely disappear from the hair of people who stopped using. This investigation can help determine whether individuals are compliant with the therapy program.

2. Material and methods

2.1. Reagents and reference standards

To develop the present study, solutions of 6-MAM, 6-MAM-d₃, morphine, morphine-d₃, codeine and codeine-d₃ in methanol (100 µg/mL) were obtained from Cerilliant® (Round Rock, TX, U.S.).

Pronase E, 1, 4-dithiothreitol (DTT), Chlorotrimethylsilane (TMCS), N-methyl-tert-butylsilyltrifluoroacetamide (BSTFA), acetic acid, gradient-grade methanol, and ammonium hydroxide were provided by

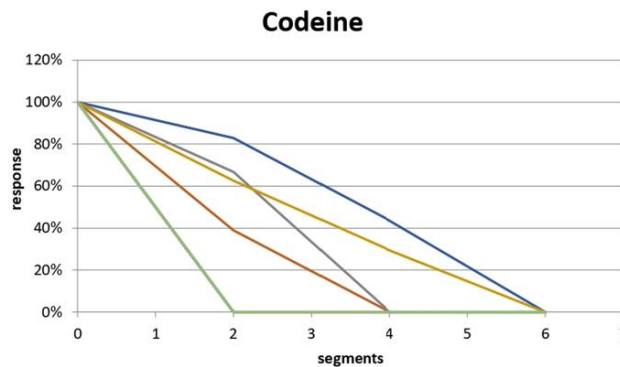


Fig. 1. Segmental response during six months after opioids discontinuation for fifteen subjects.

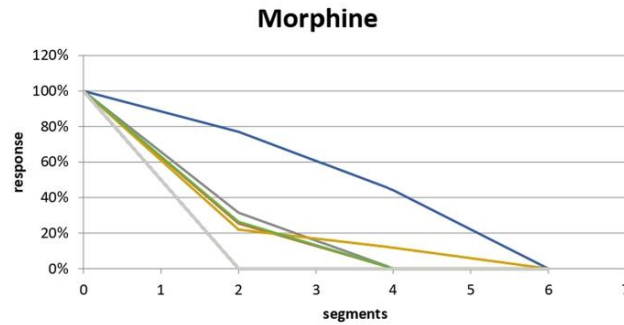


Fig. 2. Segmental response during six months of metabolite morphine for fifteen subjects.

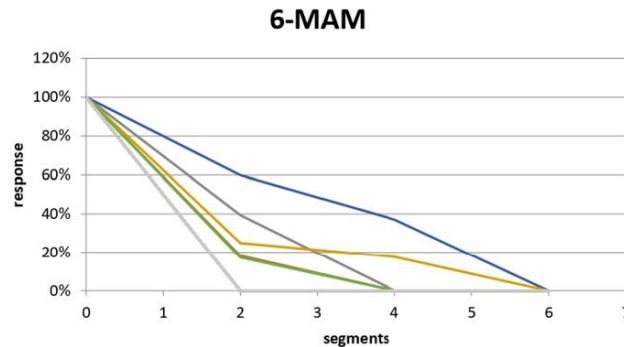


Fig. 3. Segmental response during six months of 6-MAM for fifteen subjects.

Table 4
Concentrations of codeine, morphine, and 6-MAM in hair for positive cases.

		Months of reported abstinence			
		0	2	4	6
Cod (ng/mg)	n	15	15	15	4
	Mean \pm SD	0.40 \pm 0.20	0.36 \pm 0.14	-	-
	Min-max	0.21-0.78	0.25-0.52	-	-
Mor (ng/mg)	n	15	15	15	5
	Mean \pm SD	0.82 \pm 0.33	0.43 \pm 0.25	-	-
	Min-max	0.51-1.49	0.22-0.78	0.45	-
MAM (ng/mg)	n	15	15	15	5
	Mean \pm SD	1.26 \pm 0.38	0.41 \pm 0.16	0.31 \pm 0.15	-
	Min-max	0.91-2.48	0.29-0.68	0.21-0.42	-

Merck® (Darmstadt, Germany). TRIS-hydroxymethyl-aminomethane (TRIS) was supplied from Sigma-Aldrich® (Stemheim, Switzerland). Purified water was supplied using a Milli-Q water system from Millipore (Le Mont-sur-Lausanne, Switzerland).

2.2. Instrumentation

A gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) system was used in this research. It was composed by an HP 6890 GC from Hewlett-Packard® (Little Falls, DF, USA), equipped with an HP 7683B auto-injector from Agilent® (Las Rozas, Spain) and connected to an HP 5973

inert mass selective detector, also from Agilent®.

To separate the different compounds, a capillary column HP-5MS was used (crosslinked 5 % phenylmethylsiloxane, 30 m x 250 μ m i.d., 0.5 μ m film thickness). The samples (2 μ L) were injected into the instrument using the splitless injection mode (2 min). The injection port was heated to 240 °C, while the temperature of the ion source was set at 300 °C. The initial temperature of the column started at 90 °C and hold for 1 min. Then, the temperature was increased at a rate of 30 °C per minute until it reached 235 °C, and it was held for 10 min. After that, the temperature was ramped again, but a slower rate of 15 °C per minute, until it reached 260 °C and held for 5 min. Finally, the temperature was increased to 300 °C for 5 min to clean the column.

The mass selective detector operated at 320 °C. The ion source was set to 250 °C and the quadrupole was kept at 100 °C. The mass analyzer worked by electron ionization (70 eV), in selected ion monitoring (SIM). For each analyte the following ions were selected: m/z 371, 178, 234 (codeine); m/z 374, 181, 273 (codeine- d_3); m/z 429, 414, 236 (morphine); m/z 432, 417, 239 (morphine- d_3); m/z 399, 340, 287 (6-MAM); m/z 402, 343, 290 (6-MAM- d_3). The underlined ions were used for quantification.

2.3. Hair samples

The hair samples used in this study were obtained from people (n = 15) enrolled in a drug cessation program. Participants voluntarily provided hair samples by previously signing an informed consent to

Table 5
Levels of codeine, morphine and 6-MAM in the 0–1 cm proximal hair segment during six months from 15 opioid users.

Subject	Age	S	Codeine (ng/mg)				Morphine (ng/mg)				6-MAM (ng/mg)			
			0	2	4	6	0	2	4	6	0	2	4	6
1	55	M	0.37	0.30	*	0	1.01	0.78	0.45	0	1.13	0.68	0.42	0
2	29	M	0.31	0	0	0	0.88	0.22	0	0	0.98	*	0	0
3	44	M	0.78	0.52	0	0	1.49	0.47	0	0	1.33	0.52	0	0
4	49	M	0.40	0.25	0	0	1.20	0.26	0	0	1.17	0.29	0.21	0
5	49	F	0.21	0	0	-	0.60	0	0	-	2.48	0	0	-
6	27	M	0	0	0	-	0.58	0	0	-	1.12	0	0	-
7	19	M	0	0	0	-	0.54	0	0	-	1.10	0	0	-
8	39	M	0	0	0	-	0.56	0	0	-	1.14	0	0	-
9	41	M	0	0	0	-	0.55	0	0	-	1.25	0	0	-
10	43	M	0	0	0	-	0	0	0	-	1.13	0	0	-
11	32	M	*	0	0	-	0.64	0	0	-	1.27	0	0	-
12	45	F	*	0	0	-	0.61	*	0	0	1.06	*	0	0
13	34	M	0.34	0	0	-	1.08	0	0	-	1.63	0	0	-
14	51	M	0	0	0	-	0.51	0	0	-	0.91	0	0	-
15	51	M	0	0	0	-	1.26	0	0	-	1.24	0	0	-

M: Male; F: Female.

* Concentration value between LOD and LLOQ.

participate in the research. Compliance with detoxification treatment was demonstrated by periodic urine analysis.

The study's protocol was approved by The *Clinical Research Ethics Committee of Galicia, Spain*. Hair samples were collected every two months during six months, starting from the patients' enrollment in the program. The samples were collected from the posterior vertex area, 0–1 cm segment proximal to the scalp was analyzed. The first hair segment (sample 0 in Table 5) was taken on the same day as enrollment, representing drug use before abstinence and the concentration was considered to set 100 % response. Subsequent samples were taken at two-month intervals (samples 2, 4 and 6 in Table 5). The samples collected had not undergone any cosmetic treatments, and patients were instructed not to apply any of that to their hair during the study. To eliminate external contamination, the hair was decontaminated by washing with a 0.1 % solution of neutral soap (Tween 20) and distilled water. After drying at 40 °C, the hair was cut into 1-mm segments and 50 mg aliquots were weighed.

2.4. Sample preparation

The process of analyzing hair for the presence of 6-MAM, codeine and morphine involved a previously validated protocol [16]. After an enzymatic hydrolysis process, the drugs were extracted from the hair using SPE as the extraction technique. Polymeric reversed phase cartridges Strata-X 33 µm (60 mg; Phenomenex®, UK) were used. Once the analytes were separated, the eluate was dried up using a stream of nitrogen gas in a heating block set at 40 °C. The extract obtained contains the substances of interest.

The extract needed a posterior derivatization step (BSFTA-TMCS (99:1), 40 µL) The sample was then heated at 100 °C for 20 min and then injected into the GC/MS system for further analysis and detection of the analytes.

3. Method validation

The method was rigorously tested and validated following the guidelines set by the FDA [17]. Linearity, limits of detection and quantification, intraday and interday precision and accuracy, and recovery were evaluated.

3.1. Linearity

To assess linearity, 50 mg aliquots of drug-free hair were doped with standard solutions of morphine, codeine, and 6-MAM at different

concentrations: 0.2–0.5–0.8–1–2–4–5 ng/mg (ISTD: 5 ng/mg). The calibration curves were repeated 7 times. The samples were extracted following the previously described procedure. Subsequently, a simple linear regression analysis was conducted on the aliquots. Table 1 shows the calibration plots of the analytes. The coefficients of correlation were found to be higher than 0.99 for the concentration range studied. This indicates the reliability and accuracy of the calibration plots.

3.2. Sensitivity

The method's sensitivity was assessed by determining the limit of detection (LOD) and the lower limit of quantification (LLOQ). To establish the LOD, a practical approach was employed where a range of hair samples containing diminishing quantities of the substances of interest were examined. The LLOQ represents the lowest concentration of the analytes that can be reliably and accurately quantified. (Table 1).

3.3. Accuracy and precision

The precision and accuracy of the measurements were assessed through both interday and intraday assays. For interday evaluation, six determinations were performed for each concentration on different days. Intraday precision and accuracy were determined by preparing and analyzing five replicates at three concentration levels (low, medium, and high) on the same day. Precision was quantified as the coefficient of variation (CV) of the measured values, calculated as the ratio of the standard deviation to the mean, multiplied by 100. Precision values were expected to be below 15 % for all concentrations, except for the LLOQ, where a 20 % precision was deemed acceptable. (Table 2).

3.4. Recovery

The efficiency of extraction was determined by performing two separate batches (n = 5) of low and high control samples. In the first batch, the standard solution was added before SPE process, while in the second batch, it was added after SPE but before evaporation. To calculate recovery, the area ratios of the samples to which the standard was added before SPE were divided by those of the samples to which the standard was added after SPE. The average results are presented in Table 3.

4. Results and discussion

The purpose of this research is to know the time that elapses between

an opiate user stops consuming and opioids completely disappear from the new hair.

Although there is currently little evidence on the disappearance time of drugs in hair samples, some studies indicate that, in the case of cocaine, at least 6 months are necessary to ensure that the new hair (close to the head) is negative after beginning drug withdrawal [18]. Some authors suggest that for the hair of an opioid user to test negative (in the segment closest to the scalp) at least 3 months must pass [15]. Other studies suggest that they could be detected up to 4–5 months after the cessation of consumption [4].

The patients under study ($n = 15$) participated in an opiate withdrawal program that required their admission and permanent control (with periodic urine drug detection tests to confirm their abstinence). Using the methodology described above, hair samples were analyzed to determine the residual amounts of codeine, morphine, and 6-MAM present in abstinent individuals. It was found that after cessation of use, drug levels in the hair decreased significantly over time (as shown in Figs. 1–3). After the first two months in the program, most of the participants tested negative but still 27 % were still testing positive (Table 4).

In this work, 0.2 ng/mg has been selected as LLOQ to quantify the decreasing concentration of opioids in the consecutive segments studied. This cut-off of morphine, codeine, and 6-MAM was chosen because it is recommended by the Society of Hair Testing guidelines [19].

In this group of patients, it has been observed that after the first two months of abstinence, only 4 of the 15 analyzed tested positive for codeine and 5 for morphine and 6-MAM. After four months, only 2 subjects remained positive to morphine and 6-MAM. After 6 months, all patients tested negative for codeine, morphine, and 6-MAM (Table 5).

These results coincide with those obtained in the previously mentioned study carried out by our laboratory with cocaine users who began their withdrawal, confirming that at least 6 months are necessary to ensure the complete disappearance of drugs in all cases [18].

Segmental hair analysis allows retrospective analytical study on hair samples [20,21]. This is particularly useful for conducting large-scale population studies and makes it possible for studies to cover long periods, spanning several months or even years [14]. This study provides valuable and fundamental information to ensure compliance with the cessation of patients who start their treatment. This is of particular importance in cases of legal implication, where the user claims to have stopped using and yet the hair samples give a positive result.

5. Conclusion

In the scientific literature consulted, there are few published works on the disappearance time of drugs from the hair in addicts who stop using drugs. In this study, 15 patients were followed from the beginning of their abstinence. The results showed that, although after 2 months in most cases the analysis of codeine, morphine and 6-MAM in the hair is negative, 6 months are necessary to ensure the complete disappearance of the drugs from the new growing hair.

Compliance with the ethical standards

The authors affirm that they do not have any conflicts of interest.

This research has involved the use of human biological samples, which has been conducted in strict adherence to all relevant legal requirements and in accordance with the ethical standards outlined in the Helsinki Declaration and the Council of Europe's recommendations on research involving human biological material. The study received approval from the Clinical Research Ethics Committee of Galicia before it commenced. The researchers themselves bear the legal responsibility for the samples, and they will not be shared with third parties or utilized in other research projects. All participating researchers have demonstrated their competence and expertise in conducting research projects.

Informed written consent was obtained from all participants

involved in this study, and a copy of the consent form is available for reference if necessary. Anonymity was maintained during the handling of biological samples in the laboratory. Standard protocols for clinical investigations were followed to access only the data required for scientific research purposes. The processing of data adheres to the provisions of Law 3/2018 on the protection of personal data and digital rights guarantee developed in Spain by Regulation (EU) 2016/679 of the European Parliament and Council, dated April 27, 2016, concerning the protection of individuals with regard to the processing of personal data and the free movement of such data (repealing Directive 95/46/EC: General Data Protection Regulation).

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

References

- [1] UNODC, World Drug Report, 2022. (<https://www.unodc.org/unodc/en/data-and-analysis/world-drug-report-2022.html>).
- [2] B.S. Levine, S. Kerrigan, Principles of forensic toxicology, Fifth Ed. (2020), <https://doi.org/10.1007/978-3-030-42917-1>.
- [3] H. Druid, J.J. Strandberg, K. Alkass, I. Nyström, F.C. Kugelberg, R. Kronstrand, Evaluation of the role of abstinence in heroin overdose deaths using segmental hair analysis, *Forensic Sci. Int.* 168 (2007) 223–226, <https://doi.org/10.1016/j.foresciint.2006.02.047>.
- [4] M.A. Ghauri, F. Hassan, Y. Hassan, N. Atif, A. Adnan, Detection of 6-monoacetylmorphine in hair sample of heroin addicts using gas chromatography–mass spectrometry and significance of rehabilitation program, *Futur. J. Pharm. Sci.* 7 (2021), <https://doi.org/10.1186/s43094-021-00245-z>.
- [5] P. Kintz, Hair analysis in forensic toxicology: an updated review with a special focus on pitfalls, *Curr. Pharm. Des.* 23 (2017) 5480–5486, <https://doi.org/10.2174/1381612823666170929155628>.
- [6] G. Tassoni, M. Cippitelli, G. Miotti, A. Cerioni, E. Buratti, E. Bury, M. Cingolani, Hair analysis to evaluate polydrug use, *Healthc* 9 (2021), <https://doi.org/10.3390/healthcare9080972>.
- [7] P. Kintz, Hair analysis in forensic toxicology, *WIREs Forensic Sci.* 1 (2018) 1–11, <https://doi.org/10.1002/wfs2.1196>.
- [8] X. Wang, S.S. Johansen, M.K.K. Nielsen, K. Linnet, Segmental hair analysis—interpretation of the time of drug intake in two patients undergoing drug treatment, *J. Forensic Sci.* 64 (2019) 950–955, <https://doi.org/10.1111/1556-4029.13947>.
- [9] T. Baciú, F. Borrull, C. Aguilár, M. Calull, Recent trends in analytical methods and separation techniques for drugs of abuse in hair, *Anal. Chim. Acta* 856 (2015) 1–26, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.06.051>.
- [10] M.K.K. Nielsen, S.S. Johansen, Internal quality control samples for hair testing, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 188 (2020), 113459, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113459>.
- [11] L. Tsanacelis, M. Andraus, J. Wicks, Hair analysis when external contamination is in question: a review of practical approach for the interpretation of results, *Forensic Sci. Int.* 285 (2018) 105–110, <https://doi.org/10.1016/j.foresciint.2018.01.028>.
- [12] C. Davies, L. Gautam, A. Grella, J. Morrissey, Variability associated with interpreting drugs within forensic hair analysis: a three-stage interpretation, *J. Appl. Toxicol.* 40 (2020) 868–888, <https://doi.org/10.1002/jat.3959>.
- [13] F. Pragst, M.A. Balikova, State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse, *Clin. Chim. Acta* 370 (2006) 17–49, <https://doi.org/10.1016/j.cca.2006.02.019>.
- [14] X. Wang, J. Cui, Y. Zhuo, B. Shen, S. Zhang, W. Liu, M. Shen, P. Xiang, A retrospective of prevalence of drugs of abuse by hair analysis in Shanghai using LC-MS-MS, *J. Anal. Toxicol.* 44 (2020) 482–489, <https://doi.org/10.1093/JAT/BKAA007>.
- [15] M. Shen, P. Xiang, Y. Sun, B. Shen, Disappearance of 6-acetylmorphine, morphine and codeine from human scalp hair after discontinuation of opiate abuse, *Forensic Sci. Int.* 227 (2013) 64–68, <https://doi.org/10.1016/j.foresciint.2012.10.028>.
- [16] O. López-Guarnido, I. Álvarez, F. Gil, L. Rodrigo, H.C. Catáño, A.M. Bermejo, M. J. Taberero, A. Pla, A.F. Hernández, Hair testing for cocaine and metabolites by GC/MS: criteria to quantitatively assess cocaine use, *J. Appl. Toxicol.* 33 (2013) 838–844, <https://doi.org/10.1002/jat.2741>.
- [17] U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA), Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, 2018. (<https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm07107.Pdf>).
- [18] A. Suárez-García, I. Álvarez-Freire, A.M. Bermejo-Barreira, P. Cabarcos-Fernández, M.J. Taberero-Duque, Duration of detection of cocaine and metabolites in hair after discontinuation of abuse, *Microchem. J.* 153 (2020), <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104335>.

- [19] G.A.A. Cooper, R. Kronstrand, P. Kintz, Society of Hair Testing guidelines for drug testing in hair, *Forensic Sci. Int.* 218 (2012) 20–24, <https://doi.org/10.1016/j.foresciint.2011.10.024>.
- [20] K. Kuwayama, H. Miyaguchi, T. Kanamori, K. Tsujikawa, T. Yamamuro, H. Segawa, Y. Okada, Y.T. Iwata, Development of an improved method to estimate the days of continuous drug ingestion, based on the micro-segmental hair analysis, *Drug Test. Anal.* 13 (2021) 1295–1304, <https://doi.org/10.1002/dta.3025>.
- [21] G. Neil Stowe, R.B. Paulsen, V.A. Hill, M.I. Schaffer, A retrospective analysis of selected opioids in hair of workplace drug testing subjects, *J. Anal. Toxicol.* 43 (2019) 553–563, <https://doi.org/10.1093/jat/blz015>.

ANEXO III: Permiso da revista para incluír as publicacións de propia autoría



Ana Suárez <ana.suarezgar@gmail.com>

Re: attach own article to doctoral thesis [240110-022979]

Permissions Helpdesk <permissionshelpdesk@elsevier.com>
Responder a: Permissions Helpdesk <permissionshelpdesk@elsevier.com>
Para: ana.suarezgar@gmail.com

13 de xaneiro de 2024, 18:35

Dear Ana Suárez-García

We hereby grant you permission to reprint the material below at no charge in your thesis subject to the following conditions:

RE:

- **Disappearance of codeine, morphine and 6-MAM in hair after cessation of abuse, Forensic Science International, Volume 352, 2023, Suárez-García et al.**
- **Duration of detection of cocaine and metabolites in hair after discontinuation of abuse, Microchemical Journal, Volume 153, 2020, Suárez-García et al.**

1. If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgment to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies.

2. Suitable acknowledgment to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publication, as follows:

"This article was published in Publication title, Vol number, Author(s), Title of article, Page Nos, Copyright Elsevier (or appropriate Society name) (Year)."

3. Your thesis may be submitted to your institution in either print or electronic form.

4. Reproduction of this material is confined to the purpose for which permission is hereby given.

5. This permission is granted for non-exclusive world English rights only. For other languages please reapply separately for each one required. Permission excludes use in an electronic form other than submission. Should you have a specific electronic project in mind please reapply for permission.

6. As long as the article is embedded in your thesis, you can post/share your thesis in the University repository.

7. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission.

8. Posting of the full article/ chapter online is not permitted. You may post an abstract with a link to the Elsevier website www.elsevier.com, or to the article on ScienceDirect if it is available on that platform.

Kind regards,

Roopa Lingayath
Senior Copyrights Specialist

ANEXO IV: Permiso para o uso da figura “Rutas de incorporación propostas da droga no pelo” publicada en Journal of Applied Toxicology.



Order Number: 1425320

Order Date: 09 Dec 2023

Payment Information

Ana Suárez García
ana.suarezgar@gmail.com
Payment method: Invoice

Order Details

1. Journal of applied toxicology

Billing Status:
Open

Article: Variability associated with interpreting drugs within forensic hair analysis: A three-stage interpretation.

Order License ID	1425320-1	Type of Use	Republish in a thesis/dissertation
Order detail status	Completed	Publisher	JOHN WILEY & SONS LTD.
ISSN	1099-1263	Portion	Chart/graph/table/figure
			0,00 EUR
			Republication Permission

LICENSED CONTENT

Publication Title	Journal of applied toxicology	Publication Type	e-Journal
Article Title	Variability associated with interpreting drugs within forensic hair analysis: A three-stage interpretation.	Start Page	868
		End Page	888
		Issue	7
Author/Editor	Genetic Toxicology Association.	Volume	40
		URL	http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1002/(ISSN)1099-1263
Date	01/01/1997		
Language	English		
Country	United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland		
Rightsholder	John Wiley & Sons - Books		

REQUEST DETAILS

Portion Type	Chart/graph/table/figure	Distribution	Worldwide
Number of Charts / Graphs / Tables / Figures Requested	1	Translation	Other translation needs
Format (select all that apply)	Electronic	Enter Languages	Spanish
Who Will Republish the Content?	Academic institution	Copies for the Disabled?	No
		Minor Editing Privileges?	No
Duration of Use	Life of current edition	Incidental Promotional Use?	No
Lifetime Unit Quantity	Up to 499	Currency	EUR
Rights Requested	Main product		

NEW WORK DETAILS

Title	Estudo da eliminación de drogas de abuso do organismo trala abstinencia, a través da análise en pelo	Institution Name	Universidade de Santiago de Compostela
		Expected Presentation Date	2024-03-04



Nos últimos anos, houbo un aumento significativo no uso de matrices biolóxicas alternativas no campo da Toxicoloxía Clínica e Forense. Estas matrices ofrecen unha toma de mostra menos invasiva e máis sinxela que as matrices tradicionais. O pelo, en particular, destaca coma unha alternativa moi útil debido á súa extensa ventá de detección, que pode abarcar meses ou incluso anos. Isto permite levar a cabo estudos retrospectivos do consumo e establecer perfís cronolóxicos.

Por isto, o principal obxectivo desta Tese Doutoral foi analizar mostras de pelo de persoas adictas crónicas ás principais drogas de abuso (cocaína, opiáceos, e cannabis) que iniciaron un proceso de deshabitación, para coñecer o período no cal a droga deixa de aparecer no pelo.