

RELEVANCIA DE LOS ANÁLISIS TOXICOLÓGICOS EN UNA INVESTIGACIÓN POLICIAL

RELEVANCE OF TOXICOLOGICAL ANALYSIS IN A POLICE INVESTIGATION

Trasancos Pantín A.
Graduada en Química, Máster de Ciencias Forenses.
Universidad de Valencia.
España.

Correspondencia: andreatrapan@hotmail.com

Resumen: Se estudia un caso policial con la finalidad de destacar la importancia que los análisis químicos pueden tener en la resolución del mismo.

En primer lugar se revisa el caso, donde se investiga el asesinato de una menor. Se sospecha que la niña había sido drogada por la ausencia de resistencia y otros indicios. Al continuar con la investigación las sospechas aumentan al tener constancia de varios acontecimientos donde la menor había sido drogada.

Para poder comprobar que dichos sucesos han tenido lugar y confirmar los hechos, se procede con los análisis toxicológicos pertinentes. Por ello se describen las distintas técnicas que se pudieron llevar a cabo en el caso para la determinación de drogas en pelos, orina y sangre de la menor.

Palabras clave: benzodiazepinas, lorazepam, sumisión química, toxicología forense, LLE, SPE, HPLC-DAD, LC-MS, GC.

Abstract: In this project a police investigation has been studied in order to stand out the relevance chemical analysis might have in its resolution.

Initially the case is studied, an investigation on the murder of a minor. It is suspected that the girl had been drugged due to absence of resistance, among other evidences. As the investigation proceeds, proof of a series of events in which the girl had been drugged are found out and therefore suspicions increase.

In order to confirm that those events have taken place, the corresponding toxicological analysis is carried out, proceeding with different techniques to determine the presence of drugs in hair, urine and blood. These techniques are thoroughly described in this project.

Keywords: benzodiazepines, lorazepam, drug-facilitated assault, forensic toxicology, LLE, SPE, HPLC-DAD, LC-MS, GC.

1.- INTRODUCCIÓN

La investigación científica de un supuesto delito implica la colaboración de la medicina forense, la criminología y otras ciencias forenses que dependerán del caso y del momento histórico de la investigación.¹

En este trabajo se realiza el estudio del caso Asunta, una niña de 12 que años cuyo cuerpo sin vida aparece tirado en una cuneta en Santiago de Compostela la madrugada del 22 de Septiembre de 2013.

El trabajo se centra en el estudio de los indicios químicos y biológicos y su implicación en el caso y se estudiarán los posibles métodos empleados para su determinación.

1.1. Investigación medico legal de la muerte²

El papel del médico forense es fundamental en la inspección ocular y el levantamiento del cadáver, pudiendo estar obligado por el juez a elaborar un informe para el juzgado en el que constará el estado del cadáver, su identidad, circunstancias, etc.³

La investigación médico legal de la muerte se basa en tres fuentes de información: antecedentes, circunstancias y los hallazgos de autopsia (donde se incluyen estudios toxicológicos, hispatológicos, bioquímicos, etc.). Debido a las circunstancias en las que se debe realizar, debe registrarse solo aquella información cuyo conocimiento sea imprescindible antes de la autopsia y que no pueda obtenerse en otro momento. Debe ser primordial en dicho documento la claridad de exposición, su sencillez y facilidad de cumplimentación.¹

¹ Ángel G C: Clasificación de la criminalística. En: Manual de ciencias forenses y criminalística. Editorial Trillas. México, 1999, pp. 27-38.

² Palomo Rando J L , Ramos Medina V. Papel del Médico Forense en la Inspección Ocular y Levantamiento del Cadáver. Propuesta de documento. Cuadernos de Medicina Forense Nº 36, 2004.

³ Ley de Enjuiciamiento Criminal, Art. nº 778.

En casos de homicidios, son de gran importancia las fotografías y esquemas, tanto del cadáver como del entorno, la localización, distribución y tipo de manchas de sangre y otros fluidos biológicos, la descripción del estado de ropas, desorden, desgarros, machas, etc. Para evitar pérdidas de indicios o contaminaciones las manos deben protegerse con bolsas de papel.

1.2. Informes periciales

El informe pericial está previsto y regulado en la jurisdicción ordinaria Española por procedimientos civiles (LEC) y por procedimientos penales (LECrím). *“El juez acordará el informe pericial cuando, para conocer o apreciar algún hecho o circunstancia importante en el sumario, fuesen necesarios o convenientes conocimientos científicos o artísticos”*.⁴

Dicho informe pericial podrá ser valorado con total libertad por el juez, teniendo en cuenta el resto de pruebas practicadas en el procedimiento y realizando una valoración conjunta, según *“los principios de la sana crítica”*.⁵

La intervención de peritos queda restringida a ciertos casos, como puede ser la autopsia por causas de muerte violenta o sospechosa de criminalidad.⁶ Así mismo, los análisis químicos quedan restringidos *“únicamente a casos en que se consideren absolutamente indispensables para la necesaria investigación judicial y la recta administración de justicia”*.⁷

1.3. Toxicología forense

Las ciencias forenses son aquellas que son aplicadas a los asuntos legales.⁸ Se aplican las distintas ramas de estas ciencias con el fin de examinar las evidencias encontradas en la escena de un delito, con la finalidad de realizar aportes a las pruebas que los expertos deben presentar ante un tribunal.⁹

La toxicología forense aplica los métodos de estudio y análisis toxicológicos con propósitos legales.¹⁰ Realiza el examen de especímenes tomados de un individuo fallecido para detectar, identificar y cuantificar compuestos tóxicos o sus metabolitos, pudiendo llegar a determinar la causa de la muerte.

Los laboratorios toxicológicos juegan un papel importante en el análisis de drogas de abuso, medicamentos psicotrópicos y alcohol, siendo las muestras biológicas de mayor interés judicial la sangre, orina, semen, cerebro, riñón, contenidos gástricos, pulmón, cabello, uñas, saliva, etc.

Con la finalidad de garantizar la veracidad de los resultados aportados a los tribunales, debe seguirse un protocolo para envío de material al laboratorio denominado cadena de custodia. De esta forma se evitan los errores que no están relacionados con el método analítico.¹¹

En los casos donde se sospeche acerca de lo que se quiere investigar en un cadáver, deber realizarse una sistemática toxicológica general, para lo que se deben remitir al laboratorio: contenido gástrico, sangre limpia, orina, siendo necesario en algunos casos remitir a mayores muestras de uñas o cabellos.¹²

2.- OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es destacar la importancia que pueden tener los análisis toxicológicos en la resolución de un caso policial.

⁴ Ley de Enjuiciamiento Criminal, Art. nº 456.

⁵ Ley de Enjuiciamiento Civil, Art. nº 348.

⁶ Ley de Enjuiciamiento Criminal, Art. nº 343.

⁷ Ley de Enjuiciamiento Criminal, Art. nº 363.

⁸ Diccionario de Medicina Océano Mosby. Editorial Océano. Barcelona, 2001, pp. 569.

⁹ Palencia A, Romero G, Danielle E D. Las muestras en toxicología forense. Importancia de la cadena de custodia. Revista de Facultad de Ciencias de la salud 2008; 12, Nº3.

¹⁰ Mayorga F. Análisis en toxicología forense. Toxicología. En: Manual Moderno. Colombia, 2001, pp. 81-83.

¹¹ SOFT/AAFS Forensic Laboratory Guidelines. American Academy of Forensic Sciences. 2006.

¹² Locani O, Lorenzo J. El laboratorio de toxicología y química legal. Cuad. Med. forense, 2004; 3(2): 127-35.

Se describen los distintos tipos de análisis químicos que se pueden llevar a cabo en función de la muestra de la que se trate y de las sustancias que se quieran determinar.

De manera concreta, el estudio de la presencia de benzodiazepinas en muestras biológicas (sangre, orina y pelo).

3.- DESCRIPCIÓN DEL CASO¹³

3.1. Antecedentes de hecho

- Se decretó la apertura del juicio oral contra los acusados Alfonso Bastera y Rosario Porto (padres adoptivos de la víctima) por un delito de asesinato.
- Se realizó la recusación del Magistrado-Presidente inicialmente designado.
- Se desestimaron los recursos de apelación interpuestos por ambas partes.
- Se designaron los candidatos a jurados, se celebró la vista prevista en el artículo 22 LOTJ y se dictó auto de fecha 29/7/2015 en el cual se señaló como fecha de inicio de las sesiones del juicio el día 29 de septiembre de 2015.
- Tuvo lugar el juicio oral tras la constitución del correspondiente jurado y concluyó el día 26 de octubre, emitiéndose el 30 de octubre el veredicto del jurado.
- El Ministerio Fiscal calificó los hechos como constitutivos de un delito de asesinato, previsto y penado en los artículos 138 y 139.1ª del Código Penal, siendo coautores los acusados de acuerdo con el artículo 28 del Código Penal, concurriendo la circunstancia modificativa mixta de parentesco contemplada en el artículo 23 del Código Penal que actúa como agravante. De esta manera solicitan la imposición para cada uno de los acusados 18 años de prisión absoluta por igual tiempo e inhabilitación especial para el ejercicio de la patria potestad, tutela, curatela, guarda o acogimiento por igual tiempo y abono de las costas por mitad.
- Por otra parte, la acusación popular solicita la imposición para cada uno de los acusados 20 años de prisión, accesoria de inhabilitación absoluta, suspensión del derecho de sufragio por el tiempo de la condena y abono de las costas incluyendo las de la acusación popular.
- Las defensas en sus conclusiones definitivas solicitaron la absolución de sus defendidos.
- Se planteó al Jurado el correspondiente objeto del veredicto por parte del Presidente del Tribunal y se emitió veredicto que leyó en audiencia pública el portavoz designado, dando probados por unanimidad a los acusados culpables del hecho delictivo de haber dado muerte a Asunta, mostrando un criterio desfavorable a que a los acusados les sea suspendido el cumplimiento de la pena o propuesto indulto.
- Una vez leído el veredicto, se concedió la palabra a las partes para que informasen sobre las penas y sobre la responsabilidad civil.

3.2. Hechos probados

En el supuesto de autos, el Jurado consideró probada la tesis principal del Ministerio Fiscal y de la acusación popular, según la cual los acusados de mutuo acuerdo, acabaron con la vida de su hija Asunta, asfixiándola en la casa de Montouto y lo hicieron sedándola previamente con un medicamento que contenía Lorazepam para así poder asfixiarla sin que la menor tuviera posibilidad de defenderse. Dicha conclusión parte de una serie de indicios que han sido demostradas a través de las pruebas practicadas a lo largo del juicio que seguidamente serán analizadas.

- Queda probado que Alfonso y Rosario suministraron a su hija Asunta un medicamento que contenía Lorazepam desde al menos tres meses antes de su fallecimiento. En ejecución del plan acordado, Alfonso retiró como mínimo en tres ocasiones comprendidas entre julio y septiembre de 2013, 125 comprimidos de Orfidal de una farmacia de Santiago. Dichos hechos quedan probados a partir de los siguientes elementos:

¹³ Sentencia: 00365/2015 de la Audiencia Provincial Sección N. 6, A Coruña.

○ El informe pericial realizado por el Servicio de Química del Instituto Nacional de Toxicología con fecha de 14/10/2013 en el que se analiza un fragmento de cabello de la víctima. En dicho informe se llega a la conclusión de que la víctima estuvo consumiendo en los últimos meses de su vida repetitivamente Lorazepam y Nordiazepam, si bien no pueden determinar la cantidad exacta ni las fechas concretas. También manifestaron que no se han detectado la presencia de antihistamínicos.

El informe emitido por el Instituto de Ciencias Forenses de la USC de fecha 25/09/2013 acredita que dicho consumo de Lorazepam también se produjo el día de la muerte de la menor horas previas a la misma. Los niveles encontrados en la sangre entran dentro del rango tóxico, concluyendo que, al menos, le habían suministrado 27 pastillas de un miligramo. Información confirmada por el informe de la autopsia a fecha 11/12/2013.

○ Afirmaciones corroboradas por el acta de fecha 3/10/2013 levantada por la Secretaría judicial en el que se hace constar que, según el libro registro de psicotrópicos, el día 5/07/2013 se dispensó a Alfonso Bastera 50 comprimidos de Orfidal (medicamento que contiene Lorazepam) y el día 17/07/2013 otros 25 comprimidos del mismo medicamento. También lo corrobora el informe de recetas dispensadas electrónicamente, remitido por el SERGAS, según el cual se le dispensó el 22/07/2013 50 comprimidos de Orfidal en la misma farmacia.

El acusado ha justificado dicha adquisición diciendo que el medicamento era para Rosario, contraria a la versión de la acusada, que declaró que en julio sólo tomaba algún Orfidal suelto para dormir y al hecho de que a ésta sólo se le prescribe el uso de ese medicamento el 31/07/2013, cuando acude a la consulta del doctor Touriño, tal y como reconoció el propio acusado en su declaración, siendo él la persona que solicitó la cita para dicha consulta.

○ Ambos acusados manifiestan que suministraron a su hija durante los meses previos un antihistamínico, aunque realmente era Lorazepam. Esta conclusión se obtiene de una serie de testimonios de diversas profesoras de la Escuela de Altos Estudios Musicales o de la Academia Play que advirtieron a los padres de la existencia de determinados episodios alarmantes en los que la niña acudió sedada. También se consideraron los testimonios de las personas cercanas a la menor que estuvieron con ella los últimos meses de su vida.

▪ El primer episodio tuvo lugar el 9/07/2013, cuando el acusado llevó a Asunta a la Escuela de Altos Estudios Musicales sedada. Si bien, este advirtió que la niña iba dopada o drogada porque había tomado un antihistamínico. La acusada recogió a la menor, fue entonces cuando le contaron lo ocurrido a o que ésta les dijo que la llevaría al médico o al hospital. La menor no coordinaba bien, estaba somnolienta y apática, escuchaba las indicaciones pero no las realizaba, era capaz de andar sola, subir y bajar escaleras y no presentó ningún síntoma de alergia. Ambos acusados hablaron sobre estos hechos y lo achacaron al antihistamínico, mientras Rosario creía que había sido Alfonso quien se lo había administrado al dormir la noche anterior con la niña, este lo negó.

▪ El segundo episodio tuvo lugar el 22/07/2013 en la Academia Play de Santiago de Compostela. Un testigo manifestó que ese día el acusado le dijo que habían dado un tratamiento fuerte para la alergia a la menor, matizando que había sido su madre, y que por ello estaría algo dormida. El testigo también dice que recordaba que la niña estaba apagada, no presentaba síntomas de alergia y que podía caminar bien. La directora de la academia declaró que el día 21 del mismo mes, uno de los padres había llamado para advertir que la niña no podía ir a clase debido a que se encontraba en mal estado. El día 22 se acercó a ver el estado de la niña que aparentemente era normal, sin embargo, la niña empezó a actuar de forma extraña, siendo esta incapaz de decir cuántos dedos de la mano le enseñó la profesora. La niña dijo que llevaba días durmiendo, que había tomado unos polvos blanco que le había recetado una amiga médico de su madre que se los daba en el portal de casa e insistía en que no tenía alergia. También declaró la testigo que la menor fallaba en ejercicios muy básicos, cosa que nunca pasaba y estaba descoordinada, desorientada y tenía la boca seca. Además la niña le dijo que no se acordaba de nada, como lo que había desayunado, cuando ella tenía muy buena memoria. Finalmente,

relató que al finalizar las clases el acusado fue a recoger a la niña pero no se acercó para preguntar por ella, por lo que se acercó a comentarle que la niña no había estado bien, a lo que el acusado respondió que se debía a la alergia, por lo que le preguntó si podría deberse a los antihistamínicos a lo que este negó haberle suministrado dichos fármacos.

Estos testimonios ponen de manifiesto que la niña, tanto el día 22 de julio como los días anteriores, estuvo sedada bajo los efectos de una medicación que conllevó que estuviese durmiendo durante muchas horas, descoordinada y desorientada.

- Otro episodio ocurrió el 18 de septiembre, cuando Asunta no va a clase porque según dicen los acusados, estuvo con fiebre, si bien la acusada reconoce que envió una nota al tutor en la que decía que ese día no podía ir a clase porque “para realizarle unas ineludibles pruebas médicas”, le habían prescrito un fármaco que le había ocasionado “graves vómitos y mareos”. Una testigo declaró que dicho día no se encontraba con la madre a lo que la acusada le dijo que estaba con Alfonso debido a su mal estado. Al día siguiente la niña le contó a la testigo que ya se encontraba bien y que sólo tenía mal sabor de boca.

Ambos acusados han achacado dichos episodios a la fiebre o alergia.

Teniendo en cuenta que durante buena parte del mes de agosto y hasta el 10 de septiembre, Asunta estuvo con su madrina y la empleada del hogar, ambas han puesto de manifiesto que la niña tenía muy buena salud y que en las épocas que había estado con ellas había estado perfectamente, no había tomado ningún medicamento o antihistamínico y que los padres no les comentaron nada acerca de problemas de salud o alergia de la menor.

Se pone de manifiesto que todos los episodios anormales ocurridos en julio y septiembre de 2013, sucedieron cuando la menor estaba bajo el cuidado de sus padres, mientras que cuando estuvo con su madrina y la asistenta, la niña gozó de una salud magnífica.

Los episodios coinciden en unos meses en los que según pruebas científicas, la menor estuvo consumiendo de forma repetitiva un medicamento que contenía Lorazepam, sustancia que produce los efectos descritos por los testigos tal y como explican los peritos en el juicio. Perteneciendo dicha sustancia pertenece al medicamento que el acusado adquirió durante esos mismos meses. Sin embargo se ha demostrado científicamente que no se han detectado la presencia de antihistamínicos.

De esta forma ambos padres necesariamente fueron conocedores de estos problemas de la niña.

- Queda demostrado que el día 21 de septiembre, los dos acusados, de mutuo acuerdo para acabar con la vida de su hija, comieron con ella en el domicilio del padre y le suministraron una cantidad de fármaco que tenía Lorazepam, necesariamente tóxica, para finalmente, cuando este hiciera su efecto, asfixiarla. Los elementos probatorios son:

- La declaración de los acusados: ambos confirman que el día 21/09/2013 comieron en el domicilio del padre no antes de las tres de la tarde, puesto que Alfonso preparó un revuelto de champiñones y no pudo terminarlo hasta que llegó Rosario porque fue ella la que llevó los huevos con los que se preparó. También se sabe por la cámara de Bankia que la menor salió del piso de su padre, sola, alrededor de las 17:21 horas.

- Los informes periciales realizados por el Instituto Nacional de Toxicología confirman la presencia de Lorazepam en el contenido gástrico, con una concentración en sangre de 0.55 mg que se encuentran en el rango tóxico, sin que se hubiese sido absorbido todo porque aún tenía restos en el estómago. También la detectaron en la orina, siendo esta cantidad ínfima. De esta forma se determina que el tiempo transcurrido desde la última ingesta hasta la muerte, fue de tres o cuatro horas porque había alimentos parcialmente digeridos que podían verse a simple vista y tras la muerte el proceso apenas continúa (teniendo en cuenta que hay factores que pueden influir como la masticación).

○ Los informes periciales emitidos por el Instituto de Ciencias Forenses de la USC (25/09/2013) donde se establece que, en general, la velocidad media de vaciado gástrico es de unas cuatro horas, pudiendo prolongarse, por ejemplo, con la presencia de Lorazepam. También se indica que la concentración en orina de dicha sustancia es mínima, lo que significa que la eliminación de dicha sustancia se encontraba en una fase inicial.

Ambos informes ponen de manifiesto que la ingesta de la comida y del medicamento tuvo lugar al mismo tiempo o en intervalos de tiempo muy próximos. Esto coincide con las conclusiones del informe de la autopsia y sitúan la muerte en un intervalo de tiempo anterior a las 20 horas del día 21 de septiembre.

Teniendo en cuenta que la menor había consumido repetidamente dicha sustancia, esto genera tolerancia influyendo en los efectos que el medicamento puede producir, siendo estos ralentizados durante la digestión, y sabiendo que en episodios anteriores la niña podía caminar y subir y bajar escaleras aun estando sedada, concuerda con las imágenes de Bankia donde se observa que la niña camina sola a casa de la madre.

• Queda probado que el día 21 de septiembre de 2013, la acusada, siguiendo el plan acordado con el padre, después de las 18:15 horas llevó a su hija en coche a la casa familiar localizada en Montouto, Teo.

○ Declaración de Rosario donde confirma que a las 18:15 horas salió de su garaje, recogió a la menor y condujo hasta Montouto, a la cual llegó en torno a las 18:33, pasando por la rotonda de la Galuresa.

○ Las grabaciones de las cámaras situadas en distintos puntos del recorrido así como la cámara de la Galuresa.

• Se considera probado que el día 21, entre las 18:33 y las 20:00 horas, en la casa de Montouto los acusados asfixiaron a su hija Asunta por medio de la compresión que le aplicaron sobre la boca y la nariz en base a las siguientes pruebas:

○ En base a la declaración de la madre, la cámara de la gasolinera y al informe sobre la actividad de la alarma de la casa de Montouto queda constancia que la acusada a las 18:33 de la tarde está en la casa con la víctima. Se considera también que lo ocurrido, en contra de la declaración de la madre, es que la madre recogió a Asunta y al acusado en una calle de Santiago (ello lo infieren del testimonio de una amiga de la víctima que los sitúa al padre y ella en torno a las 18:22, a escasos metros del lugar por donde Rosario pasó con el coche).

○ Estas pruebas ponen de manifiesto que el acusado miente cuando dice que estuvo en su casa toda la tarde y que no salió desde el mediodía hasta las nueve y media de la noche, así como que no sabía que la niña había ido a Montouto. De esta forma se pone en manifiesto que el acusado ha mentado en un punto tan relevante como es el intervalo de tiempo en el que se produjo la muerte.

○ En el informe de la UCO señala que el teléfono de la acusada se sitúa en Montouto en torno a las 19:29 horas, hora comprendida entre el intervalo de tiempo estimado de la muerte (18:30-20:00 horas). En ese momento la menor ya debía estar afectada por el medicamento y los efectos iban aumentando.

• Con respecto a la causa de la muerte, queda probado que se trata de una asfixia por sofocación, en base al informe de la autopsia y al informe del Instituto Nacional de Toxicología de Sevilla, del cual defienden que la muerte se produjo por el efecto de una compresión sostenida sobre la boca y los orificios nasales que provocaron la asfixia de la víctima.

• Queda probado que los dos acusados ataron a su hija por los brazos y los tobillos por medio de unas cuerdas plásticas de color naranja en base a:

○ Informe de la autopsia en el que se reflejan signos de ataduras en los miembros superiores e inferiores del cuerpo de la víctima.

○ Imágenes de la inspección técnica ocular del lugar de aparición del cadáver donde se observó la existencia unas cuerdas de color naranja al lado del cadáver.

- Informe del Servicio de Química del Departamento de Criminalística de la Guardia Civil que relaciona las cuerdas halladas en la pista forestal al lado del cadáver con las existentes en la vivienda de Montouto. Se indica que tres trozos de cuerda hallados junto al cadáver coinciden exactamente en sus propiedades físicas y en su composición química con el rollo de cuerda y uno de los trozos de cuerda encontrados en dicha vivienda. Mientras el otro trozo coincide en sus propiedades físicas y composición química con otros dos trozos hallados en la vivienda.
- Declaración de los agentes de la Guardia Civil que acudieron con los acusados a la casa de Montouto la noche en la que apareció el cadáver, donde la acusada actuó de manera sospechosa y finalmente actuó con intención de ocultar las cuerdas que posteriormente se relacionaron con las presentes en el lugar donde se encontró a la víctima.
- Se considera probado que la víctima no pudo defenderse de modo efectivo porque estaba bajo los efectos del medicamento que con este fin se le había administrado.
 - Informe pericial del Instituto de Ciencias Forenses de la USC, donde confirman que en el momento de la muerte, la menor estaba bajo los efectos del Lorazepam, detectado en los análisis del contenido gástrico, de sangre y de orina, indicando que el contenido en sangre lo era en rango tóxico.
 - Informe pericial del Servicio de Química del Instituto Nacional de Toxicología, donde corroboran que el contenido en sangre de Lorazepam se encuentra en el rango tóxico.
 - Declaración efectuada por los forenses del INT, quienes afirman que en el momento de la muerte estaría gravemente intoxicada siendo sus capacidades de defensa muy limitadas.
- Finalmente se confirma que Asunta era hija de Rosario y Alfonso y se basa en:
 - Declaraciones de los acusados.
 - Prueba documental consistente en la partida de adopción y el libro de familia unida al testimonio.

3.3. Definición de conceptos

En la actualidad, hay un número creciente de delitos que se han llevado a cabo eliminando la posibilidad de resistencia por parte de la víctima. En este caso en particular, se ha producido un delito con agravante por la sumisión química de la víctima por parte de los acusados.

Sumisión química

Este fenómeno se puede definir como la administración de sustancias químicas (más específicamente psicoactivas) a una persona sin su consentimiento, con una finalidad delictiva, constituyendo de esta forma un acto criminal. La administración de estas sustancias produce en las víctimas una incapacidad que facilita la acción criminal, caracterizado por sensaciones de parálisis corporal como la dificultad para hablar o la imposibilidad de recordar hechos acontecidos.¹⁴

En este caso en particular, la víctima sufrió una sumisión química probado, puesto que ha habido agresión o tentativa documentada. Se ha detectado la presencia de una sustancia psicoactiva mediante un método fiable, siendo compatibles cronológicamente los hechos con la sustancia identificada.¹⁵

Las sustancias utilizadas en la mayoría de los casos, son fáciles de obtener y de administrar. Siendo las más empleadas principalmente las benzodiazepinas, el alcohol etílico y el ácido gamma-hidroxi-buátrico.¹⁶ Se tratan de sustancias que son depresores del sistema nerviosa central (SNC) que facilitan el control de la víctima de forma que

¹⁴ López-Rivadulla M, Cruz A, Quintela O, De Castro A, Concheiro M, Bermejo A, et al.; Sumisión Química: antecedentes, situación actual y perspectivas. Protocolos de actuación para estudios multicéntricos. Rev. Toxicol. 2005; 22: 119-26.

¹⁵ Rosario G R, Luisa S M; Sumisión química: reto para el toxicólogo forense. Rev. Esp. Med. Legal 2011; 37(3): 105,112.

¹⁶ Negrusz A, Gensslen RE. Drug-Facilitated Sexual Assault. En: Encyclopedia of Forensic and Legal Medicine. Editorial Elsevier. Nueva York, 2005, pp. 107-11.

provocan en la víctima una amnesia retrógrada o incapacidad de recordar hechos nuevos, o sedación para perturbar la capacidad de atención y respuesta ante una agresión.¹⁷

Las matrices más útiles para establecer la sumisión química son la sangre, orina y pelo. La sangre informa del consumo reciente y permite establecer correlaciones entre concentración y efecto. La orina informa de un consumo reciente como la sangre, pero su detección es más amplia, por ello se recomienda la recolección de ambas pruebas.¹⁸

El uso de técnicas acopladas, como GC-MS y LC-MS/MS, permiten detectar las sustancias en un período de entre 6 horas y 2 días en sangre y 12 horas y 5 días en orina.¹⁹ El análisis de pelo aumenta estos intervalos de detección. Se acordó por la sociedad para el análisis de cabellos como velocidad media de crecimiento del pelo humano 1 cm/mes, con la finalidad de facilitar la interpretación médico-legal. De esta forma se puede establecer en retrospectiva si hubo consumo así como el momento aproximado.²⁰

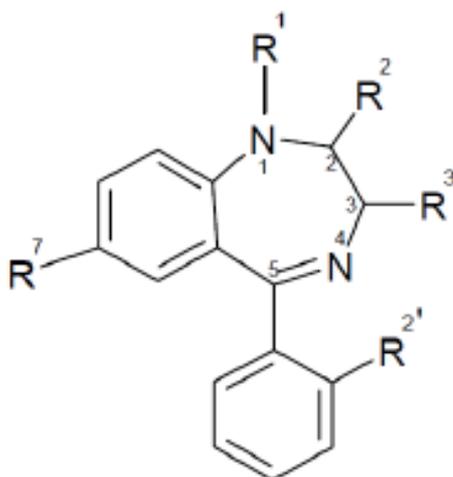
Benzodiazepinas

Constituyen una amplia familia de medicamentos. La mayoría están incluidos en la lista de sustancias psicotrópicas controladas legalmente. Son los fármacos sedantes más prescritos en la actualidad, lo que facilita su obtención.²¹

Se ha asociado su uso en crímenes como robos, secuestros y violaciones por ser depresoras del SNC, con la finalidad de dejar indefensa a la víctima.²²

Debido a la transformación parcial de las benzodiazepinas en el organismo, da lugar a la aparición de entidades químicas diferentes, por lo que se precisan técnicas sensibles y específicas para su detección en matrices biológicas como las de inmunoensayo y equipos especializados como CG/MS para el análisis confirmatorio además de contar con patrones de referencia de benzodiazepinas y sus metabolitos.

En general están compuestas por un anillo bencénico y un anillo diazepínico (ilustración 1).²³



¹⁷ Gouille J P, Anger J P. Drug-facilitated robbery or sexual assault: problems associated with amnesia. *Ther Drug Monit.* 2004; 26: 206-10.

¹⁸ LeBeau M A. Guidance for improved detection of drugs used to facilitate crimes. *Ther Drug Monit.* 2008; 30: 229-33.

¹⁹ Kintz P, Villain M, Ludes B. Testing for the undetectable in drug facilitated sexual assault using hair analyzed by tandem mass spectrometry as evidence. *Ther Drug Monit.* 2004; 26: 211-4.

²⁰ Cheze M, Muckensturm A, Hoizey G, Pépin G, Deveaux M. A tendency for reoffending in drug-facilitated crime. *Forensic Sci Int.* 2010; 196: 14-7.

²¹ ACMD Report on drug facilitated sexual assault (DFSA). UK Advisory Council on the Misuse of Drugs. Disponible en: <http://www.homeoffice.gov.uk/publications/alcohol-drugs/drugs/acmd1/drug-facilitated-sexual-assault/ACMDDFSA.pdf?view=Binary> (07/03/2018)

²² Determinación de Benzodiazepinas. Guía de Recomendaciones para la Colección, Envío de Muestras-Evidencias y Exámenes Forenses. Elaborado por el Instituto de Investigaciones Forenses La Paz-Sucre. Bolivia. 2006, pp. 45-46.

²³ Micó J A, Rojas O, Gibert-Rahola J. Benzodiazepinas y Drogodependencias. Dpto. Neurociencias. Facultad de Medicina. Universidad de Cádiz. España. Disponible en: http://www.dipucadiz.es/openems/export/sites/default/dipucadiz/galeriaFicheros/drogodependencia/ponencias4/BENZODIACEPINA_S_Y_DROGODEPENDENCIAS.pdf (07/03/2018)

Las 1,4-benzodiazepinas contienen átomos de nitrógeno en las posiciones 1 y 4 del anillo diazepínico. A este grupo pertenecen las benzodiazepinas terapéuticas más importantes (Diazepam, Clordaizepóxido y Lorazepam).

Se sabe que los diversos sustituyentes inducen cambios relativos en la potencia farmacológica y la duración de su efecto. En el caso del Lorazepam, no tiene metabolitos activos, por lo que su actividad reside en el compuesto original.²⁴

Las benzodiazepinas son metabolizadas por el citocromo P-450, siendo esta una de las rutas más importantes de las reacciones de biotransformación. Se fijan a las proteínas plasmáticas en un porcentaje muy alto (85-99%). En el caso del Lorazepam, se trata de una benzodiazepina de acción corta, siendo esta intensa pero breve. Presenta una semivida de 9 a 22 horas para una dosis de 2 mg en las cuales comienza a acumularse de forma gradual para ser eliminados de forma gradual del organismo. Se absorben muy bien por vía oral, con una velocidad de absorción (dependiendo de las condiciones) entre 30 y 240 minutos. Se metabolizan a nivel microsomal hepático por oxidación, desalquilación e hidroxilación. Posteriormente son conjugados con ácido glucurónico o sulfatos y finalmente son eliminados por el riñón.

12

En los casos de sobredosis causa ataxia, letargo y dificultad para hablar. Otras manifestaciones clínicas incluyen hipotermia, hipertensión y bradicardia. En general el nivel de toxicidad de estas sustancias es muy alto.²⁵

Técnicas analíticas

Un posible procedimiento en este caso sería la realización de una investigación general de tóxicos orgánicos. Estaría orientada a la detección de psicofármacos y fármacos de uso frecuente, como pueden ser los antidepresivos, analgésicos, antihistamínicos, barbitúricos, etc. Para ello es común el uso de técnicas como GM-MS y HPLC de sangre, orina y contenido gástrico.

Siguiendo la investigación se continuaría con la determinación de compuestos benzodiazepínicos mediante GC-MS, HPLC y LC-MS/MS de las muestras previas así como de muestras de cabello. También sería necesario realizar la determinación de otros compuestos ansiolíticos o susceptibles de ser empleados en la sumisión química.

En los últimos años, de acuerdo con la Junta Internacional de Control de Narcóticos, las benzodiazepinas más empleadas han sido: Alprazolam, Clordiazepoxide, Diazepam, Flunitrazepam, Lorazepam, Lormetazepam, Nitrazepam, Temazepam y Triazolam.²⁶ Desde un punto de vista físico-químico, las benzodiazepinas son compuestos lipofílicos con un alto coeficiente de partición en octanol-agua. Son absorbidas rápidamente mediante una ingesta oral, pero su biodisponibilidad depende en gran parte de la forma en la que son administradas.²⁷

Generalmente las matrices de las que se va a disponer para la determinación de benzodiazepinas se dividen en dos clases: convencionales (sangre, plasma/suero, orina) y alternativas (pelo, fluidos orales, uñas, humor vítreo). Sin embargo, en la última década, se han encontrado dos muestras atípicas como son restos de huellas dactilares y el aliento exhalado. En este trabajo centraremos el estudio en muestras de sangre, orina y pelo.

a.-Determinación de Benzodiazepinas en sangre

La elección del método de preparación de la muestra depende de la matriz de la que se disponga, del analito que se desee determinar, del objetivo del análisis y de la técnica analítica empleada.

a.1.- Pretratamiento

²⁴ Benzodiazepinas. Dossier. España. Colegio de Farmacéuticos de Ciudad Real, COFCR. Disponible en: <http://www.portalfarma.com/Profesionales/campanaspf/categorias/Documents/DOSSIER%20BENZODIAZEPINAS.pdf> (07/03/2018)

²⁵ Benzodiazepinas en Caspositette. Ficha técnica. Quickscreen. Test para detección de benzodiazepinas. España, 2008.

²⁶ Salomone S J. Benzodiazepines and GHB: Detection and Pharmacology, Humana Press, Inc., Totowa, NJ, 2001.

²⁷ Persona K et al. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2015; 113: 239-264.

Cuando se quieren aislar las benzodiazepinas de biomatrices, es muy común el uso de técnicas de extracción líquido-líquido (LLE) y de extracción en fase sólida (SPE). Estas técnicas precisan se basan en la pre-purificación, pre-separación y pre-concentración, con la finalidad de eliminar interferentes, mejorar la separación de forma selectiva y mejorar su detección.

Extracción líquido-líquido (LLE):

Es una técnica que se basa en las diferentes solubilidades (afinidades) de un producto entre dos fases líquidas inmiscibles entre sí. Esta técnica sirve para la separación de compuestos así como su concentración. Esta técnica está siendo sustituida por la SPE.

Podemos encontrar varios ejemplos donde se realiza esta técnica de pretratamiento en muestras de sangre para la determinación de benzodiazepinas, entre las cuales podemos encontrar el Lorazepam.

- Se acondicionó el pH de la muestra de 1mL de sangre a 9 empleando una solución de hidrofosfato de sodio. Se extrajeron los analitos de interés empleando n-butilcloruro como eluyente. Con esta técnica se consigue una recuperación entre 74.3-105.7%, que a continuación es analizada mediante LC-MS (cromatografía líquida-espectroscopía de masas).²⁸
- Se trataron 0.5 mL de sangre con 0.5 mL de Na₂HPO₄-buffer 0.5M y se extrajeron los analitos empleando acetato de butilo ACN:MTBSTFFA (80:80/ v:v) con una recuperación entre 88.2-107%. Seguida de esta técnica se empleó GC-(EI)-MS (cromatografía de gases- impacto electrónico- espectroscopia de masas).²⁹

Extracción en fase sólida (SPE):

Es una técnica preparativa cuya finalidad es eliminar posibles contaminantes o interferentes de la muestra. El material de soporte empleado es un sólido, a través del cual pasa un líquido o un gas. Los analitos son retenidos por el sólido mientras que los interferentes pasan a través de él. Finalmente los analitos son eluidos en función de las diferentes afinidades entre la fase móvil (eluyente) y la fase estacionaria (soporte sólido) y concentrados. Esta técnica presenta varias ventajas como el bajo volumen de elución, existencia de numerosos adsorbentes disponibles, poco consumo de disolventes o ninguno, pocas posibilidades de contaminación, es muy rápida y sencilla, se puede acoplar a toras técnicas de separación, se puede automatizar.^{30,31}

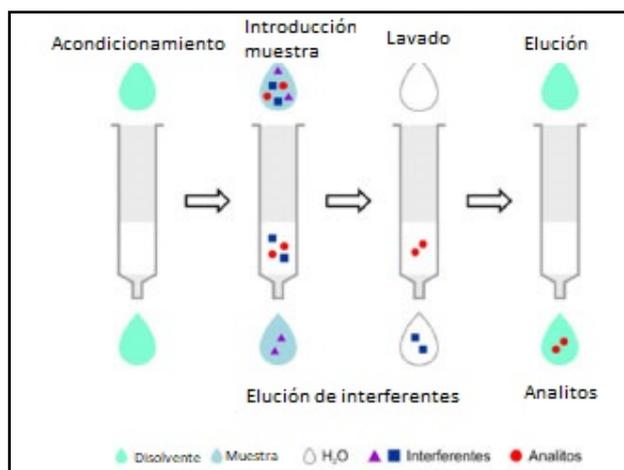
Esta técnica consta de cuatro pasos principales: acondicionamiento del cartucho; introducción de la muestra; eliminación de interferentes (lavado); elución del analito de interés (ilustración 2).

²⁸ Bugey A, Rudaz S, Staub C. A fast LC-APCI/MS method for analyzing benzodiazepines in whole blood using monolithic support. J. Chromatogr. B: Analyt. Technol. Biomed. Life Sci., 2006; 832: 249–255.

²⁹ Gunnar T, Ariniemi K, Lillsunde P. Determination of 14 benzodiazepines and hydroxy metabolites, zaleplon and zolpidem as tert-butyltrimethylsilyl derivatives compared with other common silylating reagents in whole blood by gas chromatography-mass spectrometry. J. Chromatogr. B: Analyt. Tech-nol. Biomed. Life Sci., 2005; 818: 175–189.

³⁰ <http://www.teknokroma.es/UserFiles/Filtracion/682.pdf> (07/03/2018)

³¹ http://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/alimento/TemaJS-AISA.pdf (07/03/2018)

Ilustración 2: Esquema SPE.³²

Podemos encontrar varios ejemplos donde se emplea la SPE como tratamiento previo a una técnica de detección.

- Se trató 1 mL de sangre con una solución de fosfato para obtener un pH 6 que posteriormente se basicifica empleando una disolución del 25% en amoníaco. Posteriormente se emplea un cartucho Bond Elut Certify y como eluyentes cloroformo-isopropanol-amoniaco concentrado (69:29:2/ v:v:v), obteniendo una recuperación entre 47-110% que es seguida de una técnica HPLC-PDA-MS.³³
- Se disuelven 0.5 mL de sangre con agua y se centrifuga. Se realiza la extracción empleando Oasis HLB y se extrae con metanol consiguiendo una recuperación entre 70.3-85.3% que será determinada empleando UPLC-MS/MS.³⁴
- Se acidifica una muestra de 0.1 mL de sangre con ácido acético hasta un pH = 5, posteriormente se emplea sulfato de magnesio anhidrido como adsorbente y una mezcla de NaCl/ACN con 0.2% de ácido acético obteniendo una recuperación entre 74-82%. Finalmente se realiza una GC-(EI)-MS o una LC-MS.³⁵
- Se basicifican 0.1 mL de sangre a pH = 9 con un buffer de hidrofosfato. Se extrae empleando ChemElut/acetato de n-butiloMTBSTFA obteniendo una recuperación entre 88.8-97.9% para finalmente anilazar el analito mediante GC-NICI-MS.³⁶

Técnicas de cromatografía líquida:

La cromatografía líquida es una técnica que se utiliza para separar los componentes de una muestra. Esta separación se basa en las interacciones que ocurren entre la muestra con la fase estacionaria y móvil. La fase móvil actúa de portador de la muestra, siendo los analitos que se quieren separar compuestos orgánicos semivolátiles.

La muestra en solución es inyectada en la fase móvil, de esta forma los componentes de la colusión emigran mediante interacciones químicas no covalentes. Los diferentes detectores que se pueden emplear dependerán de los compuestos que se quieran determinar.³⁷

Destacan:

³² Fuente: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422011000900021> (22/05/2018)

³³ Dussy F E, Hamberg C, Briellmann A T. Quantification of benzodiazepines in whole blood and serum. *Int. J. Leg. Med.*, 2006; 120: 323–330.

³⁴ Proenc P, Franco J M, Mustra C, Monteiro C, Costa J, F. Corte-Real, D.N.Vieira. UPLC–MS/MS determination in blood of a mixed-drug fatal intoxication: a case report. *Forensic Sci. Int.*, 2013; 227: 85–89.

³⁵ Matsuta S, Nakanishi K, Miki A, Zaitu K, Shima N, Kamata T, Nishioka H, Katagi M, Tatsuno M, Tsuboi K, Tsuchihashi H, Suzuki K. Development of a simple one-pot extraction method for various drugs and metabolites of forensic interest in blood by modifying the QuEChERS method. *Forensic Sci. Int.*, 2013; 232: 40–45.

³⁶ Gunnar T, Ariniemi K, Lillsunde P. Fast gas chromatography–negative-ion chemical ionization mass spectrometry with microscale volume sample preparation for the determination of benzodiazepines and alpha-hydroxy metabolites, zaleplon and zopiclone in whole blood. *J. Mass Spectrom.*, 2006; 41: 741–754.

³⁷ <http://www.ucm.es/data/cont/docs/650-2013-12-02-gases%20%C3%ADquidos.pdf> (07/03/2018)

HPLC-DAD (UV)

Se trata de una cromatografía líquida de alta resolución. Es una técnica de gran sensibilidad y se emplea para compuestos orgánicos termolábiles. La muestra es inyectada en un sistema, compuesto de una columna que atraviesa gracias a un flujo controlado de un eluyente líquido o mezclas de eluyentes. Los compuestos de la muestra son separados a lo largo de esta columna y son revelados en el espectrofotómetro UV-Visible en serie con un detector de diodos.

Estos análisis proporcionan un perfil molecular detallado de compuestos orgánicos, que vienen identificados mediante una comparación con compuestos estándar o con otro obtenido del análisis de un material de referencia.³⁸

Hay varios artículos donde describen el uso de esta técnica para determinar benzodiazepinas en plasma, suero, orina o humor vítreo, pero no se han encontrado referencias al uso de esta técnica para muestras de sangre. Por ello se describe un ejemplo de la determinación de Lorazepam en plasma de niños.

- Se desarrolló esta técnica empleando oxazepam (OZP) como estándar interno. La separación cromatográfica se llevó a cabo con una columna cromatográfica Synergy Max RP de fase invertida (150 mm × 4.6 mm; tamaño de partícula de 4 µm), una fase móvil acuosa (buffer de dihidrógeno ortofosfato de potasio 10 mM (pH = 2.4) - acetonitrilo (65 : 35%; v:v) con elución isocrática y un flujo de 2.5 mL·min⁻¹. Las calibraciones presentaron un intervalo lineal de 10 a 300 ng, con un límite de detección de 2.5 ng·mL⁻¹ y un límite de cuantificación de 10 ng·mL⁻¹ para muestras de 0.5 mL. Las desviaciones estándar relativas dentro del mismo ensayo (R.S.D.) fueron de 6.6-9.8%, mientras que en diferentes ensayos resultó de 7.7-15.9%, resultando ser un método simple, sensible, selectivo y reproducible.³⁹

LC-MS (y MS/MS)

Es una técnica que ha ganado mucha importancia en los últimos años en muchos campos analíticos, sobre todo en la toxicología y en las ciencias forenses. Esto es debido a los avances tecnológicos así como al descenso de los costes.

Se emplea para el análisis de sustancias polares de alto peso molecular y de sustancias termolábiles, sin necesidad de procesos de derivatización previo.⁴⁰ Combina el poder de separación de los materiales de la HPLC y la capacidad de detección selectiva y de identificación molecular del espectrómetro de masas.⁴¹

Proporciona unos resultados de gran sensibilidad, especificidad, precisión y exactitud, difíciles de cumplir con otras técnicas. Es una técnica imprescindible cuando se quieren determinar pequeñas concentraciones de sustancias evitando los procesos de derivatización, reduciendo costes y tiempo.⁴²

Lo más complejo de esta técnica es el acoplamiento de MS con LC, ya que mientras la cromatografía líquida usa altas presiones para separar la fase líquida y produce una alta carga de gas, la espectroscopía de masas trabaja en el vacío y con una carga de gas limitada. A mayores, la LC trabaja alrededor de la temperatura ambiente y con buffers inorgánicos, mientras que MS trabaja a elevadas temperaturas y prefiere los buffers volátiles. Después de muchos años, han mejorado la instrumentación, desarrollando instrumentos más complejos y robustos.⁴³ En el punto donde las fases móviles abandonan la columna, la muestra líquida es convertida en microgotas que se evaporan liberando moléculas de analito ionizadas, que a continuación entran en el espectrómetro de masas donde se separan en función de su masa y su carga.

³⁸ <http://www.scich.it/prin07/schede/07.pdf> (08/03/2018)

³⁹ Muchohi S N, Obiero K, Kokwaro G O, Ogutu B R, Githiga I M, Edwards G, Newton C R. Determination of lorazepam in plasma from children by high-performance liquid chromatography with UV detection. *J. Chromatogr. B: Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2005; 824: 333–340.

⁴⁰ Hoja H, Marquet P, Verneuil B, Lotfi H, Penicaut B, Lachatre G. Applications of liquid chromatography-mass spectrometry in analytical toxicology: a review. *J Anal Toxicol.*, 1997; 21(2): 116-126.

⁴¹ <http://www.carbueros.com/industries/Analytical-Laboratories/analytical-lab-applications/product-list/liquid-chromatography-with-mass-spectrometer-lc-ms-analytical-laboratories.aspx?itemId=BA1AEFB4DC584D8495B390A4877D0387> (07/03/2018)

⁴² Quintela O, Cruz A, Concheiro M, De Castro A, López-Rivadulla M. Metodología LC-MS. Aspectos generales de la técnica y sus aplicaciones en el campo de la toxicología. *Revista de Toxicología*, 2005; 22: 7-14.

⁴³ <https://www.agilent.com/cs/library/support/documents/a05296.pdf> (07/03/2018)

Se han realizado varios estudios donde se determina el contenido de benzodiazepinas (entre las cuales encontramos el Lorazepam) en muestras de sangre. Algunos ejemplos empleando LC-MS:

- Se llevó a cabo una determinación rápida de benzodiazepinas mediante una separación cromatográfica empleando una columna Chromolith Performance RP-18e (100 mm × 4.6 mm) de sílice monolítica. Se utilizó una fase móvil compuesta por formiato de amonio 5 mM con ácido fórmico (pH = 3) y ACN (65:35/ v:v) mediante elución isocrática y con un flujo de 1.5 mL·min⁻¹. Con estas condiciones obtuvieron un límite de cuantificación de 2.5-5 ngL·mL⁻¹ y una precisión dentro del mismo ensayo del 15%.⁴⁴

- En otro estudio se llevó a cabo la separación con una columna cromatográfica Restek Allure C18 (150 mm × 3.2 mm; tamaño de partícula de 5 µm), con un flujo de 0.45 ngL·mL⁻¹ y elución en gradiente. Como fase móvil se utilizó una mezcla de acetato de amonio 5 mM (pH = 4.75), ACN y metanol. Con estas condiciones se obtuvo un límite de detección menor de 1 ngL·mL⁻¹ un límite de cuantificación de 10 ngL·mL⁻¹, con una desviación estándar relativa dentro del mismo ensayo de 15-50 % y en diferentes ensayos menor de 3000%.³³

Algunos ejemplos empleando LC-MS/MS:

- Se desarrolló y validó un método para la determinación de benzodiazepinas en muestras de sangre post-mortem, donde se separaron los analitos empleando una columna Acquity UPLC BEH C18 (100 mm × 2.1 mm; tamaño de partícula de 1.7 µm), con un flujo de 0.6 ngL·mL⁻¹ y con elución en gradiente. Como fase móvil se utilizó ACN y un buffer de acetato de amonio (pH = 5). Con estas condiciones se obtuvo un límite de detección menor de 0.005-3 nM un límite de cuantificación de 0.6-0.75 nM, un coeficiente de variación entre 2-19%, y una recuperación analítica de 71-96%. Después de varios años siguiendo la rutina demostró ser muy robusta con buenos resultados para las muestras de calidad externa.⁴⁵

- Otro estudio desarrolló un método de cuantificación simultánea de 26 benzodiazepinas empleando una columna XTerra MS C18 (150 mm × 2.1 mm; tamaño de partícula de 3.5 µm) y se eluyeron los metabolitos empleando una mezcla de metanol y buffer de ácido fórmico 0.1% con elución en gradiente y un flujo de 0.2 ngL·mL⁻¹. El límite de cuantificación para todas las benzodiazepinas variaron de 1-2 pg·mg⁻¹. La curva de calibración resultó lineal desde el límite de cuantificación hasta 200 ng·mL⁻¹ de sangre. Se calculó el coeficiente de variación siendo este menor del 20% en casi todos los casos.⁴⁶

Técnicas de cromatografía de gases

Al igual que la cromatografía líquida, la de gases se emplea para separar los compuestos de una muestra. La característica de esta técnica es la naturaleza de la fase móvil: un gas. Los analitos que se determinan con esta técnica son compuestos orgánicos volátiles estables térmicamente. Generalmente esta técnica está restringida a compuestos de bajo peso molecular y a una temperatura máxima de 400°C.

La muestra es volatilizada e introducida en la columna cromatográfica mediante una corriente de gas inerte a elevada temperatura. La elución se produce por el flujo de una fase móvil (el gas inerte) que no interacciona con los analitos (ilustración 3). Los componentes de la muestra se separan por medio de un mecanismo de partición, adsorción o una mezcla de ambos.⁴⁷

⁴⁴ A. Bugey, C. Staub, Application of monolithic supports to online extraction and LC-MS analysis of benzodiazepines in whole blood samples, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 2967-2978.

⁴⁵ E.N. Sauve, M. Langødegård, D. Ekeberg, A.M. Øiestad, Determination of benzodiazepines in ante-mortem and post-mortem whole blood by solid-supported liquid-liquid extraction and UPLC-MS/MS, *J. Chromatogr. B: Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2012, 883-884:177-188.

⁴⁶ Laloup M, Ramirez Fernandez M D M, De Boeck G, Wood M, Maes V, Samyn N. Validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of 26 benzodiazepines and metabolites, zolpidem and zopiclone, in blood, urine, and hair. *J. Anal. Toxicol.*, 2005; 29: 616-626.

⁴⁷ http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/cromatografia_de_gases.pdf (07/03/2018)

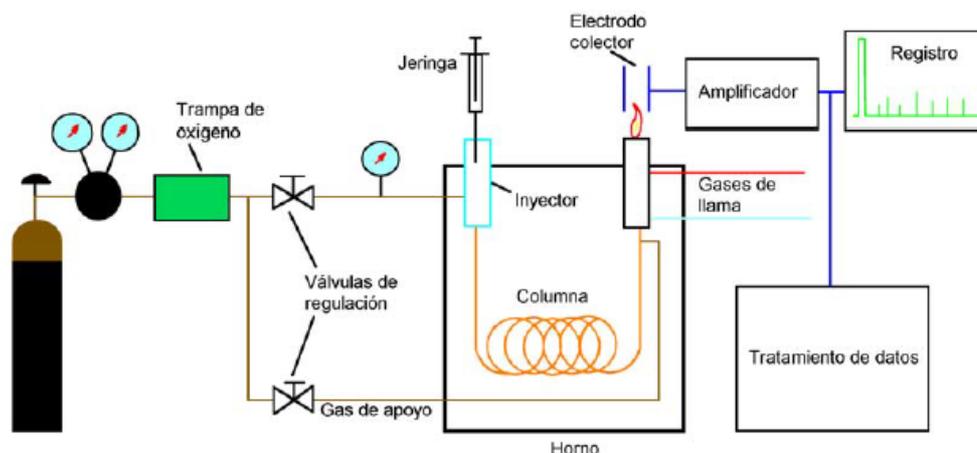


Ilustración 3: Esquema cromatografía de gases.⁴⁸

Con respecto a la cromatografía líquida, la de gases presenta detectores más universales, los métodos e instrumentación son más simples, rápidos y sensibles. Sin embargo la influencia de la temperatura sobre la distribución del equilibrio es más importante que en la de líquidos, presentando ciertas limitaciones con compuestos pocos volátiles (y gran peso molecular), compuestos sensibles a una elevación de la temperatura y compuestos iónicos. Por esta razón cuando se trata de compuestos volátiles o semivolátiles y térmicamente estables a temperaturas hasta 350 – 400°C, se emplea la cromatografía de gases, pero cuando los compuestos a analizar son poco volátiles y/o termolábiles se emplea la cromatografía de líquidos.⁴⁹

Se han realizado varios estudios donde se emplea esta técnica analítica con diferentes detectores para la determinación de benzodiazepinas en sangre:

GC-(EI)-MS

Es una combinación de la cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas mediante impacto electrónico. Mediante un bombardeo de electrones se consigue la obtención de los iones de las moléculas orgánicas en fase gaseosa que se separan de acuerdo con su relación masa/carga para ser posteriormente detectados por medio de un dispositivo adecuado. Este método de obtención de iones es de los más empleados.⁵⁰ Podemos encontrar varios estudios:

- Para la determinación simultánea de 23 benzodiazepinas de las más usadas, se desarrolló la combinación de GC-MS. Para ello se empleó una columna HP-5MS (30 m × 0.32 mm; tamaño de partícula de 0.25 µm) con un programa de temperaturas de 120°C (1 min)- 295°C (10°C·min⁻¹; se mantiene 5 min). Con estas características se obtuvo un límite de detección de 0.52-58.47 ng·mL⁻¹, y un límite de cuantificación de 1.58-177.2 ng·mL⁻¹. La exactitud y precisión fueron calculadas y resultaron menores de 8.5% y 11.1% respectivamente. Este método resultó muy adecuado para investigaciones forenses y casos clínicos toxicológicos entre otros.⁵¹

- En otro estudio se desarrolló un método rápido, fiable, sensible y cuantitativo para la determinación de 14 benzodiazepinas en muestras de 50 µL de sangre. Para ello se empleó una columna DB-35ms (30 m × 0.32 mm; tamaño de partícula de 0.25 µm), un programa de temperaturas de 120°C (1 min)- 330°C (15°C·min⁻¹; se mantiene 2.80

⁴⁸ Fuente: http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/cromatografia_de_gases.pdf (22/05/2018)

⁴⁹ <http://laboratoriotecnicasinstrumentales.es/analisis-quimicos/cromatografia-de-gases> (07/03/2018)

⁵⁰ http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/espectrometria_de_masas.pdf (07/03/2018)

⁵¹ Papoutsis I I, Athanaselis S A, Nikolaou P D, Pistos C M, Spiliopoulou C A, Maravelias C A. Development and validation of an EI-GC-MS method for the determination of benzodiazepine drugs and their metabolites in blood: applications in clinical and forensic toxicology. J. Pharm. Biomed. Anal., 2010; 52: 609–614.

min). Con estas características se obtuvo un límite de detección de 0.4-10 ng·mL⁻¹, un límite de cuantificación de 5-200 ng·mL⁻¹ y una desviación estándar relativa entorno al 2.4-13.8 %.⁵²

GC-(NICI)-MS

Con este acoplamiento de técnicas mediante ionización química de iones negativos, se registran iones moleculares desprotonados.⁵³ Este proceso de fragmentación de las moléculas mediante una desprotonación de analitos ácidos es de gran interés debido a su mayor sensibilidad de sustancias tóxicas entre otras.^{54,55}

Se han descrito varios procedimientos empleando esta técnica:

- En un estudio aplicaron varios parámetros como el uso de hidrógeno como gas portador, un flujo rápido, unas altas temperaturas, etc. Se determinaron cuantitativamente 18 compuestos de interés de manera sensible en un corto período de tiempo (4.4 min). Emplearon una columna DB-5HT (30 m × 0.32 mm; tamaño de partícula de 0.10 μm), un programa de temperaturas de 180°C (2 min)- 350°C (50°C·min⁻¹) consiguiendo así resultados exactos y reproducibles. Los límites de cuantificación se encuentran entre 1-100 ng·mL⁻¹. Este método permitió el empleo de análisis de bajo coste, de alto rendimiento y de gran fiabilidad con unos tiempos de trabajo bajos.³⁶

- Se propuso otro método sensible y selectivo capaz de cuantificar simultáneamente 18 benzodiazepinas en sangre humana. Se empleó una columna de las mismas características pero con un programa de temperatura de 180°C - 325°C (50°C·min⁻¹; se mantiene 1 min). Con estas características se obtuvo un LOD de 0.24-0.62 ng·mL⁻¹, LOQ de 0.72-1.89 ng·mL⁻¹, la desviación estándar relativa determinada para tres niveles de concentración de control de calidad diferentes fueron menores del 7% y la exactitud dentro del rango de 89.5-110.5 %. Estos resultados demostraron que el método desarrollado es sensible, selectivo y rápido.⁵⁶

b.-Determinación de Benzodiazepinas en orina

b.1- Pretratamiento

El tratamiento de las muestras de orina son similares al de la sangre, así como del plasma, suero y otros fluido biológicos. Por ello en vez de describir de nuevo las mismas técnicas, se mencionan algunos ejemplos:

Extracción líquido-líquido (LLE)

- Se trató 1 mL de muestra con un buffer de carbonato de sodio 0.2M, posteriormente se realizó la extracción con cloruro de butilo como disolvente de elección obteniendo una recuperación de 89.8%. Esta extracción puede seguirse de una técnica analítica como la de pulso catódico de adsorción con voltamperometría de redisolución.⁵⁷

- Con una hidrólisis inicial de 0.1 mL de muestra con β-glucuronidasa a pH = 4.2 (con buffer de acetato), a 56°C durante 1 hora y una posterior adición de hidróxido sódico 1M hasta conseguir un pH = 1 se pudo realizar la extracción empleando éter terc-butílico. Se obtuvo una recuperación media del 88.7 % de Lorazepam sin hidrolizar y una recuperación media de 84.8 % de Lorazepam después de la hidrólisis. Finalmente se realizó una técnica LC-MS/MS.⁵⁸

⁵² GunnarT, Ariniemi K, Lillsunde P. Determination of 14 benzodiazepines and hydroxy metabolites, zaleplon and zolpidem as tert-butyltrimethylsilyl derivatives compared with other common silylating reagents in whole blood by gas chromatography-mass spectrometry. J. Chromatogr. B: Analyt. Technol. Biomed. Life Sci., 2005; 818: 175–189.

⁵³ <http://www.scientiachromatographica.com/files/v2n4/v2n4a3.pdf> (07/03/2018)

⁵⁴ <http://ms-textbook.com/1st/downloads/chap7.pdf> (07/03/2018)

⁵⁵ Aubert C, Rontani J F. Perfluoroalkyl Ketones: Novel Derivatization Products for the Sensitive Determination of Fatty Acids by Gas GC-MS in EI and NICI Modes. Rapid Commun. Mass Spectrom. 2000; 14: 960-966

⁵⁶ Karlonas N, Padarauskas A, Ramanavicius A, Ramanaviciene A. Mixed-mode SPE for a multi-residue analysis of benzodiazepines in whole blood us in rapid GC with negative-ion chemical ionization MS. J. Sep. Sci., 2013; 36: 1437–1445.

⁵⁷ Ghasemi J, Niazi A, Ghorbani R. Determination of trace amounts of lorazepam by adsorptive cathodic differential pulse stripping method in pharmaceutical formulations and biological fluids. Anal. Lett., 2006; 39: 1159–1169.

⁵⁸ Papini O, Bertucci C, Da Cunha S A, Dos Santos N A G, Lanchote V L. Quantitative assay of lorazepam and its metabolite glucuronide by reverse-phase liquid chromatography–tandem mass spectrometry in human plasma and urine samples. J. Pharm. Biomed. Anal., 2006; 40: 389–396.

- Otro estudio ajustó el pH de 1 mL de la muestra con buffer de fosfato y posteriormente realizó la extracción mediante acetato de etilo obteniendo una recuperación de 81-89%. A continuación realizaron una técnica CEC-TOF-MS.⁵⁹
- En otro estudio se realizó el mismo ajuste de pH, una extracción empleando acetato de etilo y se añadió posteriormente una disolución de hidróxido sódico 1 M. A continuación se disolvió el extracto con un 10% de metanol y se mezcló con nanopartículas de oro y MgCl₂ (como agente agregante). Finalmente se analizaron las benzodiazepinas mediante SERS.⁶⁰
- La hidrólisis de 1 mL de muestra con β-glucosidasa con buffer de acetato sódico para mantener el pH = 4.5 a 37°C durante 4 horas seguida de la basificación con carbonato de sodio 1.5 M permitió la extracción con una mezcla de disolventes (cloroformo:isopropanol; 9:1-v:v) para finalmente realizar el método analítico LC-TOF-MS.⁶¹

Extracción en fase sólida (SPE)

- Se procedió con la precipitación de proteínas de 0.1 mL de muestra empleando ACN para realizar una extracción a continuación empleando una columna LC-18 con metanol y ACN (50:50; v:v). Siguiendo este tratamiento se obtuvo una recuperación de 88.7-99.3% para posteriormente emplear HPLC-UV como técnica analítica.⁶²
- En primer lugar se procedió a la hidrólisis de 1 mL de muestra con *Helix pomatia* ajustando el pH a 4.5, con una temperatura de 56°C durante 1.5 horas y posteriormente se basificó la muestra con buffer de carbonato de amonio hasta llegar a un pH = 9.3. Se purificó con la SPE empleando una columna Oasis y usando como eluyentes HLB y metanol para poder proceder al método analítico AP-MALDI-MS (o MS/MS).⁶³
- En otro estudio ajustaron el pH de 2 mL de muestra a 7.4 empleando un buffer Sørensen y a continuación se realizó la extracción empleando una columna Oasis y una mezcla de HLB, diclorometano-isopropanol (75:25; v:v). Con este procedimiento consiguieron una recuperación de 77-110% y posteriormente realizaron LC-MS/MS.⁶⁴

Técnicas de cromatografía líquida

Se han realizado estudios donde utilizan este tipo de cromatografías para determinar benzodiazepinas, entre ellas el Lorazepam. Podemos encontrar un ejemplo donde emplean la HPLC-DAD(UV) y algún ejemplo más donde utilizan la LC-MS/MS.

HPLC-DAD (UV)

Se desarrolló un método nuevo para la determinación simultánea de seis benzodiazepinas a una longitud de onda de detección de 240 nm. La separación se llevó a cabo empleando una columna Kromasil C8 (250 mm × 64 mm; tamaño de partícula 5 μm) empleando como fase móvil una mezcla de acetato de amonio/acetronitrilo/metanol (55:15:30; v:v:v) y un flujo de 1 mL·min⁻¹ con elución en gradiente. Como estándar interno se utilizó la colchicina (4 ng·μL). El método

⁵⁹ Blas M, McCord B R. Determination of trace levels of benzodiazepine in urine using capillary electro-chromatography-time of flight mass spectrometry. *Electrophoresis*, 2008; 29: 2182–2192.

⁶⁰ Doctor E L, McCord B. Comparison of aggregating agents for the surface-enhanced Raman analysis of benzodiazepines. *Analyst*, 2013; 138: 5926–5932.

⁶¹ ElSohly M A, Gul W, Avula B, Murphy T P, Khan I A. Simultaneous analysis of thirty-five benzodiazepines in urine using liquid chromatography–mass spectrometry-time of flight. *J. Anal. Toxicol.*, 2008; 32: 547–561.

⁶² Uddin M N, Samanidou V F, Papadoyannis I N. Development and validation of an HPLC method for the determination of six 1,4-benzodiazepines in pharmaceuticals and human biological fluids. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, 2008; 31: 1258–1282.

⁶³ Salo P K, Vilmunen S, Salomies H, Ketola R A, Kostianen R. Two-dimensional ultra-thin-layer chromatography and atmospheric pressure matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry in bioanalysis. *Anal. Chem.*, 2007; 79: 2101–2108.

⁶⁴ Quintela O, Cruz A, De Castro A, Concheiro M, López-Rivadulla M. Liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry for the determination of nine selected benzodiazepines in human plasma and oral fluid. *J. Chromatogr. B: Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2005; 825: 63–71.

fue lineal para todos los analitos hasta una concentración de $20 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ con límites de detección y cuantificación de $0.08\text{-}1.17 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ y $0.28\text{-}3.91 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ respectivamente, y una desviación estándar relativa de 10% para todas las matrices.⁶⁵

LC-MS/MS

Se siguió el mismo procedimiento descrito para muestras de sangre mencionado en el apartado anterior.⁴⁶

Se desarrolló y validó un método para la determinación en orina de 17 benzodiazepinas simultáneamente. Se realizó la separación de 23 analitos en menos de 8 min empleando una columna Eclipse XDB C18 (50mm× 4.6 mm; tamaño de partícula de $1.8 \mu\text{m}$), una elución en gradiente con un flujo de $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ y una fase móvil compuesta por agua y metanol. Se obtuvo una calibración lineal en un rango de 0.5 a $30 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, el límite de cuantificación varió entre $1.7\text{-}100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, la precisión en un rango de $1.1\text{-}11.8\%$ en función de la concentración, una exactitud de alrededor del 25% para todos los analitos. Demostró ser un método simple, rápido, específico, sensible, resultando ser útil en más de 329 casos forenses.⁶⁶

OTRAS TÉCNICAS

Para este tipo de muestras no se han encontrado ejemplos donde se empleen técnicas de cromatografía de gases para la determinación de benzodiazepinas entre las que se encuentre el Lorazepam, si bien si forma parte de otros medicamentos que en este trabajo no son de interés.

Sin embargo, encontramos otras técnicas relevantes como las que se describen a continuación:

Pulso catódico de adsorción con voltamperometría de redisolución:

Una voltamperometría es un método analítico que basa su funcionamiento en procesos de reducción y oxidación sobre un electrodo de trabajo que tiene lugar por la aplicación de un voltaje.

La voltametría de redisolución es de las más eficientes para análisis de trazas gracias a su gran sensibilidad y selectividad.⁶⁷ Son técnicas compuestas ya que primero hay que precipitar el analito en el electrodo antes del análisis. También son técnicas de gran exactitud gracias a que la acumulación y la determinación se llevan a cabo en el mismo electrodo evitando de esta forma errores sistemáticos por contaminación o evaporación entre otros.⁶⁸

La voltametría de redisolución catódica se emplea para la determinación de aniones (orgánicos e inorgánicos), donde los analitos se van depositando en la superficie del electrodo.

La voltametría de redisolución de adsorción combina la acumulación y determinación voltamperométrica se basa en la adsorción del analito sobre un agente complejante en la superficie del electrodo, lo que la convierte en una técnica interesante en la determinación de especies que en principio no pueden ser determinadas con este tipo de métodos.

En el trabajo que a continuación se describe, proponen un nuevo método para la determinación directa de trazas de Lorazepam en formulaciones farmacéuticas y fluidos biológicos. Combinan los métodos previamente descritos, basándose en la acumulación por adsorción de Lorazepam en un electrodo de gota colgante de mercurio (HDME), seguido de una reducción del compuesto adsorbido mediante un análisis voltamétrico empleando una modulación de pulso diferencial.

Las condiciones optimizadas son de $\text{pH} = 2$ empleando un buffer Britton-Robinson (B-R), un potencial de acumulación de -0.2 V y un tiempo de acumulación de 40 seg. El pico de corriente es proporcional a la concentración del

⁶⁵ Uddin M N, Samanidou V F, Papadoyannis I N. Development and validation of an HPLC method for the determination of benzodiazepines and tricyclic antidepressants in biological fluids after sequential SPE. *J. Sep. Sci.*, 2008; 31: 2358–2370.

⁶⁶ Salomone A, Gerace E, Brizio P, Gennaro M C, Vincenti M. A fast liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for determining benzodiazepines and analogues in urine. Validation and application to real cases of forensic interest. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2011; 56: 582–591.

⁶⁷ Henze G. Introduction to Polarography and Voltammetry. Metrohm, Suiz, 2003.

⁶⁸

<https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099.1/17664/Estudio%20de%20la%20biosorci%C3%B3n%20multimet%C3%A1lica%20con%20raspo%20de%20uva%20mediante%20t%C3%A9cnicas%20voltamperom%C3%A9tricas%20-%20Memoria.pdf> (07/03/2018)

compuesto, y se obtiene una calibración lineal en un intervalo de 0.05-1.15 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, con un límite de detección 19 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ y una desviación estándar relativa de 2.41%.⁵⁷

c.-Determinación de Benzodiazepinas en pelo

En 1995 se fundó la Sociedad de Pruebas de Pelo (SoTH)⁶⁹. Esta sociedad publicó una serie de guías y documentos relacionados con el estudio de drogas y fármacos en el pelo. Este tipo de pruebas es una alternativa, o complementaria, que cada vez son más empleadas en investigaciones toxicológicas. El pelo es una matriz fuerte, estable y se ve menos afectada por adulterantes y da información sobre el consumo a largo plazo de este tipo de sustancias (en función de la longitud del pelo), si bien las muestras de pelo u orina nos permiten la detección de fármacos a corto plazo (24-72h).⁷⁰

Este tipo de muestras también presentan ciertas ventajas, como que es una recolección menos intrusiva, no requiere refrigeración, fácil de almacenar, se puede utilizar pelo de diferentes partes del cuerpo y como ya se mencionaba, permite conocer el consumo varios meses después de haberse realizado. Por ello los análisis de segmentos de pelo son unas estrategias cada vez más útiles en investigaciones toxicológicas en casos de sumisión química.⁷¹

El lavado de las muestras de pelo es necesario antes del análisis con dos objetivos: eliminar posibles productos que pueden interferir con la técnica posterior, y eliminar contaminantes externos que pueden provenir del ambiente. Se pueden lavar con diferentes productos como se comentan a continuación.

c.1- Pretratamiento

Extracción en fase sólida (SPE)

- Inicialmente se descontaminó la muestra (mediante sulfato de sodio dodecil 0.1%, agua destilada y diclorometano), se puso con ultrasonidos durante una hora y se incubó a temperatura ambiente toda la noche en metanol e hidróxido sódico al 25% (20:1; v:v). Para la extracción se empleó una columna Clean Screen (ZSDAU 020), primero se acondicionó con acetato de etilo amoniacal y después diclorometano-isopropanol-hidróxido amónico (78:20:2; v:v:v). Se obtuvo una recuperación analítica entre 55-94%, siendo compatible con una posterior determinación mediante LC-MS/MS.⁷²

Extracción líquido-líquido (LLE)

Se encuentran varios ejemplos donde explican el pretratamiento de muestras de pelo donde se sospecha la presencia de benzodiazepinas, entre ellas Lorazepam. Se describen unos ejemplos de los que posteriormente se describirá la técnica analítica que la sigue.

- Para la realizar el método LC-HRMS la muestra se lava con isooctano, seguido de acetona. Se seca y corta en segmentos de 1-3 cm y se pulveriza en un molino de bolas. Posteriormente se coge una alícuota de 50 mg y se somete a ultrasonidos durante una hora. Finalmente se incubó toda la noche con buffer de fosfato (pH = 8.4) y se realiza la extracción con cloruro de metileno-dietil éter (91:10; v:v) obteniendo una recuperación analítica entre 55.2-120.1%.⁷³

- En un estudio se comparan dos procedimientos de pretratamiento de muestras de pelo. Para la LLE se cogen 20 mg de pelo, se lavan con un disolvente orgánico dos veces (diclorometano y metanol), se secan bajo una corriente de nitrógeno y se cortan en piezas pequeñas. Después se somete a ultrasonidos con buffer de fosfato (pH = 8.4) durante

⁶⁹ <http://www.soh.org/> (07/03/2018)

⁷⁰ Ping Xiang, Min Shen, Olaf H. Drummer. Drug concentrations in hair and their relevance in drug-facilitated crimes. *J Forensic Leg Med.*, 2015; 36: 126-135.

⁷¹ Gail A A, Cooper, Kronstrand R, Kintz P. Society of Hair Testing guidelines for drug testing in hair. *Forensic Sci. Int.*, 2012; 218: 20-24.

⁷² Anderson R A, Ariffin M M, Cormack P A G, Miller E I. Comparison of molecularly imprinted solid-phase extraction (MISPE) with classical solid-phase extraction (SPE) for the detection of benzodiazepines in post-mortem hair samples. *Forensic Sci. Int.*, 2008; 174: 40-46

⁷³ Vogliardi S, Favretto D, Tucci M, Stocchero G, Ferrara S D. Simultaneous LC-HRMS determination of 28 benzodiazepines and metabolites in hair. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011; 400: 51-67.

una hora. Posteriormente se extrae con diclorometano-dietil éter (90:10; v:v) obteniendo una recuperación analítica de 39.4-115.7%.⁷⁴

- En otro estudio extraen los analitos de muestras de 10 mg. Primero cortan el pelo en segmentos de 1 cm, se lavan con isopropanol una vez y dos veces con agua y se secan. Se pulveriza y homogeniza con un molino de bolas y posteriormente se extrae empleando metanol-acetonitrilo-formato amónico (pH = 5.3; 25:25:25; v:v:v). El rango de recuperación se encuentra entre el 70-106% en el 75% de los analitos.⁷⁵

Extracción asistida con microondas:

Se define como el proceso de transferencia de compuestos orgánicos de una fase sólida a una líquida. Este proceso se acelera mediante radiación directa en la región de microondas.⁷⁶ Se trata de una técnica relativamente nueva, que combina la extracción con disolventes tradicionales y el microondas. La extracción se acelera gracias al uso del microondas para calentar los disolventes, presentando grandes ventajas como la disminución de los tiempos de extracción, mayores rangos de extracción, costes menores y el uso de menos cantidad de disolventes.⁷⁷ Esta técnica se ha empleado para extraer compuestos de diversas matrices como plásticos, comida, papel, muestras biológicas, etc., permitiendo la extracción de compuestos termolábiles. El microondas calienta los disolventes mediante un mecanismo dual de conducción iónica y rotación de dipolos.⁷⁸ La muestra se mezcla con el disolvente en un recipiente cerrado y se introduce en el sistema. Este recipiente cerrado es capaz de alcanzar altas temperaturas y altas presiones sin pérdidas de compuestos volátiles y evitando posibles contaminaciones.⁷⁹

Podemos encontrar un ejemplo donde se emplea esta técnica para posteriormente determinar las benzodiazepinas mediante una UHPLC-MS-TOF:

- Se lavan las muestras mediante sulfato dodecil de sodio 0.1%, agua, metanol y agua tres veces, se seca y se corta en trozos de 2 mm y se adiciona una disolución de buffer de borato (pH = 9.5). Posteriormente se extrae empleando acetato de etilo, se calienta a 75°C durante 10 min y con una potencia de 1600 W. Con este pretratamiento se consigue una recuperación de 86.9-93.4%.⁸⁰

Técnicas de cromatografía líquida

LC-HRMS

Hay un método validado para la determinación simultánea y cuantificación de 28 benzodiazepinas y algunos metabolitos en 50 mg de pelo mediante cromatografía líquida seguida por espectroscopía de masas de alta resolución. Este sistema de detección permite la determinación de la masa molecular exacta de los analitos eluidos mediante la HPLC. Posterior al pretratamiento mediante LLE se realizó la separación de los compuestos empleando una columna cromatográfica Luna C18 (150 mm × 1 mm; 5 µL) con elución en gradiente y un flujo de 0.1 mL · min⁻¹. Como estándares internos se utilizaron cuatro análogos deuterados. El límite de detección varió entre 1-10 pg · mg⁻¹, con un rango de linealidad entre 1 y 1000 pg · mg⁻¹ para cada compuesto, un error relativo entre 1-20% y una desviación estándar relativa menor de 15%.

⁷⁴ Morini L, Vignali C, Polla M, Sponta A, Groppi A. Comparison of extraction procedures for benzodiazepines determination in hair by LC-MS/MS. *Forensic Sci. Int.*, 2012; 218: 53–56.

⁷⁵ Montesano C, Johansen S S, Nielsen M K K. Validation of a method for the targeted analysis of 96 drugs in hair by UPLC-MS/MS, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2014; 88: 295–306.

⁷⁶ <http://www.rsc.org/publishing/journals/prospect/ontology.asp?id=CMO:0001608&MSID=C1CP20547A> (07/03/2018)

⁷⁷ Beoletto V G, De las Mercedes Oliva M, Marioli J M, Carezzano M E, Demo M S. Antimicrobial natural products against bacterial biofilms. En: *Antibiotic Resistance*. Editorial Elsevier, 2016, pp. 291-307.

⁷⁸ Smith B L, Carpentier M H. Microwave Technology Series. En: *The Microwave Engineering Handbook*. Editorial Chapman and Hall. Londres, 1993.

⁷⁹ <https://scialert.net/fulltext/?doi=rjmp.2011.21.31> The Microwave Engineering Handbook.

⁸⁰ Wietecha-Posłuszny R, Wozniakiewicz M, Garbacik A, Chesny P, Koscielniak P. Application of microwave irradiation to fast and efficient isolation of benzodiazepines from human hair. *J. Chromatogr. A.*, 2013; 1278: 22–28.

LC-TOF-MS

Se trata de una técnica analítica de cromatografía líquida con espectroscopía de masas con detección de tiempo de vuelo. Se trata de una técnica que permite identificar, caracterizar, cuantificar y perfilar moléculas grandes y pequeñas.⁸¹ Este tipo de instrumentos permiten la determinación precisa de masas desde los 5 ppm, siendo necesarias calibraciones y mantenimientos frecuentes.⁸² Para ello se utiliza un campo eléctrico para acelerar los iones de la muestra al mismo potencial. Los iones avanzan hacia el detector a través de un tubo de “vuelo”, donde el tiempo que pasa el ion en esta región está relacionado con la masa del ion. Las ventajas de esta técnica para análisis de amplio espectro son la resolución, exactitud, sensibilidad y rapidez.⁸³

Un estudio optimizó y validó este método para análisis de muestras de pelo tras la MAE, empleando una columna cromatográfica Hypersil Gold Phenyl (50 mm × 2.1 mm; tamaño de partícula de 1.9 µm), con una fase móvil compuesta por acetonitrilo con ácido fórmico al 0.1% y un buffer de formiato de amonio con elución en gradiente y un flujo de 0.4 mL·min⁻¹. Con estas condiciones se obtuvo un límite de detección en un rango entre 0.003-0.025 ng·mg⁻¹, con un coeficiente de variación en un mismo día de 1.5-4.3% y en ensayos diferentes de 2.3-8.3% y una exactitud del 89.8-105.7%.⁸⁰

LC-MS/MS

- Se desarrolló este método para la determinación simultánea de 26 benzodiazepinas en muestras como sangre, orina y pelo. Posterior a la LLE, se llevó a cabo la separación empleando una columna cromatográfica XTerra MS C18 (150 mm × 2.1 mm; tamaño de partícula de 3.5 µm) y un eluyente compuesto por metanol y buffer de formiato 0.1%. La elución se realizó en gradiente y con un flujo de 0.2 mL·min⁻¹. Para la cuantificación se emplearon 13 análogos deuterados. El límite de cuantificación varió entre 0.5-10 pg·mg⁻¹ y un rango de linealidad hasta 1000 pg·mg⁻¹. El coeficiente de variación en la mayoría de los casos fue menor del 20%.⁴⁶

- Otro estudio comparó la sensibilidad de dos procedimientos de pretratamiento de muestra previos al empleo de LC-MS/MS. Para ello en todos los casos se inyectaron alícuotas de 5 µL en el sistema, unos después del pretratamiento con disolventes orgánicos y otros tras una digestión con metanol en ultrasonidos. Se determinaron 35 compuestos entre benzodiazepinas y sus metabolitos empleando una columna Two Hypersil Gold (100 mm × 2.1 mm; tamaño de partícula 3 µm), una fase móvil compuesta por ácido fórmico 0.1% y acetonitrilo, elución en gradiente y un flujo de 0.2 mL·min⁻¹. Se observó que las muestras que habían sido tratadas previamente alcanzaron unos límites de cuantificación entre 0.1-5 pg·mg⁻¹, permitiendo de esta manera detectar una única dosis del fármaco, sin embargo la sensibilidad obtenida cuando se emplea extracción con metanol simplemente, alcanza un límite de cuantificación entre 1-20 pg·mg⁻¹, siendo suficiente para detectar el fármaco en usos terapéuticos. Concluyeron que la extracción con metanol permite la determinación en casos forenses cuando los rangos esperados de dichas sustancias son altos, pero cuando se dispone de poca cantidad de muestra y se quieren determinar dosis bajas es necesario emplear el pretratamiento previamente explicado (ver página 35).⁷⁴

En otro trabajo se presenta un método de cuantificación y cribado de 96 fármacos entre los que encontramos benzodiazepinas (entre ellas Lorazepam) en el pelo. Después de una extracción en fase líquida, se realiza la separación empleando una columna cromatográfica Acquity UPLC HSS C18 (150 mm × 2.1 mm; tamaño de partícula de 1.8 µm),

⁸¹ [https://www.agilent.com/en/products/mass-spectrometry/lc-ms-instruments/6200-series-accurate-mass-time-of-flight-\(tof\)-lc-ms](https://www.agilent.com/en/products/mass-spectrometry/lc-ms-instruments/6200-series-accurate-mass-time-of-flight-(tof)-lc-ms) (07/03/2018)

⁸² Ferrer I, Thurman E M. Liquid chromatography/ time-of-flight/ mass spectrometry (LC/ToF/MS) for the analysis of emerging contaminants. Trends Anal Chem., 2003; 22: 750–756.

⁸³ Delisha S, Suraj D, Robert C, Wimal P, Susan M, Susan S. Omics Technologies Used in Systems Biology. En: [Systems Biology in Toxicology and Environmental Health](#), 2015, pp. 57-83.

una mezcla de disolventes como fase móvil formada por formiato de amonio 5 mM (pH = 3) y ácido fórmico 0.1% en acetonitrilo, con elución en gradiente y flujo igual a $0.4 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. El límite de detección permitió detectar fármacos en una dosis única gracias a su rango en $\text{pg} \cdot \text{mg}^{-1}$, permitiendo su uso en casos de sumisión química. Se demostró su sensibilidad estudiando muestras certificadas de pelo conteniendo fármacos de abuso.⁷⁵

4.- INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos en las muestras de sangre dieron positivo para Lorazepam dentro de un rango tóxico. El rango terapéutico en sangre de esta sustancia es de 0.01 a $0.24 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, y el rango tóxico es de 0.3 a $0.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$.⁸⁴

El Lorazepam es un fármaco de amplio margen terapéutico, de modo que presenta relativa seguridad al ser administrado a altas dosis. Por ello se determina que la muerte de la menor no fue por sobredosis, pero debido a sus manifestaciones clínicas más frecuentes como la somnolencia, letargia y disminución de los reflejos facilitó su asfixia por parte del/a agresor/a.

En la orina se detectó la presencia de pequeñas cantidades de Lorazepam. Posiblemente esa baja concentración indica que cuando se produjo la muerte, se encontraba en una fase inicial de eliminación del fármaco por vía renal. Con estos datos, y conociendo la hora aproximada de la última comida, permitió orientar sobre la posible hora de la muerte.

Los resultados obtenidos en cabello indicaban la presencia de Lorazepam y Diazepam en el segmento de cabello que abarca desde 1 cm a 4 cm y no se encontró ninguna sustancia en los otros dos segmentos analizados. Esto significa que la víctima en los últimos meses antes del suceso estuvo consumiendo repetidamente las dos sustancias, si bien no se puede saber la cantidad exacta ni las fechas concretas.

5.- CONCLUSIONES

A lo largo de este trabajo se han descrito distintas técnicas analíticas, así como una gran variedad de ejemplos de análisis que se pueden llevar a cabo para la determinación de benzodiazepinas en muestras biológicas.

Es probable que estos análisis toxicológicos hayan sido empleados por los centros de investigación pertinentes para el caso práctico descrito en este trabajo.

Los resultados obtenidos fueron positivos para benzodiazepinas, más concretamente Lorazepam, tanto en sangre como en orina, siendo mayor el contenido en sangre. La concentración encontrada superaba el rango de toxicidad, siendo esto un agravante en el proceso judicial.

Conociendo la hora aproximada de la última comida de la menor, el contenido gástrico encontrado en el cadáver, la concentración del fármaco en orina y en sangre, se puede realizar una aproximación de la hora de la muerte.

A mayores, la confirmación de presencia de Lorazepam en el pelo, demostró que la menor había sido drogada a lo largo de varios meses previos a su muerte. Este hecho resultó clave para determinar el veredicto de culpabilidad.

⁸⁴ Schulz M, Schmoltdt A. Therapeutic and toxic blood concentrations of more than 800 drugs and other xenobiotics. Pharmazie, 2003; 58: 447-474.