



La justicia
es de todos

Minjusticia



OBSERVATORIO DE DROGAS
DE COLOMBIA

ESTUDIO DE ANÁLISIS DE DROGAS DE ABUSO EN AGUAS RESIDUALES EN TRES CIUDADES EN COLOMBIA-2020

POR:

MILTON ROSERO MOREANO

UNIVERSIDAD DE CALDAS

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN CROMATOGRAFÍA Y TÉCNICAS AFINES - GICTA



ESTUDIO DE ANÁLISIS DE DROGAS DE ABUSO EN AGUAS RESIDUALES EN TRES CIUDADES EN COLOMBIA-2020

ESTUDIO DE ANÁLISIS DE AGUAS RESIDUALES EN 3 CIUDADES DE
COLOMBIA

UNIVERSIDAD DE CALDAS
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN CROMATOGRAFÍA Y TÉCNICAS AFINES - GICTA
MANIZALES 2021

Las siguientes instituciones y profesionales contribuyeron a la realización del “*Estudio de Análisis de Drogas de Abuso en Aguas Residuales en tres ciudades de Colombia*”.

Ministerio de Justicia y del Derecho

Wilson Ruiz Orejuela

Ministro de Justicia y del Derecho

Diana Abaunza Millares

Viceministra de Política Criminal y Justicia Restaurativa

Andrés Orlando Peña Andrade

Director de Política de Drogas y Actividades Relacionadas

Jorge Hernán Valencia García

Subdirector Estratégico y de Análisis

Equipo investigador

Gonzalo Barreto Núñez

Profesional Subdirección Estratégica y de Análisis

Isaac Urrutia Bermúdez

Profesional Subdirección Estratégica y de Análisis

Jenny Fagua Duarte

Profesional Dirección de Política de Drogas y Actividades Relacionadas

Universidad de Caldas

Milton Rosero Moreano

CEO Spin-off Clay Solutions & Services S.A.S.

Gonzalo Taborda Ocampo

Jefe Oficina de Investigaciones

Jhon Alexander Fiscal Ladino

Coordinador de Laboratorio GICTA

Andrés Baena Pedroza

Analista de Laboratorio GICTA

Martín Posada Lotero

Auxiliar de Laboratorio GICTA

Este estudio se realizó en el marco del Convenio Interadministrativo Número 0419 de 2020 entre el Ministerio de Justicia y del Derecho y la Universidad de Caldas

TABLA DE CONTENIDO

LISTADO DE FIGURAS	7
LISTADO DE TABLAS	7
LISTA DE ACRÓNIMOS.....	9
1. INTRODUCCIÓN.....	12
2. OBJETIVOS.....	16
OBJETIVO GENERAL:.....	16
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3. MARCO TEÓRICO.....	17
3.1. Drogas de abuso.....	17
3.2. La epidemiología basada en las aguas residuales WBE.....	17
3.3. Estrategias de análisis mediante espectrometría de masas	18
3.4. Análisis guiado HRMS	19
3.5. Muestreo y Preparación de Muestras.....	19
3.6. Monitoreo	20
3.7. Biomarcadores y productos de transformación	21
3.8. Parámetros analíticos relevantes y control de calidad	21
3.9. Perspectivas y tendencias	22
3.10. Mejores prácticas.....	22
4. DISEÑO METODOLÓGICO DE LA INVESTIGACIÓN	23
4.1. Protocolo de recolección y tratamiento muestras.....	23
4.1.1. Toma de la muestra	23
4.1.1.1. Materiales	23
4.1.1.2. Procedimiento.....	23
4.2. Análisis en el laboratorio.....	24
4.2.1. Materiales	24
4.2.2. Equipos.....	24
4.2.3. Procedimiento de la extracción.....	24
4.2.4. Derivatización	25
4.2.5. Preparación de estándares de calibración.....	26
4.3. Análisis Cromatográfico	27
4.3.1. Análisis Cromatográfico GC-MS en la Ucaldas laboratorio GICTA.....	27
4.3.2. Análisis Cromatográfico LC-MS en la UIS laboratorio CROM-MASS	27

4.3.3. Recipientes de muestreo	28
4.3.4. Muestreo y Preparación de Muestras	28
4.3.5. Monitoreo	28
4.3.6. Procesamiento de los datos.....	28
4.4. Procesamiento de resultados cromatográficos: [86]	30
5. VALIDACIÓN METODOLOGÍAS ANALÍTICAS.....	31
6. RESULTADOS	32
6.1. Análisis cualitativo por GC-MS.....	32
6.1.1. Análisis de resultados de las muestras por sustancias y ciudades	32
6.2. Análisis Cuantitativo por LC-MS	37
6.3 Cromatogramas muestras:	44
6.3.1 Análisis cualitativo por GC-MS	44
6.3.2 Análisis cuantitativo por LC-MS	44
6.4. Estimaciones de indicadores de consumo	44
6.4.1. Resultados PTAR Armenia	45
6.4.2. Resultados COLECTOR Pereira	47
6.4.3. Resultados PTAR Hospital Santa Sofia Manizales	50
6.4.4 Comparación en el tiempo de valores de cargas normalizadas de BE y CO en los tres sitios de estudio.....	54
6.4.5 Comparativo consumo de cocaína en el mundo y el Eje Cafetero.....	55
7.RUTAS METABÓLICAS DE LAS DROGAS PSICOACTIVAS DE INTERÉS.....	55
7.1. Rutas metabólicas de la cocaína.....	55
7.2. Rutas metabólicas del cannabis (figura 13)	62
7.3. Rutas metabólicas de las benzodiazepinas (figura 14)	71
7.4. Rutas metabólicas de la heroína (figura 15)	90
8.RETOS	93
9.CONCLUSIONES.....	94
10.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Sistema de extracción por desorción con disco rotatorio RDSE.....	20
Figura 2. Sitio de estudio e investigación grupo GICTA PTAR Hospital.....	21
Figura 3. Procedimiento de montaje de RDSE.	25
Figura 4. Diagrama de flujo proceso de extracción de drogas psicoactivas con RDSE.....	27
Figura 5. Muestra puntual de PTAR La Marina Armenia (AP0034R).....	36
Figura 6. Muestra puntual de PTAR La Marina Armenia (AP0035R).....	36
Figura 7. Muestra puntual de PTAR Hospital Santa Sofía Manizales (AP0024R).....	36
Figura 8. Muestra compuesta de colector de gruesos Santa Marta Pereira (PC002).	37
Figura 9. Cargas normalizadas (mg/día/1000 hab) de benzoilecgonina BE y cocaína CO en los tres sitios de muestreo durante dos meses consecutivos.	55
Figura 10. Transformación metabólica de la cocaína en presencia de etanol. Fuente: [103]	61
Figura 11. Metabolismo de la cocaína. Fuente: [98].....	62
Figura 12. Subproducto de la pirolisis de la cocaína. Fuente:[99].....	63
Figura 13. Ruta del metabolismo de los cannabinoides.....	71
Figura 14. Metabolismo de eliminación de las benzodiazepinas. Fuente [137-151].....	91
Figura 15. Metabolismo de la heroína. Fuente: [153-159].....	92

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Lotes de análisis por GC-MS discriminados por número de muestras y sitios de muestreo.	32
Tabla 2. Tipos de muestra recolectados diferenciados por sitios de muestreo y número de muestras.....	33
Tabla 3. Relación de sustancias psicoactivas identificadas, fuentes y rol y frecuencia de muestras en las que se han hallado los analitos objeto del estudio.	34
Tabla 4. Acrónimos, niveles mínimos de cuantificación (NMC=2NMD), y tiempos de retención de las sustancias de referencia, analizadas por UHPLC-ESI+-Orbitrap-MS.	37
Tabla 5. Tiempos de retención (t_R) y cuantificación de drogas de abuso analizadas por UHPLC-ESI+-Orbitrap-MS en las muestras entregadas por la UNIVERSIDAD DE CALDAS.	39
Tabla 6. Cargas máxicas (mg/día) de las sustancias y metabolitos de estudio en el sitio Armenia.	45
Tabla 7. Cargas máxicas normalizadas (mg/día/1000 habitantes) para las sustancias y metabolitos CO, BE y THC-A del sitio Armenia.	46
Tabla 8. Retrocalculos de estimación de consumo de cocaína a partir de la carga normalizada de BE (mg/día /1000 habitantes) para el sitio de Armenia.....	47
Tabla 9. Cargas máxicas (mg/día) de las sustancias y metabolitos de estudio en el sitio Pereira.....	48

Tabla 10. Cargas máxicas normalizadas (mg/día/1000 habitantes) para las sustancias y metabolitos CO, BE y THC-A del sitio Pereira.....	49
Tabla 11. Retroculos de estimación de consumo de cocaína a partir de la carga normalizada de BE (mg/día /1000 habitantes) para el sitio de Pereira.....	50
Tabla 12. Cargas máxicas (mg/día) de las sustancias y metabolitos de estudio en el sitio PTAR hospital en Manizales.	51
Tabla 13. Cargas máxicas normalizadas (mg/día/1000 habitantes) para las sustancias y metabolitos CO, BE y THC-A del sitio PTAR hospital en Manizales.	52
Tabla 14. Retroculos de estimación de consumo de cocaína a partir de la carga normalizada de BE (mg/día /1000 habitantes) para el sitio de la planta de tratamiento de aguas residuales de hospital en Manizales.....	54
Tabla 15. Subproductos metabólicos de la cocaína reportados.	58
Tabla 16. Cannabinoides estudiados por LC/MS/MS.....	64
Tabla 17. Benzodicepinas estudiadas por LC/MS/MS.....	73
Tabla 18. Metabolitos producto de la eliminación de la morfina.	93

LISTA DE ACRÓNIMOS

6-MAM: 6-Monoacetilmorfina

APINACA: N-(1-adamantyl)-1-(5-pentyl)-1H-indazole-3-carboxamide

ARP: Aseguradora de Riesgos Profesionales

BE: Compuesto benzoilecgonina

C18: Fase estacionaria de octadecilsiloxano

CBD: Cannabidiol

CBD-A: Ácido canabidiólico

CBN: Canabinol

CE: Cromatografía de electroforesis capilar

CO: Compuesto cocaína

DOB: 2,5-dimethoxy-4-bromamphetamine

DOC: 4-Chloro-2,5-dimethoxyamphetamine

DVB/PDMS: Fase polimérica para SPME de divinil benceno y polidimetilsiloxano

EI: Modo de ionización por impacto electrónico

EIC: Modo de adquisición por extracción de corrientes iónicas

EMA: European Medicines Agency

EPA: Agencia de Protección Medioambiental de los Estados Unidos

EPP: Elementos de Protección Personal

EPS: Entidad Promotora de Salud

FE: Fenacetina

GC-MS: Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

GICTA: Grupo de Investigación en Cromatografía y Técnicas Afines

HESI: Ionización por electrospray calentada

HRMS: Espectrometría de masas de alta resolución

ID: Diámetro interno

IDB: Illicit Drug Biomarkers

ISTD o IS: Estándar interno

LC-ESI-MS: Cromatografía de líquidos con ionización por electrospray y acoplada a espectrometría de masas

LC-MS/MS: Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas tandem

LC-MS: Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas

LE: Levamisol

LOD: Límite de detección

LOQ: Límite de cuantificación

LSD: Lysergic Acid Diethylamide

MDMA: Methylenedioxyamphetamine

MEC: Methylethcathinone

MePHP: 4-methyl- α -pyrrolidinohexaphenone

MJD: Ministerio de Justicia y el Derecho

MSTFA: N-metil-N- (trimetilsilil) trifluoroacetamida

NBOMe: N-methoxybenzyl-methoxyphenylethylamine

NIST: The National Institute of Standards and Technology

NMC: Nivel Mínimo de Cuantificación

NMD: Nivel Mínimo de Detección

NSP: Nuevas Sustancias Psicoactivas

ODC: Observatorio de Drogas de Colombia

ODS: Objetivos de Desarrollo Sostenible

PCB77: Compuestos bifenilo policlorado 77

PMA: Paramethoxyamphetamine

PTAR: Planta de Tratamiento de Aguas Residuales

PVP: Pyrrolidinopentiophenone

QC: Control de calidad

QTOF: Sistema de filtro de masas tándem (cuadrupolo-tiempo de vuelo)

QuEChERS: Quick, Easy, Cheaper, Efficient, Robustness and Safe

RDSE: Extracción por sorción con disco rotatorio

RSD: Desviación estándar relativa

SANCO: Guidance Documents on Aquatic and Terrestrial Ecotoxicology

SANTE: Dirección General de Salud y Seguridad Alimentaria Comisión Europea

SCORE: Sewage analysis CORE group Europe

SPE: Extracción en fase sólida

SPME: Microextracción en fase sólida

TCS-d3: Compuesto triclosán deuterado

TFMPP: 1-(3-trifluoromethylphenyl)piperazine

THC: Tetrahidrocanabinol

THC-A: Ácido tetrahidrocanabinólico

THC-COOH: Ácido carboxílico del tetrahidrocanabinol

TOF: Filtro de masas de tiempo de vuelo

UHPLC: Cromatógrafo de líquidos de ultra-alta eficiencia

UIS: Universidad Industrial de Santander

UNODC: United Nations Office on Drugs and Crime

WBE: Wastewater Based on Epidemiology

1. INTRODUCCIÓN

El metabolismo urbano se refiere a la evaluación de la cantidad de recursos producidos y consumidos por los ecosistemas urbanos. Que se ha convertido en una herramienta importante para entender cómo el desarrollo de una ciudad causa impactos al entorno local y regional, para apoyar una mayor planificación y un desarrollo urbano más sostenible. Investigadores en Brasil midieron los cambios ocurridos en el uso de materiales y energía en la ciudad de Curitiba (Brasil) entre los años 2000 y 2010. Los resultados revelan unas mejores condiciones de vida y mayores beneficios socioeconómicos derivados de un mayor rendimiento de esos recursos, pero sin descuido total a las cuestiones ambientales. Con una ingesta de alimentos, consumo de agua y emisiones al aire en niveles similares, observándose unos incrementos en el uso de energía, materiales de construcción y residuos reciclados. Esto explica que parece más adecuado evaluar la contribución de una ciudad a la sostenibilidad que medir si una sola ciudad es sostenible o no [1-4].

Hoy en día es habitual husmear en las alcantarillas y el material particulado de las grandes ciudades para establecer la conexidad entre el consumo de drogas ilícitas en esas metrópolis y su impacto en las matrices ambientales [5-6], y luego viene la sugestiva pregunta sobre, si la ocurrencia de estos compuestos en el ambiente se constituye en una "gran adversidad" emergente o tal vez es una herramienta para investigar la incidencia social de las drogas y el comportamiento del mercado en las grandes ciudades?.

Los estudios recientes claramente reafirman las fortalezas conceptuales del análisis de biomarcadores (metabolitos) en aguas residuales para producir datos objetivos y actualizados sobre el uso de drogas ilícitas y su mercado a escala local, nacional e internacional [6]. Por otro lado la epidemiología basada en aguas residuales (WBE de su acrónimo en inglés) se basa en el principio de que los rastros de compuestos, a los que una población está expuesta o consume, se excretan sin cambios o como metabolitos en la orina, el aliento, el sudor, la transpiración y/o las heces, y en última instancia terminan en la red de alcantarillado [7] o en el aire ambiente [5] y pueden proporcionar información cualitativa o cuantitativa importante sobre la actividad de los habitantes dentro de una captación de aguas residuales determinada [8].

La epidemiología basada en las aguas residuales WBE es una disciplina científica en rápido desarrollo con el potencial de monitorear casi en tiempo real las tendencias a nivel de población en el uso de drogas ilícitas. Al tomar muestras de una fuente conocida de aguas residuales, como un afluente de una planta de tratamiento de aguas residuales, los científicos pueden estimar la cantidad de drogas utilizadas en una comunidad a partir de los niveles medidos de drogas ilícitas y sus metabolitos excretados en la orina. En 2011, fue aplicado por primera vez este método de recopilación de datos sobre el uso de estimulantes por las poblaciones urbanas utilizando un protocolo de muestreo común por un grupo internacional de científicos, el grupo SCORE (Sewage analysis CORE group Europe, <http://score-network.UK/>). Desde entonces, SCORE ha recopilado datos cada año con un número cada vez mayor de ciudades participantes, incluidas las de fuera de Europa [9].

El análisis químico de los residuos de drogas ilícitas en las aguas residuales no tratadas es una herramienta valiosa para complementar los enfoques existentes para monitorear los patrones espacio-temporales y las tendencias del consumo de drogas ilícitas en grandes comunidades [10].

Este proyecto de investigación se perfila como una radiografía social (epidemiología basada en metabolitos de la ciudad en sus componentes agua) que aportará información valiosa de diagnóstico, para entender las dinámicas de las ciudades del Eje Cafetero frente al consumo de drogas ilícitas, y proceder a establecer políticas públicas de control de consumo encaminadas a mejorar la seguridad de las mismas, su conciliación entre salud mental de la población y la avanzada descomunal de oferta de drogas y mejorar la planeación y convertir esos pequeños centros poblados en sitios más amables y seguros.

El enfoque conceptual del proyecto de investigación fue metabolómico (estudio y búsqueda de marcadores o biomarcadores, rutas y mapas bioquímicos de los compuestos congéneres (drogas ilícitas), sus metabolitos y productos de transformación) compuestos que se excretan o no se metabolizan, y que triangulando toda la información recopilada permitió hacer diagnósticos más cerrados de los comportamientos de las ciudades y sus habitantes frente al consumo de drogas de abuso, mediante el monitoreo de: drogas lícitas e ilícitas (primera etapa), productos farmacéuticos y de cuidado personal, marcadores de tamaño de población, productos químicos industriales, marcadores de stress, alimentos y dieta así como marcadores biológicos en sus matrices ambientales agua y aire usando la tecnologías desarrollada por el grupo GICTA frente al monitoreo, preparación de muestras y análisis químico.

En la actualidad en el campo de los estudios de consumo de sustancias psicoactivas se están desarrollando importantes avances derivados de la aplicación de la innovación tecnológica y científica, que han permitido a través de metodologías novedosas apoyar el conocimiento del consumo de sustancias psicoactivas en la población. En este contexto, el análisis de los residuos de las drogas determinados en las aguas residuales urbanas puede proporcionar información valiosa acerca del consumo de drogas en una población y puede servir como una herramienta complementaria a otros indicadores epidemiológicos.

En este sentido, el análisis de aguas residuales para la determinación de sustancias psicoactivas es una valiosa herramienta que permite identificar de una manera científica el consumo en poblaciones seleccionadas, razón por la cual complementa el conocimiento acerca de este fenómeno en poblaciones específicas.

El Gobierno Nacional a treves de la formulación de la Política Integral para Enfrentar el Problema de las Drogas: "Ruta Futuro", aprobada por el Consejo Nacional de Estupefacientes, incluyó como Pilar I la reducción del consumo de sustancias psicoactivas y su impacto, y como componente transversal, la generación de conocimiento.

En la "Ruta Futuro" se identifican siete principios sobre los cuales se fundamenta las acciones en el nivel institucional, que tienen como propósito garantizar que estas sean coherentes y adecuadas a la realidad. En estos principios se esbozan las cualidades de las actividades e identifican la Integralidad de la acción sobre el problema de las drogas, la necesidad de apoyar todas las acciones sobre Evidencia técnica y científica basada en evidencia objetiva que dimensione el fenómeno de las drogas desde una perspectiva general y por grupos poblacionales. Además, se plantea que las acciones para enfrentar este problema también sean Innovadoras y flexibles de manera que las intervenciones para contener el problema de las drogas sean novedosas y atiendan a identificar las situaciones particulares de grupos poblacionales y territorio de manera que con el uso de los últimos desarrollos tecnológicos contribuyan a la eficiencia y efectividad de la política para enfrentar el problema de las drogas en el país.

Por otra parte, se identifica que las acciones adelantadas deben ser Sostenibles de forma tal que sea posible su duración en el tiempo basado en el fortalecimiento en todos los niveles de las capacidades de las instituciones encargadas de la implementación de la política. Por último, se identifica que la política debe contar con tres aspectos fundamentales: ser Inclusiva y diferencial, Participativa y Articulada que permitirán que las actividades que se emprendan para el cumplimiento de los objetivos sean coherentes con el problema y cuente con la participación de todos los involucrados e identifique sus necesidades en la materia.

Asimismo, de acuerdo con el "Plan de Acción de la Política Ruta Futuro", aprobado por el Consejo Nacional de Estupefacientes, se contempla dentro del Pilar 1 de Reducción de Consumo de Sustancias y su Impacto, el Objetivo Estratégico I que corresponde a "Fortalecer la coordinación interinstitucional para mejorar la gestión del conocimiento y las capacidades de respuesta que permita el desarrollo de competencias socioemocionales, prevención oportuna de problemas observables y la atención integral e inclusión social de las personas con afectaciones en salud mental" que se materializa a través de la Estrategia "Gestión de Conocimiento en salud mental" con acciones específicas como: a) Diseñar y desarrollar estudios y/o investigaciones del consumo de sustancias psicoactivas y su impacto, con uso de diversas metodologías y dirigidos a diferentes grupos poblacionales y/o sustancias y b) Promover la innovación de la investigación sobre consumo de drogas con el fin de mejorar la comprensión del consumo.

En el caso del consumo de sustancias psicoactivas ilegales, este se distribuye de manera distinta en las regiones del país. Antioquia y en particular Medellín, y el Eje Cafetero aparecen como regiones de alto consumo. Tomando como referencia el Estudio Nacional de consumo de sustancias psicoactivas 2019 las mayores prevalencias de consumo en el último año de cualquier sustancia ilícita se encuentran en Risaralda (6,8%), Quindío (5,9%), Medellín (5,4%), Caldas (5,1%), Amazonas (4,4%), Bogotá (4,3%) y Cauca (4,2%).

Teniendo en cuenta las anteriores consideraciones, a través del presente estudio se aplican metodologías novedosas que apoyan las ya existentes para la consecución de evidencia técnica y científica con la que es posible identificar y cuantificar el consumo de drogas en un territorio específico, de manera que sea posible el diseño de planes y programas para enfrentar la problemática del consumo de drogas más cercanos a la realidad y con el uso de herramientas acordes al problema.

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Desarrollar un diagnóstico epidemiológico social de consumo de drogas ilícitas en tres ciudades del Eje Cafetero basado en análisis de marcadores químicos presentes en el afluente de aguas residuales de plantas de tratamiento de aguas residuales

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar la presencia y cuantificar la concentración de varios tipos de familias químicas relacionadas con el abuso de drogas por espectrometría de masas previa separación cromatográfica en afluente de PTARs de las tres ciudades capitales del Eje Cafetero.
2. Identificar biomarcadores (metabolitos) y productos de transformación de drogas ilícitas mediante una aproximación metabolómica usando software especializados como el metaboanalyst.
3. Relacionar las concentraciones de los productos congéneres, metabolitos y productos de transformación con el consumo de drogas de abuso en la población servida de las PTARs bajo estudio.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Drogas de abuso

Los estudios de consumo de drogas por parte de la población se han convertido en un punto principal para las entidades de regulación, debido a que existen actualmente una gran cantidad de compuestos que están apareciendo cada día, generando un efecto más fuerte y a su vez más peligroso para la persona que lo consume [11-13], entre ellas se encuentran las más comunes como son la cocaína [14], las metanfetaminas [15], el THC [16-17], los opioides [18], el LSD [19], las benzodiazepinas [20] entre otras.

Este grupo de sustancias catalogas como psicoactivas por su efecto, se pueden agrupar en tres grandes grupos, como sustancias depresoras, sustancias estimulantes y sustancias alucinógenas [21], se habla de sustancias psicoactivas depresoras cuando estas producen que el sistema nervioso central de la persona funcione de una forma más lenta, disminuyendo su actividad normal, dentro de este tipo de sustancias se tienen los opioides y sus derivados como lo son la heroína que es ilegal, también de uso farmacéutico como la morfina, la codeína y la metadona, o aquellas sintéticas como el fentanilo [22-23], las sustancias psicoactivas estimulantes provocan una aceleración en la actividad del sistema nervioso como la cocaína o clorhidrato de cocaína extraída de la planta de coca (*Erythroxylum coca*) [16,24], si hablamos de tipo anfetamínico que son sintéticas, aquí se encuentra un gran número de moléculas dentro de las principales encontramos la anfetamina, la metanfetamina, la efedrina, la catinona, el metilfenidato, entre otras[25] y las nuevas drogas psicoactivas sintéticas como lo son el LSD, MDMA, la familia NBOMe, DOB y DOC [26], la MEC, MePHP, APINACA, PVP, JWH, TFMPP, PMA, entre otras [27], y dentro de las sustancias alucinógenas las que ocasionan una distorsión en el individuo, provocando un cambio en el estado de ánimo, principalmente está el cannabis como molécula activa está el tetrahidrocannabinol (THC), cannabidiol (CBD) [28].

El consumo de estas sustancias esta incrementado cada vez más según los reportes de la UNODC y se ha visto evidenciado en grupos de personas que se encuentran en la adolescencia y edad adulta (entre los 12 a 65 años de edad), a la vez y en todos los estratos socioeconómicos, de igual forma depende principalmente de la capacidad económica que tienen para acceder a estos tipos de sustancias, debido a que unas son muy económicas como el cannabis y otras tienen precios muy elevados como por ejemplo la cocaína [29-31], en Colombia el último reporte del 2017, emitido por el observatorio de drogas de Colombia (ODC), habla sobre el incremento en el consumo de la población de drogas ilícitas crece anualmente a un 3,6%, siendo la cannabis las más utilizada en la población, seguido de la cocaína, el bazuco y el éxtasis (Colombia drug report 2017, 2017).

3.2. La epidemiología basada en las aguas residuales WBE

El concepto WBE fue propuesto inicialmente por Daughton en 2001 [32] y se aplicó por primera vez en 2005 a través de la estimación del consumo de cocaína en Italia [33]. Ya que Luego, WBE se ha expandido para incluir otras drogas ilícitas, como

heroína, cannabis y estimulantes similares a las anfetaminas [34-35] y para las nuevas sustancias psicoactivas (NSP) [36-38]. Los datos también se han informado para el análisis de alcohol basado en WBE [39-43], tabaco [44-46] y medicamentos falsificados [47].

El enfoque de la epidemiología basado en las aguas residuales WBE para establecer una relación entre la concentración de drogas psicoactivas en aguas residuales sin tratamiento y el consumo tiene varias etapas [35]

1. Toma de muestra
2. Análisis de muestras: determinación cuantitativa de biomarcadores [caudal $\text{m}^3/\text{día}$]
3. Carga de biomarcadores objetivo ingresando a la PTAR ($\text{g}/\text{día}$) [Factores de corrección del metabolismo humano]
4. Cantidad de sustancias consumidas por la población servida por el sistema de PTAR [Estimados en la población]
5. Normalización a la población definida ($\text{mg}/\text{día}/1000$ habitantes) [Dosis media]
6. Cantidad de sustancias como dosis/ $\text{día}/1000$ habitantes.

3.3. Estrategias de análisis mediante espectrometría de masas

El análisis químico de los biomarcadores de consumo de drogas ilícitas IDB en las aguas residuales juega un papel clave importante dentro del enfoque WBE. Se requieren técnicas analíticas avanzadas y experiencia para obtener datos precisos de concentración de IDB en aguas residuales, porque los datos cuantitativos son la base de los cálculos posteriores de las cargas máxicas de IDB y el consumo de drogas. Las concentraciones de IDB en muestras de aguas residuales son generalmente alrededor de un factor 1000 más bajo que en fluidos humanos (ngL^{-1} vs ngmL^{-1}), lo que señala el desafío para análisis cuantitativo. Concentraciones bajas de analito en combinación con la complejidad y composición desconocida de la matriz de aguas residuales podría obstaculizar no solo a la sensibilidad y cuantificación precisa, pero también una identificación sólida. La cromatografía de gases - espectrometría de masas es el enfoque más adecuado para obtener los requisitos de sensibilidad, selectividad e identificación en el análisis químico dirigido hacia la epidemiología basada en aguas residuales WBE.

La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) [48-49] en general proporciona altos niveles de selectividad y sensibilidad. Sin embargo, la derivatización de los compuestos objetivo a menudo necesarios para la mayoría de los IDB a fin de hacerlos compatibles con GC. En consecuencia, el tratamiento y la medición de la muestra es generalmente laborioso y lento. La cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas (LC-MS) es un método más versátil. Una técnica que permite la determinación de compuestos de media o alta polaridad, baja volatilidad, y/o compuestos termolábiles, que son la mayoría de los IDB, con menor tratamiento de muestra y tiempos de análisis cromatográficos más cortos. Además, la matriz de la muestra (es decir, agua) es completamente compatible con esta técnica. LC: espectrometría de masas en tándem (LC-MS / MS), por ejemplo, un analizador de triple cuadrupolo (QqQ), es aún más poderoso

y se ha convertido en la técnica de elección para la determinación cuantitativa de IDB (conocidos) en muestras de aguas residuales [34]. A pesar del predominio de LC-MS/MS en los estudios de WBE, el uso de espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) ha sido explorado recientemente y abre nuevas perspectivas en el campo de análisis. Su gran potencial de cribado con fines de identificación se origina en la adquisición de datos de espectros completos de masa precisa. LC-HRMS es una técnica poderosa que permite el examen de amplio alcance de muchas drogas ilícitas, metabolitos y productos de transformación, así como la investigación de nuevas sustancias psicoactivas NPS [50-56].

3.4. Análisis guiado HRMS

El análisis de guiado basado en HRMS (espectrometría de masas de alta resolución) normalmente detecta e identifica los compuestos (es decir, análisis cualitativo) en las aguas residuales, porque HRMS realmente aprovecha su excelente rendimiento para este tipo de aplicación [57-58]. Sin embargo, estudios recientes también se han dirigido hacia el análisis cuantitativo de los biomarcadores de drogas ilícitas IDB en aguas residuales [50,59-62] y un notable aumento en el número de aplicaciones cuantitativas de HRMS que persiguen un análisis completo (es decir, detección sensible, identificación confiable, cuantificación precisa) en el futuro cercano.

La mayoría de los IDB son de polaridad (media) alta; por lo tanto, LC-HRMS suele utilizar analizadores TOF y Orbitrap. La ausencia de bibliotecas espectrales de masas estandarizadas en LC-MS es una dificultad adicional en el análisis no dirigido, a diferencia de GC-MS con ionización electrónica (EI), donde la disponibilidad de bibliotecas comerciales (por ejemplo, NIST) ofrece la posibilidad de identificar compuestos haciendo coincidir los espectros experimentales y de biblioteca [48-49].

Para tener una visión más realista y completa de la presencia de contaminantes orgánicos en general, y en los IDB en particular, una combinación de metodologías dirigidas (con o sin estándares (es decir, detección de sospechas) y no dirigidas parece ser el enfoque más atractivo [63]. Además, la combinación de GC-HRMS y LC-HRMS (por ejemplo, usar el mismo instrumento QTOF para ambas configuraciones) avanza hacia una selección más completa de compuestos orgánicos contaminantes en el medio acuático independientemente de su polaridad y volatilidad [64].

3.5. Muestreo y Preparación de Muestras

Para la mayoría de las aplicaciones en epidemiología de las aguas residuales WBE, el usuario final depende de las muestras compuestas 24 horas de aguas residuales del afluente (es decir, sin tratar) recogidas rutinariamente en la entrada de una PTAR.

Existen varios métodos de extracción que se han utilizado para encontrar este tipo de compuestos entre ellos se tienen la extracción en fase sólida (SPE) acoplado a un sistema en línea [62], o también se pueden utilizar sistemas SPE por separado usando columnas C18, que pueden ser acoplados a un extractor automático, o se pueden usar cartuchos más específicos como son los cartuchos Strata-X-Drug B[65],

a la vez usar técnicas miniaturizadas como la microextracción en fase sólida (SPME) [66], incluso se han utilizado técnicas más recientes como el QuEChERS [67-68], o el disco rotatorio RDSE [69].

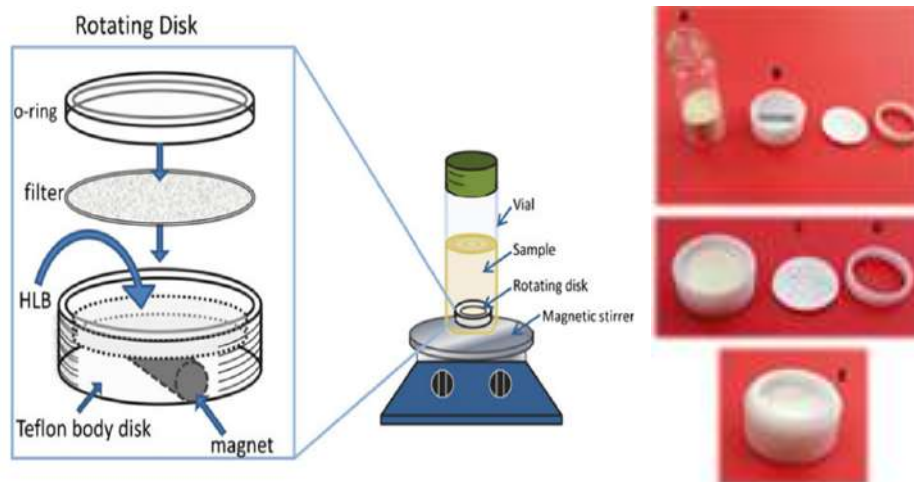


Figura 1. Sistema de extracción por desorción con disco rotatorio RDSE.

Para la identificación de este tipo de compuestos se toman diferentes matrices en las que quedan residuos de largo, mediano y corto plazo, dependiendo del tipo de molécula, por ejemplo existen estudios en aguas residuales [62,70], dentro de las aguas residuales podemos encontrar orina que sería la principal fuente de eliminación de estos compuestos [71-72], está el fluido oral para una identificación a corto plazo [73], ya directamente la mayoría de los estudios para la identificación más rápida de estos tipos de compuestos se realiza en plasma sanguíneo, debido a que este da una respuesta más rápida [74-76], también se ha tomado muestras de huesos para la detección [77], incluso estudios han demostrado que es tan alta la persistencia de este tipo de compuestos que se hacen estudios en la misma agua potable [65], incluso a largo tiempo se han encontrado que este tipo de drogas quedan en el cabello de las personas [78-79].

La cantidad de las sustancias que se logran encontrar en las matrices depende no solo del método de extracción sino también de la capacidad que tiene el instrumento de análisis y a su vez específicamente de la sensibilidad y robustez, con ello se utilizan principalmente la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, donde se hace uso de equipos como el LC orbitrap, para determinar cantidades a nivel de ng [62], también está un LC-ESI-MS [71], también se puede adecuar a la electroforesis capilar (CE) [78], incluso está la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas [79-81]

3.6. Monitoreo

Idealmente, se debería analizar 365 muestras compuestas diarias por año.



Figura 2. Sitio de estudio e investigación grupo GICTA PTAR Hospital.

3.7. Biomarcadores y productos de transformación

La investigación de metabolitos y productos de transformación de drogas ilícitas en muestras de agua es un tema de investigación actual [82].

La epidemiología basada en aguas residuales WBE se basa en el análisis de biomarcadores clave de fármacos. Los biomarcadores de drogas ilícitas IDB pueden ser el compuesto original y/o el principal metabolito(s). Para las drogas más conocidas y consumidas, la información sobre el metabolismo humano ya está disponible y ha permitido el establecimiento de benzoilecgonina como el principal metabolito e IDB de la cocaína, THC-COOH como principal metabolito y IDB de cannabis, o que la metanfetamina, anfetamina y la MDMA se excreta principalmente como compuestos inalterados. Sin embargo, esta información suele ser escasa para nuevas drogas psicoactivas NPS y, por lo tanto, el principal biomarcador de uso generalmente no está bien establecido.

3.8. Parámetros analíticos relevantes y control de calidad

El uso de técnicas analíticas avanzadas y la experiencia del analista son esenciales para obtener datos cuantitativos precisos para IDBs en muestras de aguas residuales. Además, las medidas adecuadas para el control de calidad se requieren para obtener datos confiables.

Obviamente, antes de su aplicación, la metodología analítica debe validarse completamente para todos los analitos en términos de linealidad, veracidad/precisión (evaluado mediante experimentos de recuperación) y precisión (como repetibilidad RSD), selectividad/especificidad y límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ). Uno de los principales inconvenientes en este campo es la falta de directrices dirigidas específicamente al análisis de los IDB en aguas residuales. En ausencia de tales pautas, se pueden utilizar como directrices las recomendaciones en otros campos, como el análisis de residuos de

plaguicidas (SANCO, 2013; SANTE/11945, 2015), residuos en productos de origen animal (Comisión Europea, 2002) métodos bioanalíticos (EMA, 2012), o los programas de la ley de aguas limpias (EPA, 2007). Comúnmente, se requiere un mínimo de 5 réplicas para comprobar la exactitud y precisión en el LOQ objetivo, y en al menos otro nivel superior, por ejemplo, 10 veces el objetivo LOQ. Debe demostrarse un método analítico cuantitativo en la validación inicial, pero también más tarde con lotes de muestra para realizar controles de calidad (QC) que proporcionen una recuperación aceptable en cada nivel de adición y para cada analito. La media aceptable para las recuperaciones para los IDB en aguas residuales suele estar en el rango de 70 a 120%, con una repetibilidad asociada RSD 20%, (por ejemplo, como el establecido para plaguicidas en SANCO / 12571/2013 (SANCO, 2013)).

3.9. Perspectivas y tendencias

La investigación de los IDB en aguas residuales es un tema de actualidad e interés en la química analítica. La complejidad de la matriz bajo investigación, las bajas concentraciones de analito comúnmente encontradas, y la necesidad de detectar y cuantificar no solo el compuesto congénere sino también los principales metabolitos de las drogas hacen de esta tarea un desafío analítico. Además, el metabolismo humano no es aún bien conocido, y los biomarcadores objetivo en su mayoría son desconocidos. En este campo, la cromatografía líquida combinada con la MS de baja y alta resolución es una herramienta indispensable. Diferentes estrategias se pueden aplicar para investigar los IDB en aguas residuales desde la cuantificación de compuestos diana hasta la detección e identificación (provisional) de metabolitos y productos de transformación. La cuantificación de IDB en aguas residuales es un requisito en WBE para estimar el consumo de drogas en poblaciones. sin embargo, la presencia de residuos de medicamentos en las aguas residuales también tiene otras implicaciones. Por ejemplo, existe un posible impacto ambiental cuando los compuestos no son eliminados por completo por las PTAR.

De hecho, las bajas tasas de eliminación de determinadas drogas ilícitas, como se han observado tipo MDMA, ketamina y metadona [83]. Por tanto, las bajas tasas de eliminación implican que los residuos de fármaco pueden estar presentes en las aguas residuales efluentes y finalmente alcanzar el medio acuático. Por tanto, la determinación de medicamentos ilícitos y metabolitos en aguas residuales efluentes y aguas superficiales también es de interés, así como la investigación de potenciales productos de transformación que se puede formar en el medio ambiente. Aquí, los niveles de concentración son mucho más bajos que en las aguas residuales afluentes y, por lo tanto, se requiere una excelente sensibilidad de los métodos analíticos.

3.10. Mejores prácticas

Los cuatro pilares de esta investigación y en general el trabajo de los últimos años del Grupo GICTA está basado en la ideología de la Química Verde y los ODS, que se resumen en desarrollos de preparación de muestras miniaturizados (bajo uso de solvente, mínima cantidad de reactivos y minimización de residuos), apelación a modelaciones y ensayos in silico con uso de plataformas bioinformáticas y minería

de datos (25% cromatografía y 75% de análisis de datos), el estudio de matrices ambientales y la búsqueda permanente de soluciones inteligentes e innovadoras de remoción de contaminantes emergentes (arcillas, corcho, papel) y el uso de tecnologías analíticas avanzadas relacionadas con la espectrometría de masas para identificaciones incuestionables propendiendo siempre por un uso energético eficiente

4. DISEÑO METODOLÓGICO DE LA INVESTIGACIÓN

4.1. Protocolo de recolección y tratamiento muestras

4.1.1. Toma de la muestra

4.1.1.1. Materiales

- ✓ Equipos portátiles para mediciones de temperatura, pH y conductividad eléctrica.
- ✓ Muestreador (botella o balde).
- ✓ Tubo plástico para homogenización de la muestra.
- ✓ Probeta plástica graduada de 1000 mL.
- ✓ Cronómetro.
- ✓ Neveras de icopor o poliuretano con suficientes bolsas de hielo para mantener una temperatura cercana a 4 °C.
- ✓ Frasco lavador.
- ✓ Toalla de papel absorbente.
- ✓ Cinta pegante, de enmascarar y adhesivos.
- ✓ Bolsas pequeñas para basura.
- ✓ Esfero (bolígrafo) y marcador de tinta indeleble.
- ✓ Tabla portapapeles.
- ✓ Guantes.
- ✓ Papel aluminio (cuando se requiera).
- ✓ Agua destilada. En su defecto utilizar agua embotellada o de bolsa.
- ✓ Recipientes plásticos y de vidrio (varía según requerimientos de análisis).
- ✓ Documentos de identificación personal (cédula, carnet de EPS y ARP).
- ✓ Overol o ropa de trabajo cómoda y que le brinde protección adecuada
- ✓ Equipo de Protección personal EPP
- ✓ Máscara respiradora con filtros para ácidos y vapores orgánicos
- ✓ Impermeable
- ✓ Botas de caucho o zapatos que brinden alta protección

4.1.1.2. Procedimiento

- ✓ Tomar porciones individuales del agua en estudio en botellas de boca ancha y combinarlas en una sola botella al momento de tomarlas y de inmediato proceder a conservar la muestra en condiciones de refrigeración a 4 °C y oscuridad.
- ✓ Organice las botellas rotuladas, los reactivos, formatos e insumos.
- ✓ Cubra el rótulo con una cinta adhesiva transparente.
- ✓ Se toma la muestra y se determina el tiempo en que se tomará la siguiente.
- ✓ Mida los parámetros de campo (pH y temperatura).

- ✓ Se coloca la muestra en el recipiente marcado de acuerdo con los tiempos de muestreo.
- ✓ Tape cada botella y agítela.
- ✓ Coloque las botellas dentro de la nevera con hielo suficiente para refrigerar.
- ✓ Finalmente se obtendrá una muestra compuesta tomada en un tiempo que se mantendrá en refrigeración.
- ✓ Lavar con abundante agua y jabón, y desinfecte con alcohol todos los elementos utilizados en el muestreo.
- ✓ Anotar todas las operaciones realizadas en el documento.

4.2. Análisis en el laboratorio

La etapa de extracción usando discos rotatorios se llevará de acuerdo con lo reportado por Richter y colaboradores [69,84].

4.2.1. Materiales

- ✓ Metodología Disco de teflón
- ✓ Arcilla funcionalizada con líquido iónico como adsorbente o amino
- ✓ Vial (2mL, 10mL)
- ✓ Termómetro
- ✓ Balones volumétricos
- ✓ Vaso de precipitados
- ✓ Metanol grado cromatográfico
- ✓ Estándares de análisis
- ✓ Filtros de 0.45 μm
- ✓ Tubos eppendorf (2mL)
- ✓ Nitrógeno grado 5
- ✓ Piridina grado analítico
- ✓ N-metil-N- (trimetilsilil) trifluoroacetamida (MSTFA)
- ✓ Microvial de 300 μL
- ✓ 3,3', 4,4'-tetraclorobifenilo (PCB 77)
- ✓ TCS-d3

4.2.2. Equipos

- ✓ Balanza analítica
- ✓ Plancha de agitación
- ✓ Cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS)
- ✓ Micropipetas debidamente calibradas
- ✓ Equipo de ultrasonido
- ✓ Agitador de vórtex

4.2.3. Procedimiento de la extracción

1. Se toma la fase adsorbente (A) y se deposita sobre la cavidad del disco de teflón (B) que contiene en su parte interior una pequeña barra de metal.
2. Se tapa el disco con una membrana de fibra de vidrio.
3. Se sujetó la membrana de fibra de vidrio con un aro de teflón (D), quedando el disco listo para hacer la extracción (E).

4. Se acondiciona la fase adsorbente (alojada en la cavidad del disco), con Acetato de Etilo – Metanol – Agua por 5 minutos cada uno.
5. Se adiciona el disco sobre la muestra acuosa previamente filtrada para hacer la adsorción de los analitos.
6. Se procede a hacer la desorción en 10 mL de metanol poniendo el disco rotatorio en un vial durante 10 minutos.
7. El extracto de 10 mL de metanol que ahora contiene los analitos de interés se lleva a sequedad bajo una corriente de nitrógeno, repartiendo 5 mL para análisis y 5 mL para contra muestra.
8. Ambos se secan con nitrógeno y la contra muestra se guarda a -20°C .

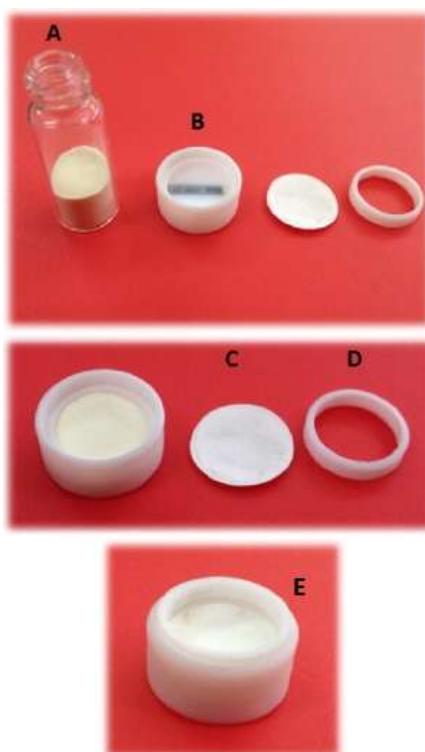


Figura 3. Procedimiento de montaje de RDSE.

4.2.4. Derivatización

El proceso de derivatización se llevará a cabo por lo reportado por Gonzales-Mariño y colaboradores [48-49].

1. Realizar previamente una solución de MSTFA en piridina
2. A cada muestra seca se añade $150\ \mu\text{L}$ de piridina con MSTFA y se agita a la velocidad máxima durante 30 min a $80\ ^{\circ}\text{C}$.
3. Luego se adicionan los estándares internos, se agita en vórtex, se sónica a $60\ ^{\circ}\text{C}$ durante 5 minutos.
4. Luego se transfiere el contenido a un microinserto de vidrio en un vial de vidrio se tapa para su análisis.

4.2.5. Preparación de estándares de calibración

1. Se preparan soluciones madre de cada estándar (1000 mg L^{-1}), se deben conservar a -20°C , pesando o tomando volumen de la cantidad exacta del estándar y diluyendo en un solvente adecuado.
2. Sonicar por 5 min a 40°C .
3. Las soluciones de trabajo se preparan a partir de las soluciones madre individuales, las concentraciones de las soluciones de trabajo mezcladas o individuales, agitar en vórtex por 2 min, (las concentraciones deben ser equidistantes entre ellas).
4. Realizar una curva de calibración de acuerdo con la capacidad del equipo para detectar el analito, por ejemplo:
 - a. $1 \mu\text{g/L}$, $10 \mu\text{g/L}$, $20 \mu\text{g/L}$, $30 \mu\text{g/L}$, $40 \mu\text{g/L}$, $50 \mu\text{g/L}$, $60 \mu\text{g/L}$, $70 \mu\text{g/L}$, $80 \mu\text{g/L}$, $90 \mu\text{g/L}$ para cada estándar, las soluciones de trabajo se almacenan a 4°C antes de su uso.
5. Llevar las soluciones de trabajo al cromatógrafo.
 - b. Nota: Si el estándar necesita estar derivatizado realizar el procedimiento de derivatización.

Observaciones:

- 1- TCS-d3 o el analito escogido (lindano): se añade siempre (muestras reales filtradas o dopadas) desde el inicio de la extracción y es el estándar surrogate para calcular la recuperación relativa.
- 2- TCS o el analito escogido: es el dopaje.
- 3- PCB77: se añade al final solo antes de la inyección y es el estándar interno para calcular la recuperación absoluta

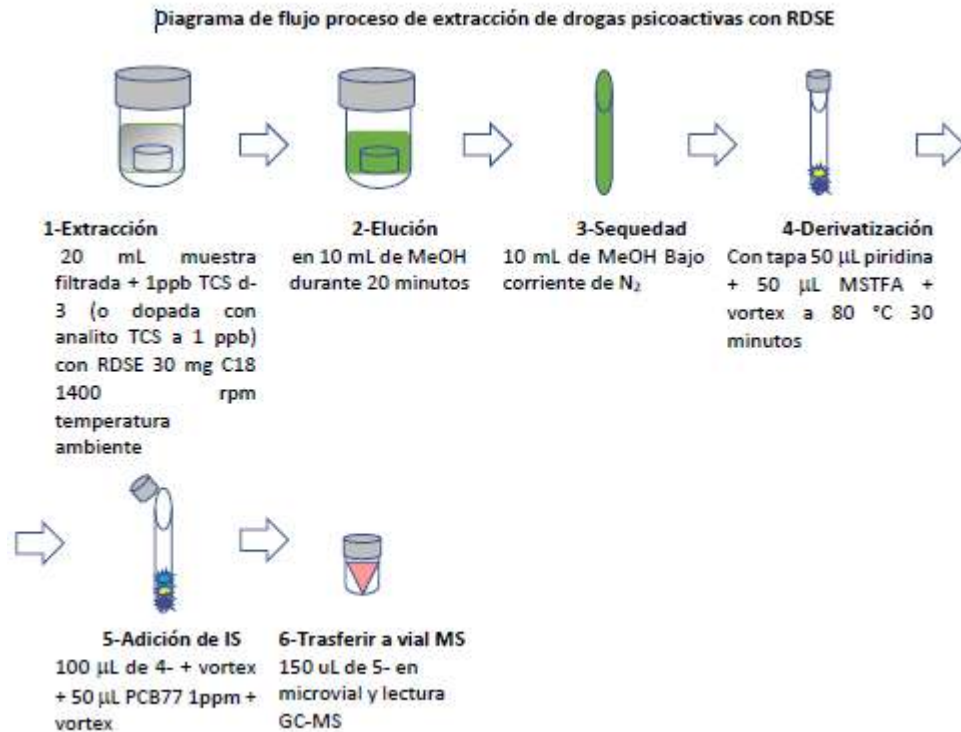


Figura 4. Diagrama de flujo proceso de extracción de drogas psicoactivas con RDSE.

4.3. Análisis Cromatográfico

4.3.1. Análisis Cromatográfico GC-MS en la Ucaldas laboratorio GICTA

Este se lleva a cabo en un equipo Shimadzu GC-MS QP 2010 Plus, columna: ZB-5 30 m, 0.25 mm ID, 0.25 µm, temperatura del inyector: 250 °C y modo splitless, temperatura de la fuente de iones y detector a 300 °C, se usa una rampa de temperatura, el volumen de inyección: 1 µL, gas portador y auxiliar: Helio. flujo: 1 mL min⁻¹, se hace un modo SCAN de todo el tiempo de lectura, se analizan masas desde los 40 m/z hasta los 500 m/z [85].

4.3.2. Análisis Cromatográfico LC-MS en la UIS laboratorio CROM-MASS

Se realizó la inyección directa de las muestras al equipo cromatográfico. Se empleó un cromatógrafo líquido de ultra-alta eficiencia (UHPLC), 10401L (Thermo Scientific, Vanquish, Germering, Alemania), equipado con una bomba binaria de gradiente (Thermo Scientific, 8315515), un inyector automático de muestras (WPS 300TRS) y una unidad termostada para la columna (TCC 3000). La interfaz del LC/MS fue la electronebulización (HESI) y el espectrómetro de masas fue de alta resolución con un sistema de detección de corrientes de iones Q-Orbitrap (QExactive, Thermo Scientific, Bremen, Alemania). La separación cromatográfica se realizó en una columna Hypersil GOLD Aq (Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, EE.UU.; 100 x 2.1 mm, 1.9 µm de tamaño de partícula) a 30 °C. La fase móvil fue A: una solución acuosa de ácido fórmico 0.2% v/v (agua), y B: ácido fórmico 0.2% v/v (acetonitrilo). La condición inicial de gradiente fue de 100% A, cambiando linealmente hasta 100%

B (8 min); se mantuvo durante 3 min; el retornó a las condiciones iniciales en 1 min; el tiempo total de corrida fue de 12 min, con 8 min para postcorrida. El espectrómetro de masas Q-Orbitrap (Q-Exactive, Thermo Scientific, Bremen, Alemania), conectado por la interfaz de electronebulización (HESI), operada en modo positivo con un voltaje de capilar de 3.5 kV. Se usó nitrógeno como gas secante. Los espectros de masas se adquirieron en el rango de masas m/z 80-1000. El detector de masas Orbitrap fue calibrado con las soluciones de referencia certificadas: cafeína (C6035, Sigma-Aldrich); MRFA (M1170, Sigma-Aldrich); Ultramark™ 1621 Mass Spec. (AB172435, ABCR GmbH & Co. KG); n-butilamina (471305, Sigma-Aldrich). La identificación de los compuestos se realizó usando el modo de adquisición full scan y la extracción de corrientes iónicas (EIC) correspondientes a los $[M+H]^+$ de compuestos de interés, medición de masas con exactitud de $\Delta ppm < 1$ y, comparación con los tiempos de retención de los materiales de referencia certificados. En la cuantificación, se usaron los materiales de referencia certificados: THC (98,5 %, Lipomed Arlesheim, Suiza), CBD (99,9 %, Lipomed Arlesheim, Suiza), CBN (99,9 %, Lipomed Arlesheim, Suiza), THC-A (98,0 %, Restek), CBD-A, (100 %, Cerilliant, U.S.A), Fenacetina (99,9 %, Lipomed Arlesheim, Suiza), Levamisol (100 %, Lipomed Arlesheim, Suiza), Cocaína (99,5 %, Lipomed Arlesheim, Suiza) y Benzoilecgonina (99,3%, Lipomed Arlesheim, Suiza).

4.3.3. Recipientes de muestreo

La toma de las muestras se realiza en frascos debidamente rotulados y procurando que estos sean de color ámbar para evitar la descomposición de las sustancias por efecto de la luz, además de llevar una completa base de datos sobre las muestras tomadas, desde la recolección hasta el análisis y resultados en el laboratorio.

4.3.4. Muestreo y Preparación de Muestras

Se han utilizado dos tipos miniaturizados de preparación de muestras: RDSE (disco rotatorio de extracción por sorción) con C18 como adsorbente y SPME (microextracción en fase sólida) con fibra adsorbente mixta DVB/PDMS

4.3.5. Monitoreo

Este informe final de análisis de aguas residuales en 3 ciudades de Colombia corresponde a 10 campañas de muestreo realizadas los días 06, 13, 20 y 27 de noviembre; 09, 18, 26 de diciembre de 2020; 09, 29 de enero de 2021 y 26 de febrero de 2021 en cada sitio a 8 horas con recolección de muestras puntuales (250 mL) cada 30 minutos y una muestra compuesta (1000 mL) en ese lapso.

Para el muestreo en Pereira y facilitar la recolección simultánea entre las ciudades Armenia y ésta, se contrató a la firma Balance, Ambiente y Bioingeniería BAB S.A.S.

4.3.6. Procesamiento de los datos

El procesamiento de los datos se lleva a cabo en varias fases, una primera fase comprende el almacenamiento de los datos obtenidos en campo sobre las

muestras recolectadas y almacenamiento de esta información en una base de datos en Excel y compartido vía Google Drive, una segunda fase es el análisis de la respuesta obtenida por el equipo de análisis del laboratorio con respecto a la identificación y cuantificación de los compuestos de interés en las muestras de aguas residuales, esta se realiza en el equipo de cromatografía de gases con el software GCMS solution, una tercera fase comprende la recolección de los datos completos, para realizar una comparación entre el tipo de sustancias encontradas y la concentración de cada sustancia en las ciudades evaluadas, estos resultados quedarán recopilados en el informe final y en una base de datos compartida en la nube que fueron entregados a MJD.

4.4. Procesamiento de resultados cromatográficos: [86]

Las estimaciones se hicieron usando este modelo

1. Toma de muestra
2. Análisis de muestras: determinación cuantitativa de biomarcadores [caudal $m^3/día$]
3. Carga de biomarcadores objetivo ingresando a la PTAR (g/día) [Factores de corrección del metabolismo humano]
4. Cantidad de sustancias consumidas por la población servida por el sistema de PTAR [Estimados en la población]
5. Normalización a la población definida (mg/día/1000 habitantes) [Dosis media]
6. Cantidad de sustancias como dosis/día/1000 habitantes

Y sus respectivas ecuaciones son:

Caudal:

$$Q =$$

Carga másica diaria

$$\text{Daily mass load} = Q \times [\text{analito o metabolito en ng L}^{-1}]$$

Carga másica normalizada (mg/day/1000 inhabitants) [87]

$$\text{Consumo químico diario } i = \left($$

Donde:

F: Factor de corrección. [88]

E_i: Tasa de excreción medio de un residuo farmacológico i. [89]

Consumo diario de cocaína a partir de la carga másica normalizada de su metabolito benzoilecgonina (mg/day/1000 inhabitants)

$$Q = \text{Consumo químico diario} \times Fi$$

Donde:

Fi: Factor de corrección del metabolismo de CO a BE

5. VALIDACIÓN METODOLOGÍAS ANALÍTICAS

El propósito de la validación busca documentar los parámetros que se deben determinar para validar la técnica para el análisis de muestras de agua, de tal forma que a través de ella se generen resultados confiables. El objetivo principal del laboratorio de análisis es la producción de resultados de alta calidad, a través del uso de medidas analíticas que sean confiables, y adecuadas para el propósito propuesto. La confiabilidad de un resultado se mide por la precisión y la exactitud, parámetros que se ven afectados por todas las variables que intervienen en el proceso de medición, tales como técnicas de muestreo, condiciones ambientales, personal que realiza el análisis, equipos utilizados, calidad de los reactivos y procedimiento utilizado para su medición. El protocolo de todos los pasos y condiciones que se deben seguir para llegar al resultado constituye el método de análisis, y este debe ser validado. Para ello el personal que desarrolla las actividades de validación está compuesto por un profesional, y/o técnico debidamente capacitado en la operación de equipos de laboratorio y en el análisis de resultados. Los principios de validación seguidos para asegurar que la metodología que se utilice para validar cualquier método comprende parámetros básicos como lo son la determinación de la precisión, la exactitud, la linealidad, la robustez, la sensibilidad, los límites de detección y de cuantificación, todo esto como parte del sistema de calidad del laboratorio documentado en el protocolo de validación LIQA-VA-01

6. RESULTADOS

6.1. Análisis cualitativo por GC-MS

6.1.1. Análisis de resultados de las muestras por sustancias y ciudades

Aquí presentamos los resultados finales del estudio de análisis de aguas residuales en 3 ciudades de Colombia: PTAR Hospital Santa Sofia en la ciudad de Manizales, Colector de gruesos Santa Marta ciudad de Pereira y PTAR La Marina en la ciudad de Armenia.

Corresponde a 403 muestras, de sus correspondientes 10 muestreos

Tabla 1. Lotes de análisis por GC-MS discriminados por número de muestras y sitios de muestreo.

Ítem	Lote de análisis GC-MS	# Muestras	Sitio de Muestreo
1	1	26	Manizales (23) Pereira (0) Armenia (3)
2	2	26	Manizales (12) Pereira (4) Armenia (10)
3	3	22	Manizales (0) Pereira (0) Armenia (22)
4	4	26	Manizales (20) Pereira (6) Armenia (0)
5	5	19	Manizales (19) Pereira (0) Armenia (0)
6	6	26	Manizales (6) Pereira (0) Armenia (20)
Ítem	Lote de análisis GC-MS	# Muestras	Sitio de Muestreo
7	7	11	Manizales (6) Pereira (2) Armenia (3)
8	8	26	Manizales (2) Pereira (19) Armenia (5)
9	9	26	Manizales (6) Pereira (13) Armenia (7)
10	10	15	Manizales (6) Pereira (5)

			Armenia (4)
11	11	26	Manizales (0) Pereira (4) Armenia (22)
12	12	26	Manizales (0) Pereira (14) Armenia (12)
13	13	23	Manizales (6) Pereira (17) Armenia (0)
14	14	35	Manizales (15) Pereira (10) Armenia (10)
15	15	26	Manizales (12) Pereira (2) Armenia (12)
16	16	12	Manizales (0) Pereira (12) Armenia (0)
17	17	32	Manizales (9) Pereira (11) Armenia (12)

En total fueron analizadas 17 tandas de muestras (lotes) que corresponden a 403 muestras entre puntuales y compuestas en forma aleatoria de sitios, tipo de muestra y número de muestreo, para que el analista y auxiliar no prejuzguen e incidan en las interpretaciones.

Tabla 2. Tipos de muestra recolectados diferenciados por sitios de muestreo y número de muestras.

Ítem	Tipo de muestra	Sitio de muestreo	# de muestras
1	Puntual	Armenia	132
2	Compuesta		10
3	Puntual	Pereira	128
4	Compuesta		10
5	Puntual	Manizales	114
6	Compuesta		9

Según la tabla 2, de los 10 muestreos realizados en todo el estudio correspondientes a 403 muestras, el 93% fueron muestras puntuales y el restante 7% de muestras compuestas, una composición constante en el tipo de muestras que se mantuvo en el estudio, debido a que según se informó en los productos 2 y 3a durante las jornadas de muestreo de 8 h, se tomaron muestras puntuales cada media

hora (16 muestras en total por jornada en cada ciudad) y una única muestra compuesta de toda la jornada de muestreo.

Tabla 3. Relación de sustancias psicoactivas identificadas, fuentes y rol y frecuencia de muestras en las que se han hallado los analitos objeto del estudio.

Ítem	Sustancia	Fuente y/ rol	# de muestras
1	Cafeína	Marcador	25
2	Lidocaína	Precursor/corte	22
3	Cocaína	Hoja de la coca/droga	16
4	Pseudococaína	Hoja de la coca	12
Ítem	Sustancia	Fuente y/ rol	# de muestras
5	Catinona (efedrina)	Precursor/corte	9
6	Levamisol	Precursor/corte	8
7	Dronabinol ^c	Cannabis sintético/droga	8
8	Cinamoilcocaína	Hoja de coca	7
9	Fenacetina	Antiinflamatoria/prohibida	5
10	Canabinol ^c	Hoja de la cannabis/droga	4
11* ^c	THC	Hoja de la cannabis/droga	2
12	Diazepam	Prescripción médica/ansiolítico	2
13	Pseudoefedrina	Precursor/corte	1
14	MDMA	Sintética/droga	1

^cSe uso el mismo método de RDSE-GC-MS previa derivatización

Según la tabla 3, fueron detectadas al menos 14 tipos diferentes de drogas psicoactivas legales e ilegales y sintéticas y de origen y extracción natural, de las cuales se estableció que la sustancia con mayor recurrencia identificada en el estudio (403 muestras correspondientes a 10 muestreos) fue la cafeína, hallada en 25 de las 403 muestras. Este comportamiento es apenas normal y obedece a que es una sustancia legal y de alto consumo en especial en tierras cafeteras, por eso muchos investigadores [90-91] han intentado utilizarlo como un marcador de sustancias de contaminación (v.g. adulterantes de drogas de abuso, fármacos, productos de aseo personal, etc.). Le sigue en frecuencia de hallazgo fue la lidocaína (en 22 muestras de 403), cuyo principal rol es servir de corte para aumentar la rentabilidad de la mayoría de las drogas ilegales. La tercera sustancia con mayor frecuencia detectada fue la sustancia psicoactiva ilegal, cocaína, (identificada en 16 de las 403 muestras), que responde al consumo en aumento que se ha dado de esta sustancia entre la población y que su consumo según este estudio se estima en 2988 mg/día/1000hab en Armenia y 4857 mg/día/1000hab en Pereira, le sigue en orden de hallazgos en frecuencia, varias sustancias de corte (para aumentar el rendimiento de la cocaína principalmente), sustancias farmacéuticas legales en su mayoría como la lidocaína y el levamisol [91-92], también la catinona (efedrina), la pseudoefedrina y la fenacetina hoy en día reconocidas sustancias controladas dado su destino final en la cadena de

consumo. En último lugar se encuentra la MDMA encontrada en 1 de las 403 muestras, esta sustancia considerada droga sintética, suscita mucha atracción últimamente entre los jóvenes que se inician en el consumo de sustancias de abuso [92-93]. La aparición de dronabinol (cannabis sintético) en 8 de 258 muestras (en todas las tres ciudades del Eje Cafetero) y que se haya identificado con el mismo procedimiento RDSE, obedece a una aparición esperada por su consumo habitual y cada vez más aceptado entre la población, eso aplica igual con canabinol y THC en 4 y 2 de 258 muestras respectivamente, pero en esta familia de cannabis, el dronabinol al ser sintético y según conocedores de menor precio y baja calidad, está tomando más ascendencia entre los consumidores. Esta primera tendencia de detección de drogas de abuso en aguas residuales en la región del Eje Cafetero concuerda mucho con un primer estudio integral en Colombia aplicando el concepto de epidemiología basado en aguas residuales WBE sobre las drogas ilícitas más consumidas con los análisis cromatográficos hechos en el extranjero, la estimación del consumo de drogas según el concepto WBE estuvo con alta prevalencia de cocaína y cannabis, y menor uso de otras sustancias como MDMA y ketamina y no se detectó heroína [93-94]. Finalmente, el diazepam detectado en la PTAR del Hospital Santa Sofia de Manizales obedece a su uso y prescripción médica como ansiolítico.

En la figura 5 se muestra un cromatograma tipo que corresponde al proceso de extracción con RDSE, y posterior derivatización e inyección líquida de una muestra puntual del sitio de estudio Armenia, como característica especial en este sitio se han encontrado comparativamente las mayores áreas de las mencionadas sustancias, además una mayor diversidad de sustancias: cocaína, cafeína, lidocaína, levamisol, efedrina (1 de 403), MDMA (1 de 403) y THC, que se relaciona muy bien con los hallazgos de la UNODC y el MJD en su reporte de 2017 [94]. La presión del ecoturismo extranjero, movimiento de mafias del narcotráfico desde el Valle del Cauca y Cartago hacia Armenia hace 5 años (correlacionado con el aumento de casos de violencia representado en más homicidios y suicidios), aumento de incautaciones, y la crisis mundial representada en baja de las remesas desde el extranjero teniendo esta región una alta participación y mayor impacto de la depresión económica, entre las principales causas [95].

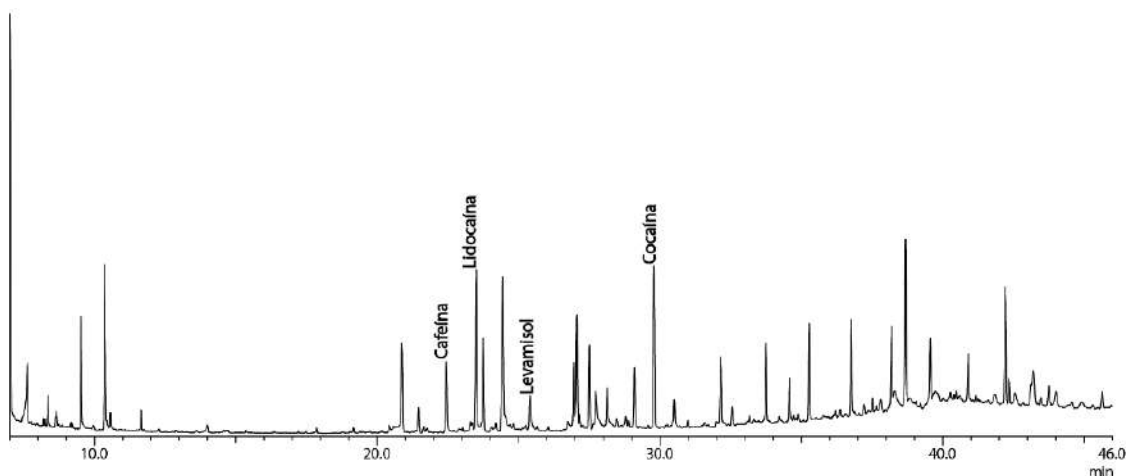


Figura 5. Muestra puntual de PTAR La Marina Armenia (AP0034R).

En la figura 6 y como destacable la PTAR La Marina de la ciudad de Armenia muestra la aparición esperada de familia de cannabinoides con mucha ascendencia hoy en día entre los consumidores.

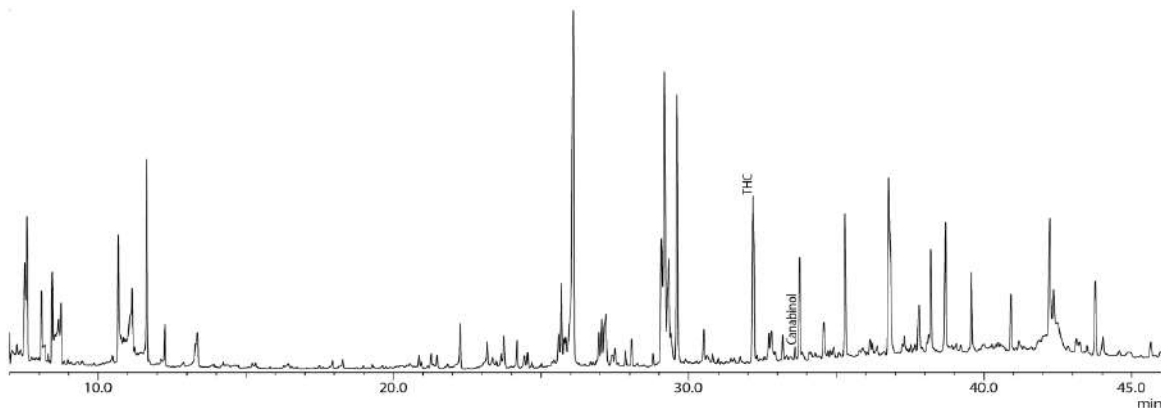


Figura 6. Muestra puntual de PTAR La Marina Armenia (AP0035R).

En la figura 7, se muestra un cromatograma del análisis GC-MS de una muestra del sitio Manizales, esta PTAR y dada su ubicación en un Hospital de primer nivel, tiene hallazgos propios y particulares de su función misional como por ejemplo la presencia de diazepam en 2 de las 403 muestras hasta ahora analizadas.

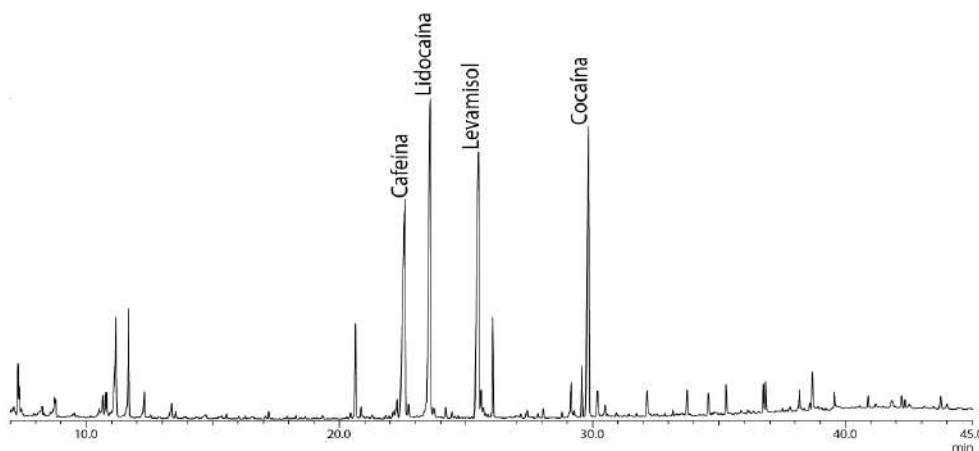


Figura 7. Muestra puntual de PTAR Hospital Santa Sofia Manizales (AP0024R).

En la figura 8 se detalla un cromatograma del análisis GC-MS de una muestra compuesta en el sitio Pereira, relativamente el valor menor de las áreas de pico para las sustancias de interés obedece al efecto de dilución en la composición de la muestra a 8 horas, pero con todo, en este sitio de muestreo hasta el momento se ha dado la menor diversidad de sustancias identificadas y con menores áreas de pico para las sustancias detectadas.

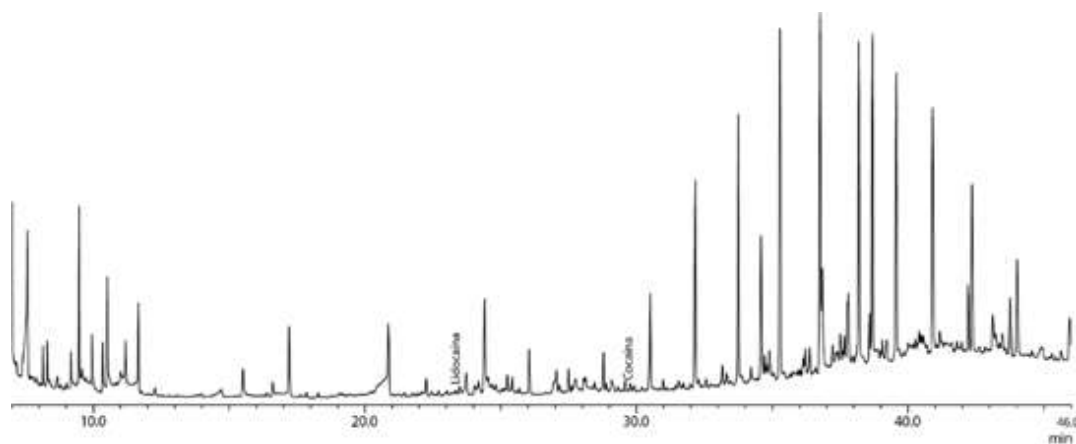


Figura 8. Muestra compuesta de colector de gruesos Santa Marta Pereira (PC002).

6.2. Análisis Cuantitativo por LC-MS

Para la cuantificación de las nuevas drogas de abuso en los extractos obtenidos de las muestras, se usó la técnica de calibración externa. Para ello, se utilizó el factor de respuesta (Rf) establecido del análisis de la solución estándar de las nuevas drogas de abuso en diferentes concentraciones, con respecto al ISTD (difenilamina). En la Tabla 4, se reportan el listado de las sustancias analizadas, los acrónimos y los niveles mínimos de cuantificación para cada uno de los compuestos.

En la Tabla 5, se reportan las concentraciones de las nuevas drogas de abuso determinadas por cromatografía líquida de ultra-alta resolución con detector de masas Orbitrap (UHPLC-ESI+-Orbitrap-MS) en las muestras enviadas por UNIVERSIDAD DE CALDAS. En los Anexos, se adjuntan las EIC obtenidas por UHPLC-ESI+-Orbitrap-MS de la solución estándar de las nuevas drogas de abuso y de los extractos analizados.

Tabla 4. Acrónimos, niveles mínimos de cuantificación (NMC=2NMD), y tiempos de retención de las sustancias de referencia, analizadas por UHPLC-ESI+-Orbitrap-MS.

Compuesto	Acrónimo	NMC[*], µg L⁻¹	t_R, min
Levamisol	LE	0,1	3,96
Benzoilecgonina	BE	0,1	4,41
Cocaína	CO	0,1	4,89
Fenacetina	FE	0,1	5,29
<i>Cannabidiolic acid</i>	CBD-A	0,1	8,17
<i>Tetrahydrocannabinolic acid</i>	THC-A	0,1	9,27
<i>Cannabinodiol</i>	CBD	1,0	8,28
<i>Tetrahydrocannabinol</i>	THC	1,0	8,89
<i>Cannabinol</i>	CBN	1,0	8,69

*NMC: Nivel mínimo de cuantificación.

Tabla 5. Tiempos de retención (t_R) y cuantificación de drogas de abuso analizadas por UHPLC-ESI+-Orbitrap-MS en las muestras entregadas por la UNIVERSIDAD DE CALDAS.

Código de la muestra	Identificación de la muestra	Concentración en la muestra, $\mu\text{g L}^{-1}$								
		LE	BE	CO	FE	CBD-A	THC-A	CBD	THC	CBN
991355-01-EB	PP008	0,4	3,5	0,4	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 1,0	1,0	< 1,0
991355-02-EB	AP001	0,2	< 0,1*	< 0,1*	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 1,0	1,0	< 1,0
991355-03-EB	MC005	0,4	514	1660	150	< 0,1	< 0,1	< 1,0	< 1,0*	< 1,0
991355-04-EB	MP012	< 0,1*	0,9	0,3	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 1,0	1,0	< 1,0
991355-05-EB	PP001	< 0,1*	5,7	2,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 1,0	1,0	< 1,0
991355-06-EB	MP013	< 0,1*	< 0,1*	0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 1,0	1,0	< 1,0
991355-07-EB	MP007	< 0,1*	0,8	0,2	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 1,0	1,0	< 1,0
991355-08-EB	MP023	< 0,1*	0,5	0,2	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 1,0	1,0	< 1,0
991355-09-EB	PC002	0,2	< 0,1*	< 0,1*	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 1,0	1,0	< 1,0
991355-10-EB	AP012	0,1	7,0	3,3	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 1,0	1,0	< 1,0

* Detectado por debajo del nivel mínimo de cuantificación y por encima del nivel mínimo de detección del método empleado.

Tabla 5. Continuación.

Código de la muestra	Identificación de la muestra	Concentración en la muestra, $\mu\text{g L}^{-1}$								
		LE	BE	CO	FE	CBD-A	THC-A	CBD	THC	CBN
991355-11-EB	PP004	0,3	< 0,1*	0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 1,0	1,0	< 1,0
991355-12-EB	MP009	420	730	6130	40	13,0	< 0,1	< 1,0	< 1,0*	< 1,0
991355-13-EB	AC003	0,2	8,4	0,9	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 1,0	1,0	< 1,0
991355-14-EB	AC007	1040	64	6740	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 1,0	1,0	< 1,0
991355-15-EB	MC001	0,1	< 0,1*	0,3	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 1,0	1,0	< 1,0
991355-16-EB	PP009	0,3	2,5	0,4	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 1,0	1,0	< 1,0
991355-17-EB	MP004	< 0,1*	0,4	0,2	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 1,0	1,0	< 1,0
991355-18-EB	MP016	< 0,1*	0,3	0,2	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 1,0	1,0	< 1,0
991355-19-EB	AP004	< 0,1*	5,0	0,2	< 0,1	< 0,1	< 0,1*	< 1,0	< 1,0*	< 1,0
991355-20-EB	PP090	2090	700	14340	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 1,0	< 1,0*	< 1,0

* Detectado por debajo del nivel mínimo de cuantificación y por encima del nivel mínimo de detección del método empleado.

Tabla 5. Continuación.

Código de la muestra	Identificación de la muestra	Concentración en la muestra, $\mu\text{g L}^{-1}$								
		LE	BE	CO	FE	CBD-A	THC-A	CBD	THC	CBN
991355-21-EB	AP010	0,3	< 0,1*	0,4	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 1,0	1,0	< 1,0
991355-22-EB	AP008	0,2	3,7	0,8	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 1,0	1,0	< 1,0
991355-23-EB	MP010	0,2	1,3	0,4	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 1,0	1,0	< 1,0
991355-24-EB	PP079	1410	470	5940	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 1,0	1,0	< 1,0
991355-25-EB	MP002	0,4	0,1	0,4	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 1,0	1,0	< 1,0
991355-26-EB	MC004	0,2	0,8	0,5	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 1,0	1,0	< 1,0
991355-27-EB	MP015	0,2	0,4	0,5	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 1,0	1,0	< 1,0*
991355-28-EB	AP062	0,2	2,3	0,4	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 1,0	1,0	< 1,0
991355-29-EB	PC006	12,8	17,5	35,7	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 1,0	1,0	< 1,0
991355-30-EB	MC006	2160	1970	21580	580	< 0,1	40,4	< 1,0	1,2	< 1,0

* Detectado por debajo del nivel mínimo de cuantificación y por encima del nivel mínimo de detección del método empleado.

Tabla 5. Continuación.

Código de la muestra	Identificación de la muestra	Concentración en la muestra, $\mu\text{g L}^{-1}$								
		LE	BE	CO	FE	CBD-A	THC-A	CBD	THC	CBN
991355-31-EB	AP009	0,3	6,4	2,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 1,0	1,0	< 1,0
991355-32-EB	AC004	0,2	7,2	0,8	< 0,1	< 0,1	378,7	< 1,0	4,2	< 1,0*
991355-33-EB	AC005	0,3	< 0,1*	0,3	< 0,1	< 0,1	10,1	< 1,0	1,0	< 1,0
991355-34-EB	PC005	0,3	2,9	0,7	< 0,1	< 0,1	350	< 1,0	3,9	< 1,0*
991355-35-EB	MP003	< 0,1*	0,6	0,2	< 0,1	< 0,1	9,2	< 1,0	1,0	< 1,0
991355-36-EB	PP006	0,2	3,2	0,5	< 0,1	< 0,1	2,1	< 1,0	1,0	< 1,0
991355-37-EB	MP006	< 0,1*	1,0	0,2	< 0,1	< 0,1	1,1	< 1,0	1,0	< 1,0
991355-38-EB	AC006	615	900	3610	< 0,1	< 0,1	1,4	< 1,0	< 1,0*	< 1,0
991355-39-EB	PC004	0,2	< 0,1*	0,2	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 1,0	1,0	< 1,0
991355-40-EB	MC003	0,2	0,5	0,4	< 0,1	< 0,1	< 0,1*	< 1,0	1,0	< 1,0

Tabla 5. Continuación.

Código de la muestra	Identificación de la muestra	Concentración en la muestra, $\mu\text{g L}^{-1}$								
		LE	BE	CO	FE	CBD-A	THC-A	CBD	THC	CBN
991355-41-EB	MP017	0,1	0,3	0,3	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 1,0	1,0	< 1,0
991355-42-EB	PP016	0,2	< 0,1*	0,2	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 1,0	1,0	< 1,0
991355-43-EB	MP018	< 0,1*	0,5	0,3	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 1,0	1,0	< 1,0
991355-44-EB	AP007	0,2	6,6	0,5	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 1,0	1,0	< 1,0
991355-45-EB	MP001	< 0,1*	0,3	0,2	< 0,1	< 0,1	< 0,1*	< 1,0	1,0	< 1,0

6.3 Cromatogramas muestras:

6.3.1 Análisis cualitativo por GC-MS

Ver ANEXO 11.2.1

6.3.2 Análisis cuantitativo por LC-MS

Ver ANEXO 11.2.2

La Tabla 5, muestra las concentraciones ($\mu\text{g L}^{-1}$) de los compuestos objetivo-encontrados en las muestras de aguas residuales afluentes de Armenia, Pereira y Manizales. Se destacan unos eventos de consumo muy altos en las festividades decembrinas, para efectos de la estimación de consumo y comparaciones con otras ciudades capitales fueron excluidos estos acontecimientos. La cocaína y su metabolito BE mostraron los valores de concentración más altos en las tres ciudades. En particular, BE superó los 6300 ng L^{-1} (6300 ppt) en Armenia, por encima de los 3600 ng L^{-1} en Pereira y por encima de 630 ng L^{-1} en Manizales en todas las muestras, por su parte y comparado con un estudio de Félix Hernández [94-93] en Bogotá alcanzaron los 1000 ng L^{-1} y 4000 ng L^{-1} (4000 ppt) en todas las muestras de Medellín. El principal metabolito del cannabis (THC-COOH) se encontró en todas las muestras de Armenia y Manizales en concentraciones alrededor de 10 ng L^{-1} y mayores en Pereira alrededor de 500 ng L^{-1} , por su lado este mismo metabolito se encontró del orden de la capital del Eje y alrededor de 200 y 300 ng L^{-1} para Bogotá y Medellín, respectivamente. Los cromatogramas UHPLCMS / MS (transición de cuantificación (Q)) para THC-COOH, cocaína y BE para muestras de aguas residuales de las tres ciudades. La identidad de los compuestos se pudo confirmar en todos los casos con al menos siete transiciones adquiridas por el cumplimiento de las dos proporciones de iones disponibles dentro de la tolerancia admitida ($\pm 30\%$) y el tiempo de retención ($\pm 0,2 \text{ min}$).

6.4. Estimaciones de indicadores de consumo

Se presenta a continuación un modelo de cálculo de la estimación de consumo en la PTAR Armenia para su mayor entendimiento:

Paso 1: cálculo de la carga másica (mass loads) en mg día^{-1} : A partir de la concentración promedio de BE ($6.3 \mu\text{g L}^{-1}$) y multiplicando por el caudal de la planta (70 L s^{-1}) se obtiene la carga másica de BE:

$$\begin{aligned} \text{Carga másica BE (mg day}^{-1}\text{)} &= 6.3 \frac{\mu\text{g}}{\text{L}} \times 70 \frac{\text{L}}{\text{s}} \times \left(\frac{60 \text{ s}}{1 \text{ min}}\right) \times \left(\frac{60 \text{ min}}{1 \text{ h}}\right) \times \left(\frac{24 \text{ h}}{1 \text{ day}}\right) \times \left(\frac{1 \text{ mg}}{1000 \mu\text{g}}\right) \\ &= 38102 \end{aligned}$$

Paso 2: cálculo de la carga normalizada (normalized mass loads) en $\text{mg día}^{-1} 1000 \text{ hab}^{-1}$: A partir de la carga másica de BE ($38102 \text{ mg día}^{-1}$) se multiplica por el factor de corrección (2.33) y el factor de porcentaje de excreción (0.42) y se divide por el número de habitantes (en miles) servidos por la planta PTAR de Armenia (45000 hab):

$$\text{Carga normalizada (mg day}^{-1} 1000 \text{ inh}^{-1}\text{)} = 38102 \frac{\text{mg}}{\text{day}} \times 2.33 \times 0.42 \times \frac{1}{45 \text{ inh}} = 829$$

Paso 3: finalmente se calcula el consumo de cocaína (back-calculation of cocaine consumption): A partir de la carga másica normalizada de su principal metabolito (829 mg día⁻¹ 1000 hab⁻¹ y multiplicando por el factor de transformación 3.59, se obtiene el consumo de cocaína (mg CO día⁻¹ 1000 hab⁻¹):

$$\text{Consumo de CO (mg CO day}^{-1} \text{ 1000 inh}^{-1}) = 829 \frac{\text{mg}}{\text{dia 1000 inh}} \times 3.59 = 2974$$

Abajo se muestran los cálculos completos para los demás metabolitos y sustancias y sitios de estudio.

6.4.1. Resultados PTAR Armenia

Sobre el modelo de cálculo anterior se describe para la ciudad de Armenia y según las muestras de referencia y sus concentraciones en µg L⁻¹ (tabla 5), para este sitio de estudio (muestras con código A), en la tabla 6, las cargas másicas para las sustancias y metabolitos de estudio, teniendo como caudal promedio (Q = 70 L s⁻¹) y una población servida de 45000 habitantes.

Tabla 6. Cargas másicas (mg/día) de las sustancias y metabolitos de estudio en el sitio Armenia.

Muestras	Muestreo	Fecha	ID	Sustancias y Metabolitos			
				BE	CO	THC-A	THC
1	M1	06-nov-20	AP001	60	60	60	6048
2	M2	13-nov-20	AP012	42336	19958	60	6048
3	M3	21-nov-20	AC003	50803	5443	60	6048
4	M7	27-dic-20	AC007	387072	40763520	60	6048
5	M2	13-nov-20	AP004	30240	1210	60	605
6	M2	13-nov-20	AP010	60	2419	60	6048
7	M2	13-nov-20	AP008	22378	4838	60	6048
8	M7	27-dic-20	AP062	13910	2419	60	6048
9	M2	13-nov-20	AP009	38707	12701	60	6048
10	M4	28-nov-20	AC004	43546	4838	2290378	25402
11	M5	10-dic-20	AC005	60	1814	61085	6048
12	M6	19-dic-20	AC006	5443200	21833280	8467	605
13	M2	13-nov-20	AP007	39917	3024	60	6048
Promedios ^a				38275	7430	60	6048

°Para efectos de comparación con otros estudios y ciudades se tomaron los valores uniformizados y sin eventos.

A partir de las cargas máxicas en mg/día (tabla 6) se calcula las cargas normalizadas en mg/día/1000 habitantes de la población de Armenia teniendo en cuenta los factores de corrección de 2.33 para CO y BE y 152 para THC-A y los porcentajes de droga excretada de 0.42 para CO y BE y 0.006 para THC-A. (tabla 7)

Tabla 7. Cargas máxicas normalizadas (mg/día/1000 habitantes) para las sustancias y metabolitos CO, BE y THC-A del sitio Armenia.

Muestras	Muestro	Fecha	ID	Sustancias y Metabolitos		
				BE	CO	THC-A
1	M1	06-nov-20	AP001	1	1	1.2
2	M2	13-nov-20	AP012	921	434	1.2
3	M3	21-nov-20	AC003	1105	118	1.2
4	M7	27-dic-20	AC007	8418	886471	1.2
5	M2	13-nov-20	AP004	658	26	1.2
6	M2	13-nov-20	AP010	1	53	1.2
7	M2	13-nov-20	AP008	487	105	1.2
8	M7	27-dic-20	AP062	303	53	1.2
9	M2	13-nov-20	AP009	842	276	1.2
10	M4	28-nov-20	AC004	947	105	46418.3
11	M5	10-dic-20	AC005	1	39	1238.0
12	M6	19-dic-20	AC006	118371	474801	171.6
13	M2	13-nov-20	AP007	868	66	1.2
Promedios ^a				832	162	1.2

°Para efectos de comparación con otros estudios y ciudades se tomaron los valores uniformizados y sin eventos.

Finalmente, y partir de las cargas normalizadas (mg/día/1000 habitantes) del metabolito más estable para la cocaína ósea la BE (tabla 7) y multiplicando por su factor de transformación equivalente a 3.59, se estima el consumo de cocaína (mg/día/1000 habitantes) en el sitio de Armenia (tabla 8)

Tabla 8. Retrocalculos de estimación de consumo de cocaína a partir de la carga normalizada de BE (mg/día /1000 habitantes) para el sitio de Armenia.

Muestras	Muestreo	Fecha	ID	CO
1	M1	06-nov-20	AP001	5
2	M2	13-nov-20	AP012	3305
3	M3	21-nov-20	AC003	3966
4	M7	27-dic-20	AC007	30219
5	M2	13-nov-20	AP004	2361
6	M2	13-nov-20	AP010	5
7	M2	13-nov-20	AP008	1747
8	M7	27-dic-20	AP062	1086
9	M2	13-nov-20	AP009	3022
10	M4	28-nov-20	AC004	3400
11	M5	10-dic-20	AC005	5
12	M6	19-dic-20	AC006	424954
13	M2	13-nov-20	AP007	3116
Promedio ^a				2988

^aPara efectos de comparación con otros estudios y ciudades se tomaron los valores uniformizados y sin eventos.

6.4.2. Resultados COLECTOR Pereira

Sobre el modelo de cálculo descrito en la sección anterior, ahora se describe para la ciudad de Pereira y según las muestras de referencia y sus concentraciones en $\mu\text{g L}^{-1}$ (tabla 5), para este sitio de estudio (muestras con código P), en la tabla 6, las cargas máscas para las sustancias y metabolitos de estudio, teniendo como caudal promedio ($Q = 1245 \text{ L s}^{-1}$) y una población servida de 277000 habitantes.

Tabla 9. Cargas máxicas (mg/día) de las sustancias y metabolitos de estudio en el sitio Pereira.

Muestras	Muestreo	Fecha	ID	Sustancias y Metabolitos			
				BE	CO	THC-A	THC
1	M2	13-nov-20	PP008	3.5	0.4	0.01	1
2	M1	6-nov-20	PP001	5.7	2.1	0.01	1
3	M2	13-nov-20	PC002	0.01	0.01	0.01	1
4	M2	13-nov-20	PP004	0.01	0.1	0.01	1
5	M2	13-nov-20	PP009	2.5	0.4	0.01	1
6	M7	27-dic-20	PP090	700	14340	0.01	0.1
7	M7	27-dic-20	PP079	470	5940	0.01	1
8	M6	19-dic-20	PC006	17.5	35.7	0.01	1
9	M5	10-dic-20	PC005	2.9	0.7	350	3.9
10	M2	13-nov-20	PP006	3.2	0.5	2.1	1
11	M4	28-nov-20	PC004	0.01	0.2	0.01	1
12	M2	13-nov-20	PP016	0.01	0.2	0.01	1
Promedios ^a				3.6	0.8	0.5	1.6

^aPara efectos de comparación con otros estudios y ciudades se tomaron los valores uniformizados y sin eventos.

A partir de las cargas máxicas en mg/día (tabla 9) se calcula las cargas normalizadas en mg/día/1000 habitantes de la población de Pereira teniendo en cuenta los factores de corrección de 2.33 para CO y BE y 152 para THC-A y los porcentajes de droga excretada de 0.42 para CO y BE y 0.006 para THC-A. (tabla 10)

Tabla 10. Cargas másicas normalizadas (mg/día/1000 habitantes) para las sustancias y metabolitos CO, BE y THC-A del sitio Pereira.

Muestras	Muestro o	Fecha	ID	Sustancias y Metabolitos		
				BE	CO	THC-A
1	M2	13-nov-20	PP008	1330	152	4
2	M1	6-nov-20	PP001	2166	798	4
3	M2	13-nov-20	PC002	4	4	4
4	M2	13-nov-20	PP004	4	38	4
5	M2	13-nov-20	PP009	950	152	4
6	M7	27-dic-20	PP090	266013	544945 7	4
7	M7	27-dic-20	PP079	178608	225730 6	4
8	M6	19-dic-20	PC006	6650	13567	4
9	M5	10-dic-20	PC005	1102	266	123954
10	M2	13-nov-20	PP006	1216	190	744
11	M4	28-nov-20	PC004	4	76	4
12	M2	13-nov-20	PP016	4	76	4
Promedios ^a				1353	312	4

^aPara efectos de comparación con otros estudios y ciudades se tomaron los valores uniformizados y sin eventos.

Finalmente, y partir de las cargas normalizadas (mg/día/1000 habitantes) del metabolito más estable para la cocaína ósea la BE (tabla 10) y multiplicando por su factor de transformación equivalente a 3.59, se estima el consumo de cocaína (mg/día/1000 habitantes) en el sitio de Pereira (tabla 11).

Tabla 11. Retrocálculos de estimación de consumo de cocaína a partir de la carga normalizada de BE (mg/día /1000 habitantes) para el sitio de Pereira.

Muestras	Muestreo	Fecha	ID	CO
1	M2	13-nov-20	PP008	4775
2	M1	6-nov-20	PP001	7776
3	M2	13-nov-20	PC002	14
4	M2	13-nov-20	PP004	14
5	M2	13-nov-20	PP009	3411
6	M7	27-dic-20	PP090	954985
7	M7	27-dic-20	PP079	641204
8	M6	19-dic-20	PC006	23875
9	M5	10-dic-20	PC005	3956
10	M2	13-nov-20	PP006	4366
11	M4	28-nov-20	PC004	14
12	M2	13-nov-20	PP016	14
Promedio ^a				4857

^aPara efectos de comparación con otros estudios y ciudades se tomaron los valores uniformizados y sin eventos.

6.4.3. Resultados PTAR Hospital Santa Sofia Manizales

Finalmente y, como un caso de estudio con particular interés por posible sitio de modelamientos futuros y usando el modelo de cálculo de la sección 8.4, en adelante se describe para este caso especial de estudio (Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Hospital) en la ciudad de Manizales y según las muestras de referencia y sus concentraciones en $\mu\text{g L}^{-1}$ (tabla 5), para este sitio de estudio

(muestras con código M), en la tabla 12, las cargas másicas para las sustancias y metabolitos de estudio, teniendo como caudal promedio ($Q = 0.2 \text{ Ls}^{-1}$) y una población servida de 779 personas.

Tabla 12. Cargas másicas (mg/día) de las sustancias y metabolitos de estudio en el sitio PTAR hospital en Manizales.

Muestras	Muestreo	Fecha	ID	Sustancias y Metabolitos			
				BE	CO	THC-A	THC
1	M5	10-dic-20	MC00 5	8749	28255	0.2	2
2	M2	13-nov- 20	MP012	15	5	0.2	17
3	M2	13-nov- 20	MP013	0	2	0.2	17
4	M2	13-nov- 20	MP007	14	3	0.2	17
5	M3	21-nov- 20	MP023	9	3	0.2	17
6	M2	13-nov- 20	MP009	12425	104338	0.2	2
7	M1	06-nov- 20	MC00 1	0	5	0.2	17
8	M1	6-nov-20	MP004	7	3	0.2	17
9	M2	13-nov- 20	MP016	5	3	0.2	17
10	M2	13-nov- 20	MP010	22	7	0.2	17
11	M1	06-nov- 20	MP002	2	7	0.2	17
12	M4	28-nov- 20	MC00 4	14	9	0.2	17
13	M2	13-nov- 20	MP015	7	9	0.2	17
14	M6	16-dic-20	MC00 6	33531	367309	687.6	20
15	M1	06-nov- 20	MP003	10	3	156.6	17

16	M2	13-nov-20	MP006	17	3	18.7	17
17	M3	21-nov-20	MC003	9	7	0.2	17
18	M2	13-nov-20	MP017	5	5	0.2	17
19	M3	21-nov-20	MP018	9	5	0.2	17
20	M1	06-nov-20	MP001	5	3	0.2	17
Promedios ^a				11	5	14	17

^aPara efectos de comparación con otros estudios y ciudades se tomaron los valores uniformizados y sin eventos.

A partir de las cargas máxicas en mg/día (tabla 12) se calcula las cargas normalizadas en mg/día/1000 habitantes de la población usuaria del hospital de Manizales teniendo en cuenta los factores de corrección de 2.33 para CO y BE y 152 para THC-A y los porcentajes de droga excretada de 0.42 para CO y BE y 0.006 para THC-A. (tabla 13).

Tabla 13. Cargas máxicas normalizadas (mg/día/1000 habitantes) para las sustancias y metabolitos CO, BE y THC-A del sitio PTAR hospital en Manizales.

Muestras	Muestro	Fecha	ID	Sustancias y Metabolitos		
				BE	CO	THC-A
1	M5	10-dic-20	MC005	10990	35494	0.2
2	M2	13-nov-20	MP012	19	6	0.2
3	M2	13-nov-20	MP013	0	2	0.2
4	M2	13-nov-20	MP007	17	4	0.2
5	M3	21-nov-20	MP023	11	4	0.2
6	M2	13-nov-20	MP009	15609	131071	0.2

7	M1	06-nov-20	MC001	0	6	0.2
8	M1	6-nov-20	MP004	9	4	0.2
9	M2	13-nov-20	MP016	6	4	0.2
10	M2	13-nov-20	MP010	28	9	0.2
11	M1	06-nov-20	MP002	2	9	0.2
12	M4	28-nov-20	MC004	17	11	0.2
13	M2	13-nov-20	MP015	9	11	0.2
14	M6	16-dic-20	MC006	42122	461423	805.0
15	M1	06-nov-20	MP003	13	4	183.3
16	M2	13-nov-20	MP006	21	4	21.9
17	M3	21-nov-20	MC003	11	9	0.2
18	M2	13-nov-20	MP017	6	6	0.2
19	M3	21-nov-20	MP018	11	6	0.2
20	M1	06-nov-20	MP001	6	4	0.2
Promedios ^a				14	7	0.2

^aPara efectos de comparación con otros estudios y ciudades se tomaron los valores uniformizados y sin eventos.

Finalmente, y partir de las cargas normalizadas (mg/día/1000 habitantes) del metabolito más estable para la cocaína ósea la BE (tabla 13) y multiplicando por su factor de transformación equivalente a 3.59, se estima el consumo de cocaína (mg/día/1000 habitantes) en el sitio de la planta de tratamiento de aguas residuales de hospital en Manizales (tabla 14)

Tabla 14. Retrocálculos de estimación de consumo de cocaína a partir de la carga normalizada de BE (mg/día /1000 habitantes) para el sitio de la planta de tratamiento de aguas residuales de hospital en Manizales.

Muestras	Muestreo	Fecha	ID	CO
1	M5	10-dic-20	MC005	39455
2	M2	13-nov-20	MP012	69
3	M2	13-nov-20	MP013	1
4	M2	13-nov-20	MP007	61
5	M3	21-nov-20	MP023	38
6	M2	13-nov-20	MP009	56036
7	M1	06-nov-20	MC001	1
8	M1	6-nov-20	MP004	31
9	M2	13-nov-20	MP016	23
10	M2	13-nov-20	MP010	100
11	M1	06-nov-20	MP002	8
12	M4	28-nov-20	MC004	61
13	M2	13-nov-20	MP015	31
14	M6	16-dic-20	MC006	151220
15	M1	06-nov-20	MP003	46
16	M2	13-nov-20	MP006	77

17	M3	21-nov-20	MC003	38
18	M2	13-nov-20	MP017	23
19	M3	21-nov-20	MP018	38
20	M1	06-nov-20	MP001	23
Promedio ^a				49

^aPara efectos de comparación con otros estudios y ciudades se tomaron los valores uniformizados y sin eventos.

6.4.4 Comparación en el tiempo de valores de cargas normalizadas de BE y CO en los tres sitios de estudio

De estas estimaciones de consumo de drogas psicoactivas en la región del Eje Cafetero, se puede concluir que el mayor consumo medio trimestral de cocaína CO a partir de la carga de su principal metabolito BE (ver figura 9) se observó en Pereira con 4857 mgCO/día/1000hab seguido de Armenia con 2988 mgCO/día/1000hab y Manizales (modelado en el Hospital) con 49 mgCO/día/1000hab, Pereira presentó valores mayores que Medellín con 3022 mgCO/día/1000hab y Bogotá con 742 mgCO/día/1000hab según el estudio de Bijlsma et al. realizado en 2016[93], y los valores de consumo de CO en mg CO/día/1000hab en Armenia (2988) son mayores que los valores mostrados en Bogotá (742) pero comparables con los de Medellín (3022).

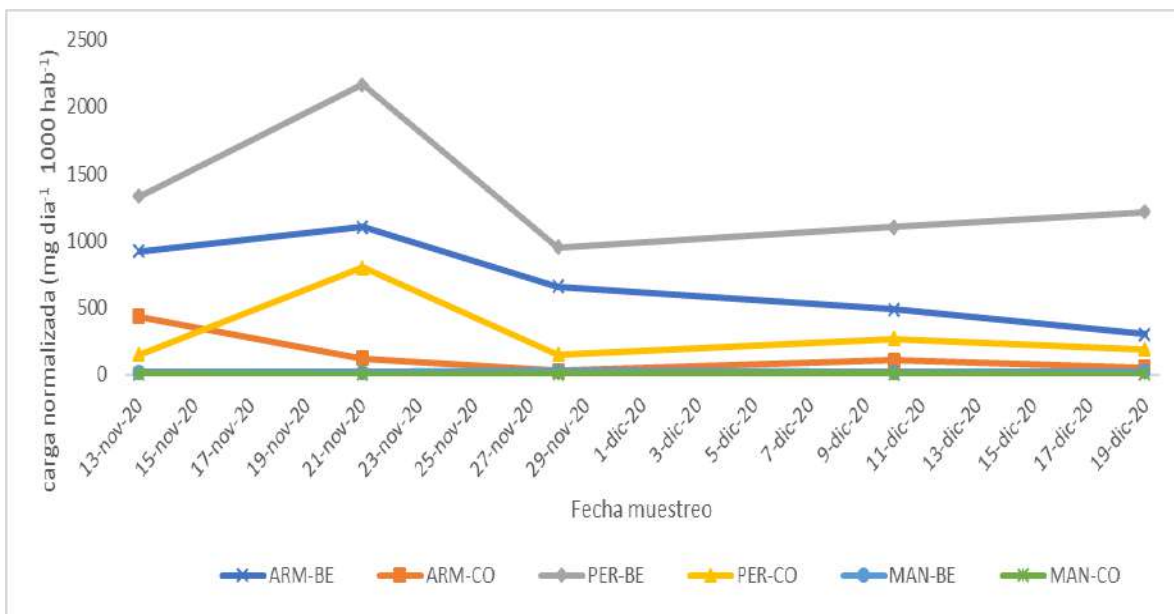


Figura 9. Cargas normalizadas (mg/día/1000 hab) de benzoilecgonina BE y cocaína CO en los tres sitios de muestreo durante dos meses consecutivos.

La figura 9 y las tablas 7, 10 y 13 muestran las cargas masivas diarias normalizadas de cocaína y BE, las cargas másicas normalizadas de cocaína y BE se mantuvieron algo estables durante los dos meses de estudio con sólo un ligero aumento en las muestras del 21 de noviembre (puente festivo). Esto reflejaría que los consumidores toman esta droga de abuso con regularidad y no solo durante los puentes y fines de semana y está en contraste con otros estudios, donde las cargas más altas fueron claramente encontradas para BE durante los fines de año en comparación con los otros meses del año.

6.4.5 Comparativo consumo de cocaína en el mundo y el Eje Cafetero

En comparación con un amplio estudio realizado en 42 ciudades de 21 países europeos [93], con informes de datos de tres años consecutivos 2011-2013, el promedio de cargas de BE en Bogotá (207 mg/día/1000 habitantes) es similar al de ciudades europeas como Bruselas, Castellón, Milán, París y Santiago de Compostela, y más bajas que Ámsterdam, Barcelona, Londres, Valencia o Zúrich, todas con cargas medias diarias por encima de 400 mg/día/1000 habitantes. Por el contrario, las cargas medias de BE en Armenia (832 mg/día/1000 habitantes) es superior a todos los estudios de ciudades europeas, con la única excepción del valor encontrado en Amberes (Bélgica) en 2013 que fue del mismo orden. Al comparar estos datos con países o ciudades de fuera de Europa, el consumo de cocaína en Australia, Corea del Sur y China fue menor que Armenia y Pereira, mientras que las cargas promedio de BE en Brasil y Martinica (aproximadamente 450 mg/día/1000 habitantes), fueron más altos que en Bogotá, pero en general no superaron los observados en Armenia, ni Pereira (1353 mg/día/1000 habitantes) con un consumo superior que en todas las ciudades aquí comparadas.

Según Hernández [93], una causa se debe a que Colombia es conocida como uno de los principales países productores de cocaína y la pureza de la cocaína callejera es seguramente mayor en comparación a Europa (promedio en 2013, 20-60%) y EE.UU. (promedio en 2009, 50%), ya que los niveles de pureza tienden a disminuir a lo largo del tráfico de la cadena. Por lo tanto, tal vez no sea sorprendente que sea la droga con mayor prevalencia en Pereira, Armenia y Medellín.

7. RUTAS METABÓLICAS DE LAS DROGAS PSICOACTIVAS DE INTERÉS

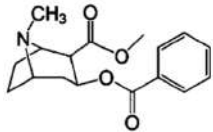
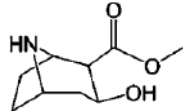
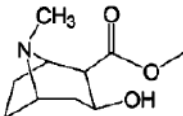
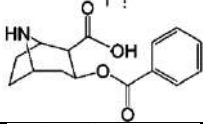
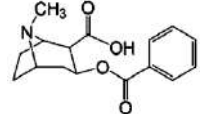
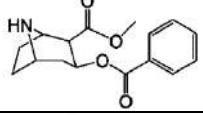
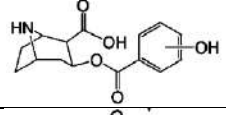
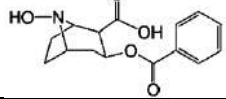
7.1. Rutas metabólicas de la cocaína

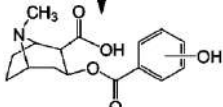
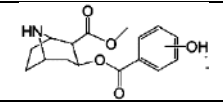
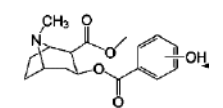
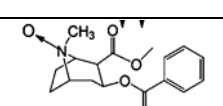
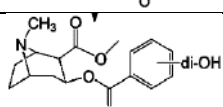
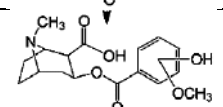
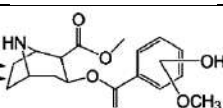
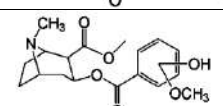
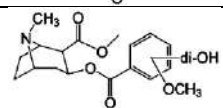
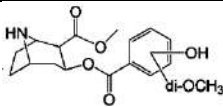
En la tabla 6, se muestran todos los subproductos metabólicos de la cocaína que han sido reportados, poseen sus fórmulas moleculares, [M+H] en análisis de LC-MS/MS y de los más estudiados que servirán para programar los análisis de las muestras recolectadas en el LC-Orbitrap y de algunos metabolitos se reporta el pico base y fragmentos más representativos, como su estructura orgánica encontrados en la literatura. Luego en las figuras 10-12 se encuentran imágenes que muestran la fragmentación de los metabolitos en el hígado, las cuales se

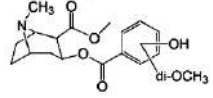
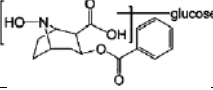
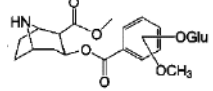
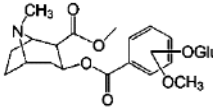
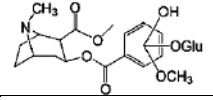
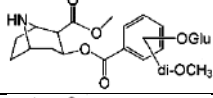
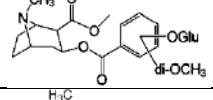
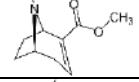
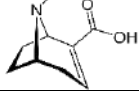
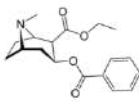
procurará unificar, pero aún no se ha podido encontrar un programa que permita dibujarlas tal cual se reportan en estas rutas.

El proceso de eliminación de la cocaína se realiza en el hígado, donde se generan subproductos metabólicos por la acción del citocromo P450, las carboxilesterasas hepáticas (hCE-1 y hCE-2) [96] y la butirilcolinesterasa sérica (hBChE) que catalizan reacciones de transesterificación en la formación de cocaetilo (Figura 10) cuando una persona consume alcohol [97], hidrólisis de ésteres para la formación de ecgonina, benzoilecgonina y éster metílico de ecgonina. N-oxidación y N-hidroxilación para la formación de norcocaína, N-hidroxicocaína y nitróxido de cocaína, y glucoronidación y glucosidación para la formación de la serie de glucorónidos (Figura 11) que han sido los últimos metabolitos descritos como productos de transformación de la cocaína [98]. Productos como el metil de ecgonidina se obtiene por la pirolisis de la cocaína cuando es fumada y este a su vez, sufre hidrólisis produciendo ecgonidina (Figura 12) [99]. En el estado del arte se han llegado a reportar entre 11 a 41 metabolitos presentes en la orina, siendo los más abundantes el benzoilecgonina que se produce por la desmetilación del 40-45% de la cocaína presente en el hígado por acción de la hCE-1 y el éster metílico de ecgonina que se obtiene por la hidrólisis del 40% de la cocaína o de otros subproductos como la norcocaína y el cocaetilo por intervención de la hBChE [100].

Tabla 15. Subproductos metabólicos de la cocaína reportados.

No.	Metabolitos	Formula	[M+H] ⁺	Pico base	m/z	Molécula	Referencia
I	Cocaine	C ₁₇ H ₂₁ NO ₄	304,1549	182.1	82, 105.1, 150, 182.1, 256.1 304,1		[98, 100]
II	Norecgonine methyl ester	C ₉ H ₁₅ NO ₃	186,113	136.1			[98]
III	Ecgonine methyl ester	C ₁₀ H ₁₇ NO ₃	200,1287	182.1/82	93, 108.2, 122.2, 150.2, 182.3, 200.2		[98, 101]
IV	Benzoylnorecgonine	C ₁₅ H ₁₇ NO ₄	276,1236				[98]
V	Benzoylecgonine	C ₁₆ H ₁₉ NO ₄	290,1392	168.3	82, 105.2, 122.1, 150.2, 168.3, 290.2		[98,100-101]
VI	Norcocaine	C ₁₆ H ₁₉ NO ₄	290,1392	168.2	105.2, 136.1, 168.2, 290.3		[98,100-101]
VII	Hydroxybenzoylnorecgonine	C ₁₅ H ₁₇ NO ₅	292,1185				[98]
VIII	N-Hydroxybenzoylnorecgonine	C ₁₅ H ₁₇ NO ₅	292,1185				[98]

IX	p-, m-Hydroxybenzoylecgonine	C ₁₆ H ₁₉ NO ₅	306,1341		168, 121.1, 150,1		[98, 102]
X	p-, m-Hydroxynorcocaine	C ₁₆ H ₁₉ NO ₅	306,1341		168, 136, 121.1		[98, 102]
XI	p-, m-Hydroxycocaine	C ₁₇ H ₂₁ NO ₅	320,1498		meta: 182, 121.1, 93/para:182.0, 121.1, 200		[98, 102]
XII	Cocaine-N-oxide	C ₁₇ H ₂₁ NO ₅	320,1498				[98]
XIII–XIV	Dihydroxycocaine	C ₁₇ H ₂₁ NO ₆	336,1447				[98]
XV–XVI	Hydroxymethoxybenzoylecgonine	C ₁₇ H ₂₁ NO ₆	336,1447				[98]
XVII–XVIII	Hydroxymethoxynorcocaine	C ₁₇ H ₂₁ NO ₆	336,1447				[98]
XIX–XX	Hydroxymethoxycocaine	C ₁₈ H ₂₃ NO ₆	350,1604				[98]
XXI–XXIII	Dihydroxymethoxycocaine	C ₁₈ H ₂₃ NO ₇	366,1553				[98]
XXIV– XXVI	Hydroxydimethoxynorcocaine	C ₁₈ H ₂₃ NO ₇	366,1553				[98]

XXVII– XXVIII	Hydroxydimethoxycocaine	$C_{19}H_{25}NO_7$	1000,1709				[98]
XXIX	N-hydroxybenzoylnorecgonine glucoside	$C_{21}H_{27}NO_{10}$	454,1713				[98]
XXX–XXXII	Hydroxymethoxynorcocaine glucuronide	$C_{23}H_{29}NO_{12}$	512,1768				[98]
XXXIII– XXXIV	Hydroxymethoxycocaine glucuronide	$C_{24}H_{31}NO_{12}$	526,1925				[98]
XXXV– XXXVIII	Dihydroxymethoxycocaine glucuronide	$C_{24}H_{31}NO_{13}$	542,1874				[98]
XXXIX– XXXX	Hydroxydimethoxynorcocaine glucuronide	$C_{24}H_{31}NO_{13}$	542,1874				[98]
XXXXI– XXXXII	Hydroxydimethoxycocaine glucuronide	$C_{25}H_{33}NO_{13}$	556,203				[98]
Producto de pirólisis (Cocaína fumada)	Methyl ecgonidine	$C_{10}H_{15}NO_2$	181,2316				[99]
	Ecgonidine	$C_9H_{13}NO_2$	167,205				[99]
Consumo de cocaína y alcohol (muy tóxico)	Cocaethylene	$C_{18}H_{23}NO_4$	318,2	196,1	196.1, 82		[97, 99, 103-105]

	Norcocaethylene	$C_{17}H_{21}NO_4$	304,2	182,1		[96, 103-104]
	Ecgonine ethyl ester (EEE)	$C_{11}H_{19}NO_3$	214,1	196,1		[96, 101, 103-104]
	Ecgonine (ECG)	$C_9H_{15}NO_3$	186,1	168,1		[96,103]
	Norecgonine ethyl ester (NEEE)	$C_{10}H_{17}NO_3$	200,1	182,1		[96, 101, 103]

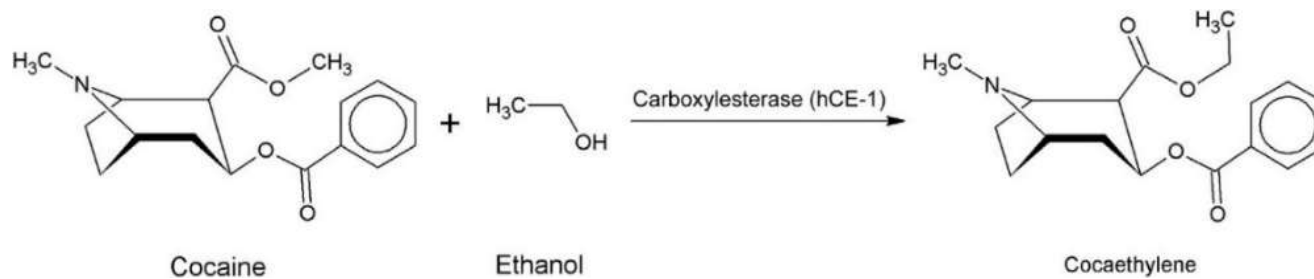


Figura 10. Transformación metabólica de la cocaína en presencia de etanol. Fuente: [103]

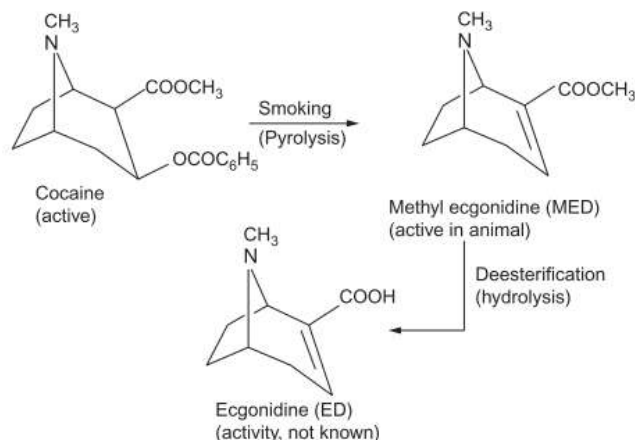


Figura 12. Subproducto de la pirolisis de la cocaína. Fuente:[99]

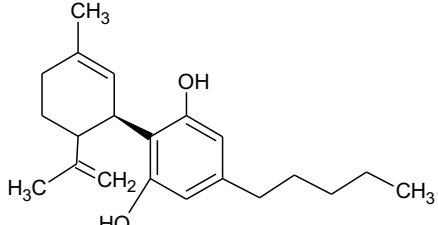
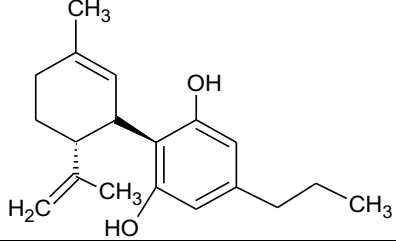
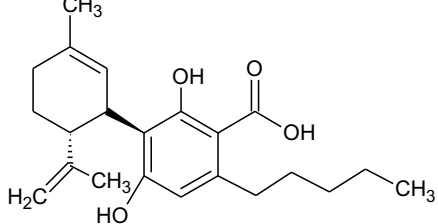
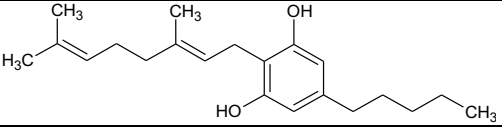
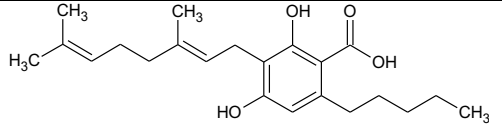
7.2. Rutas metabólicas del cannabis (figura 13)

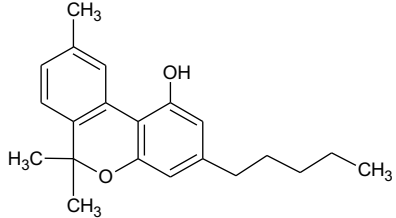
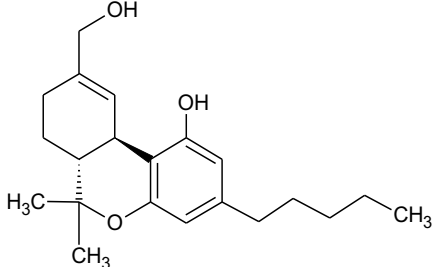
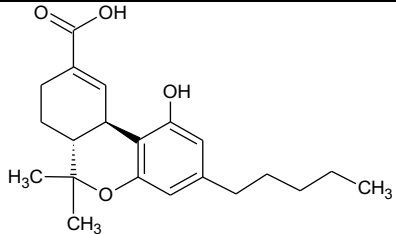
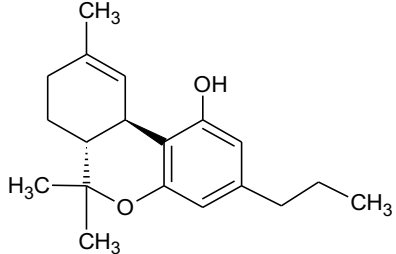
El Cannabis sativa contiene más de 421 metabolitos diferentes (más importantes ver tabla 7), incluidos más de 60 fitocannabinoides [106]. Al ingresar al cuerpo humano son metabolizados en el hígado por acción del citocromo P450 (CYP) en fase I con el objetivo de aumentar la polaridad de estos compuestos [107]. El Δ 9-tetrahidrocannabinol (Δ 9-THC) y el cannabidiol (CBD) son los fitocannabinoides más abundantes que se producen en la planta por la descarboxilación del ácido Δ 9-tetrahidrocannabinólico (THCA) y ácido cannabidiólico (CBDA) respectivamente [108]. El primero posee efectos psicoactivos y el segundo ha sido asociado con una amplia actividad terapéutica, estos compuestos sufren primero una hidroxilación en diferentes posiciones del fitocannabinoide y posteriormente una oxidación por acción de las isoenzimas 2C9 y 2C19 del citocromo P450 (CYP) [109]. En el caso del Δ 9-THC la reacción inicial de hidroxilación ocurre típicamente en posición C11, formando el metabolito activo 11-hidroxi- Δ 9-tetrahidrocannabinol (11-OH-THC) [110]. Este metabolito tiene una vida media relativamente corta y se oxida para formar el 11-oxo-THC, que es un compuesto intermediario que posteriormente se transformara en el metabolito inactivo (no psicoactivo) que es el ácido 11-nor-9-carboxi-delta-9-tetrahidrocannabinol (THC-COOH) [111-112], siendo este el último paso en la fase I del metabolismo de los humanos.

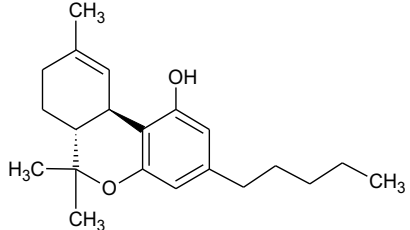
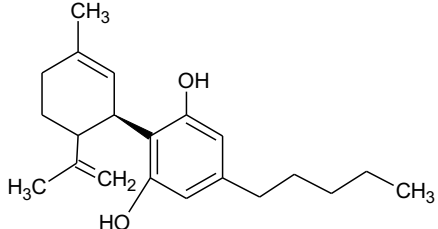
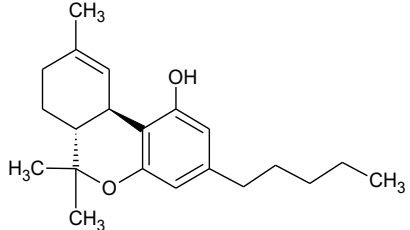
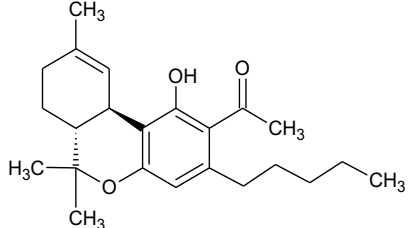
Los compuestos endocannabinoides obtenido en la fase I antes de ser excretados sufren una conjugación con el ácido glucurónico catalizado por la enzima uridina 5'-difosfo-glucuronosiltransferasa (UGT) [109,112]. La glucuronidación puede ocurrir en dos posiciones diferentes, ya sea en el resto fenólico obteniendo éteres glucurónidos como es el caso del THC- glucurónido o en la parte ácida formando ésteres glucurónidos como el THC-COOH- glucurónido [113], facilitando que los glucurónidos de cannabinoides obtenidos in vivo se puedan excretar fácilmente a través de la orina, pero aún se desconoce la actividad farmacológica de estos glucurónidos [107].

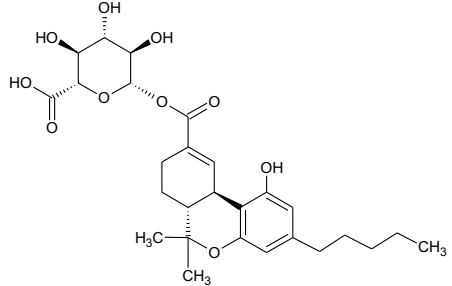
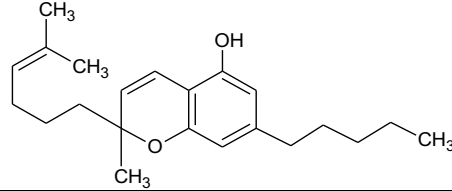
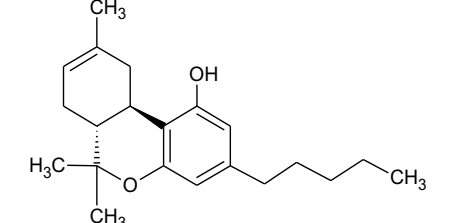
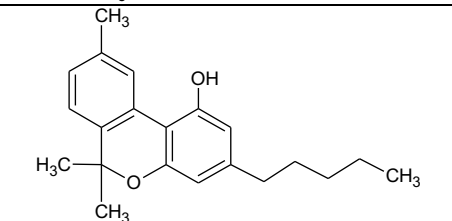
Tabla 16. Cannabinoides estudiados por LC/MS/MS.

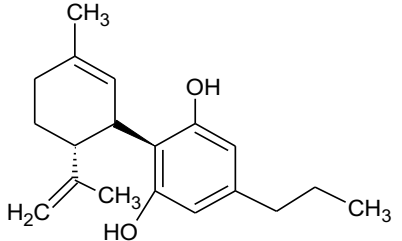
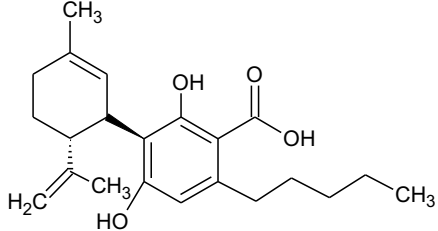
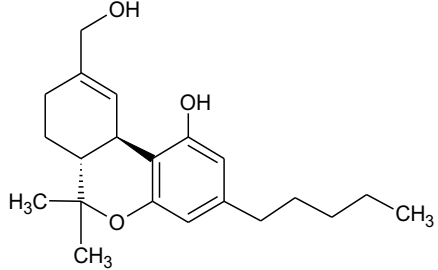
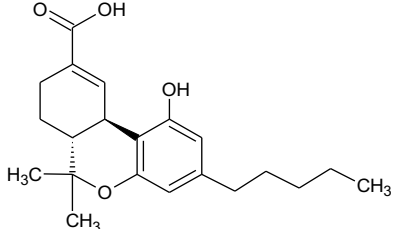
Metabolitos	Formula	Modo	Q1	Q3	Molécula	Referencia
6-alfa-hidroxicannabidiol	6- α -OH-CBD	[MH] ⁻	329.15	158,2 / 173,1		[114]
ácido cannabidiol-7-oico	7-COOH-CBD	[MH] ⁻	343,1	179.15 / 231,2		[114]
7-hidroxicannabidiol	7-OH-CBD	[MH] ⁻	329,1	261.2 / 268,1		[114]
6-beta-hidroxicannabidiol	6- β -OH-CBD	[MH] ⁻	329.05	158,1 / 173,15		[114]
Cannabicromeno	CBC	[MH] ⁻	313.14	191.21 / 179,21		[107]

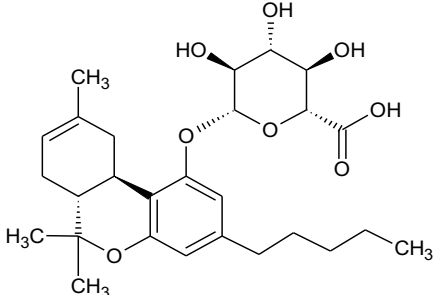
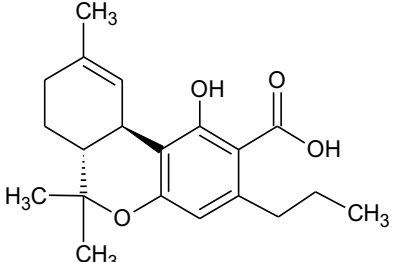
Cannabidiol	CBD	[MH]-	313,39	245,29 / 106,9 / 179,21		[107, 109, 111, 115- 117]
Cannabidivarina	CBDV	[MH]-	285,34	217,27 / 151,20		[107]
Ácido cannabidiólico	CBDA	[MH]-	357,27	245,29 / 179,21		[107]
Cannabigerol	CBG	[MH]-	315,14	136,19 / 191,27		[107,117]
Ácido cannabigerólico	CBGA	[MH]-	359,32	341,29 / 315,48		[107]

Cannabinol	CBN	[MH]-	309.21	222.28 / 279,29		[107, 111, 115-117]
11-hidroxi- Δ -9-tetrahydrocannabinol	11-OH- Δ -9-THC	[MH]-	329.20	311,43 / 173,1 / 268,29		[107, 109, 117]
11-nor-9-carboxi-tetrahydrocannabinol	THC-COOH	[MH]-	343,33	299,41 / 191,0 / 245,28		[107, 109, 115-120]
Δ -9-tetrahydrocannabivarina	Δ -9-THCV	[MH]-	285,26	217,34 / 163,20		[107]

Δ -9-tetrahydrocannabinol	Δ -9-THC	[M+H] ⁺	315,5	193,2 / 92,4 / 123,1 / 259,2 / 135,1		[108-109, 118-119, 121-122]
Cannabidiol	CBD	[M+H] ⁺	315,2	193,2/123,1/259,2		[108, 118, 120, 122]
Δ -9-tetrahydrocannabinol	Δ -9-THC	[MH] ⁻	313,10	245,1/191,1		[111, 115-117, 123]
Ácido Δ -9-tetrahydrocannabinólico	THCA	[MH] ⁻	343,10	244,9/191,0		[116]

THC-COOH-glucurónico	THC-COOH-gluc	[MH] ⁻	519,4	343,2 / 299,1 / 268,0	 <p>The structure shows a central benzene ring with a hydroxyl group at the 1-position and a pentyl chain at the 5-position. At the 2-position, there is a pyran ring with a methyl group at the 3-position and a methyl group at the 4-position. Attached to the 6-position of the pyran ring is a glucose molecule with a carboxylic acid group at the 1-position and hydroxyl groups at the 2, 3, and 6 positions.</p>	[109]
Cannabicromeno	CBC	[M+H] ⁺	315	193	 <p>The structure shows a central benzene ring with a hydroxyl group at the 1-position and a pentyl chain at the 5-position. At the 2-position, there is a pyran ring with a methyl group at the 3-position and a methyl group at the 4-position. A propyl chain is attached to the 6-position of the pyran ring.</p>	[108]
Δ 8-tetrahydrocannabinol	Δ 8-THC	[M+H] ⁺	315	193	 <p>The structure shows a central benzene ring with a hydroxyl group at the 1-position and a pentyl chain at the 5-position. At the 2-position, there is a pyran ring with a methyl group at the 3-position and a methyl group at the 4-position. A propyl chain is attached to the 6-position of the pyran ring.</p>	[108]
Cannabinol	CBN	[M+H] ⁺	311	195	 <p>The structure shows a central benzene ring with a hydroxyl group at the 1-position and a pentyl chain at the 5-position. At the 2-position, there is a pyran ring with a methyl group at the 3-position and a methyl group at the 4-position. A propyl chain is attached to the 6-position of the pyran ring.</p>	[108]

Cannabidivarina	CBDV	[M+H] ⁺	287	165		[108]
Ácido cannabidiólico	CBDA	[M+H] ⁺	341	219		[108]
11-hidroxi-Δ9-THC	11-OH-Δ9-THC	[M+H] ⁺	331	193		[108]
11-Nor-9-Δ9-THC	THC-COOH	[M+H] ⁺	345	193		[108]

THC-glucurónico	THC-gluc	[MH]-	489,1	313,2 / 175,0		[117]
Ácidos Δ-9-tetrahydrocannabivarina	THCV-COOH	[MH]-	315,0	271,1 / 217,0		[117]

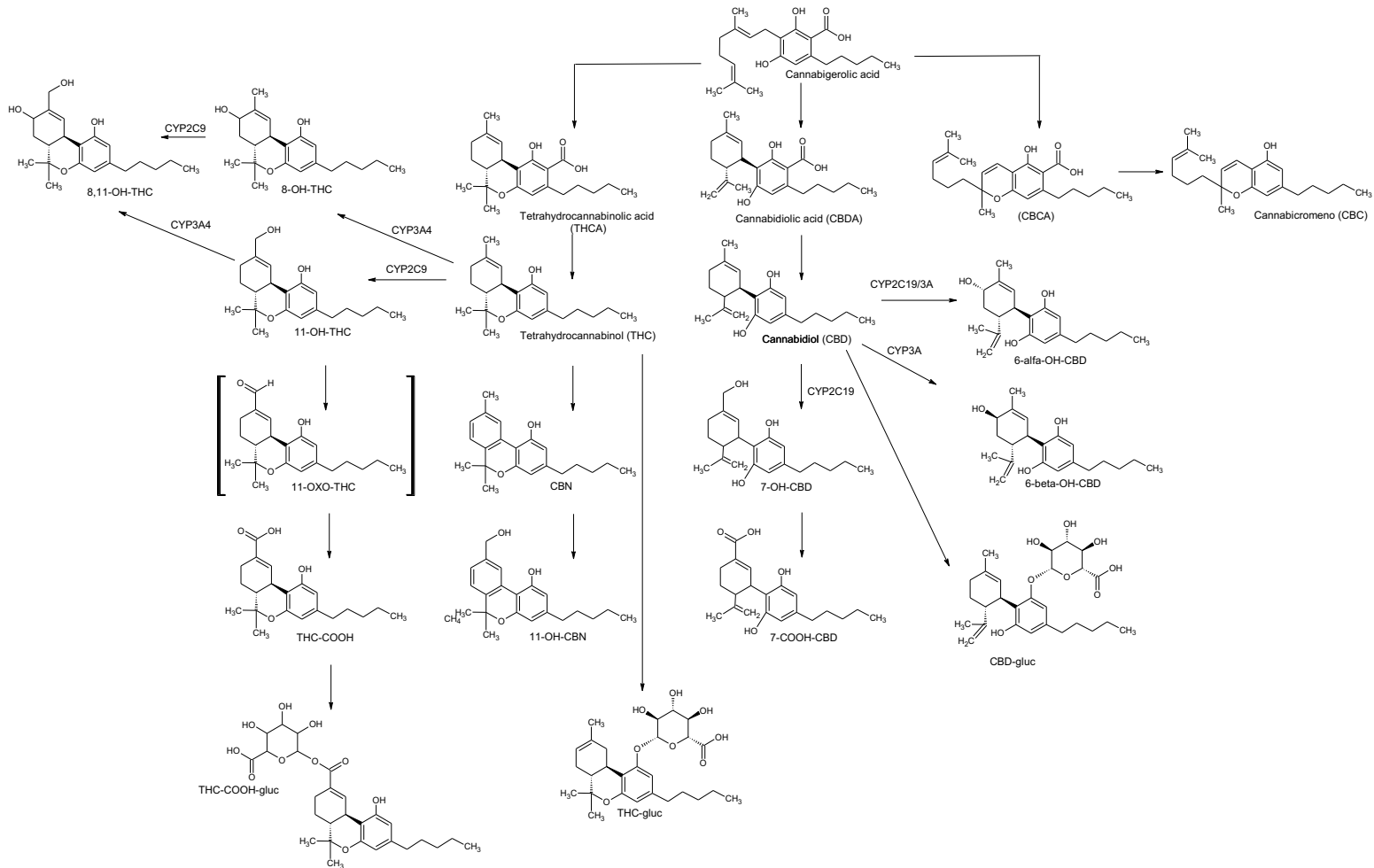
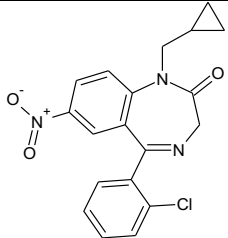
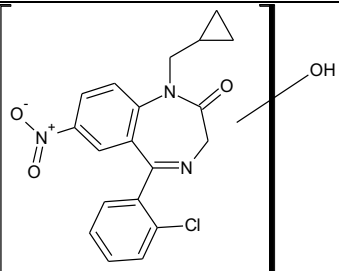
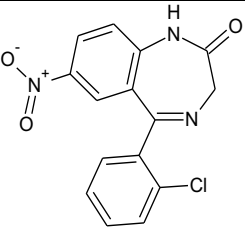
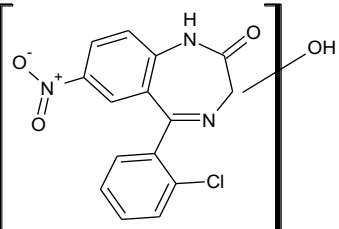


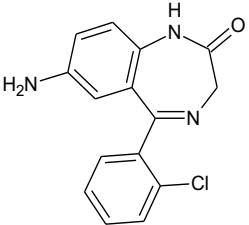
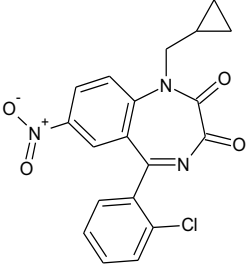
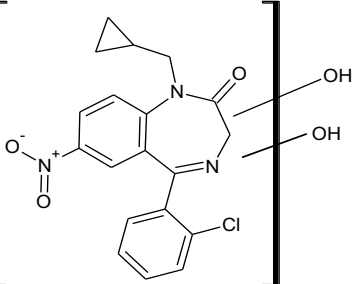
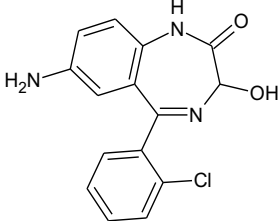
Figura 13. Ruta del metabolismo de los cannabinoides.

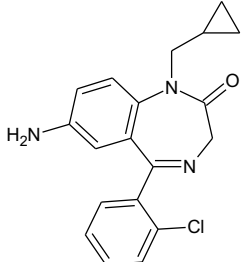
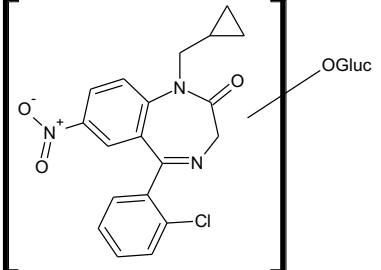
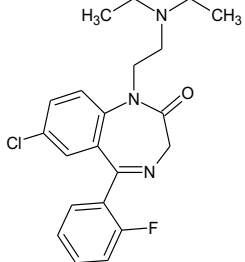
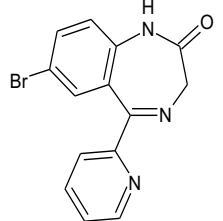
7.3. Rutas metabólicas de las benzodiazepinas (figura 14)

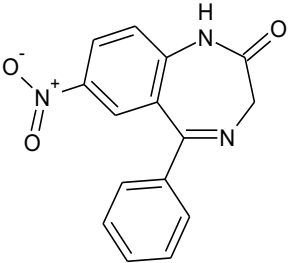
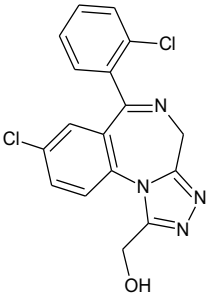
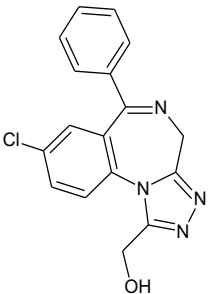
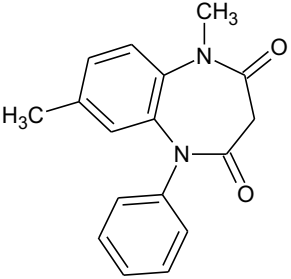
El metabolismo de las benzodiazepinas (figura 14) ocurre principalmente a nivel de los microsomas hepáticos catalizados por la superfamilia conocida como citocromo P-450, la biotransformación de estos compuestos se lleva a cabo a través de dos etapas comúnmente llamadas fase I y fase II. En la fase I ocurren reacciones de oxidación como la N-desmetilación e hidroxilación típicas de benzodiazepinas como el clotiazepam, clobazam, flurazepam fludiazepam, midazolam bromazepam, alprazolam, temazepam y diazepam. También se llevan a cabo reacciones de reducción del grupo 7-nitro para formar metabolitos con el grupo 7-amino y este a su vez puede acetilarse para formar especies con el grupo 7-acetamido como es el caso del clonazepam y nitrazepam [124]. Durante la fase I se ha evidenciado que benzodiazepinas como el diazepam se puede biotransformar en nordazepam, oxazepam y temazepam que son compuestos activos y que se comercializan como fármacos [125]. En la fase II los grupos hidroxilos y aminos de subproductos de las benzodiazepinas en fase I y compuestos que no sufren reacciones previas como el lorazepam y el oxazepam se conjugan con el ácido glucurónico para formar compuestos inactivos que se excretan a la través de la orina [126].

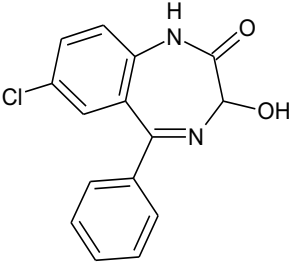
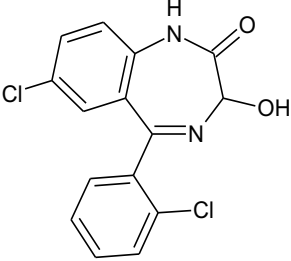
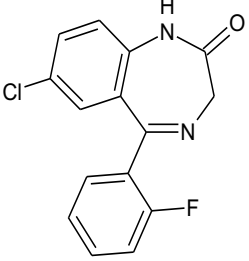
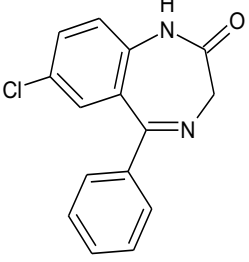
Tabla 17. Benzodiazepinas estudiadas por LC/MS/MS.

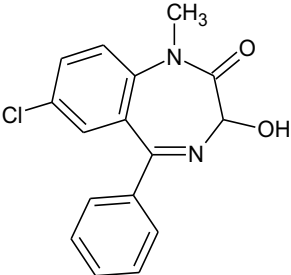
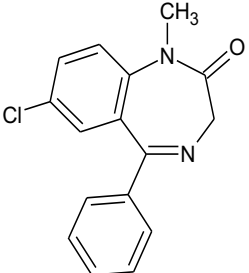
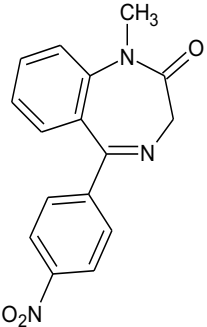
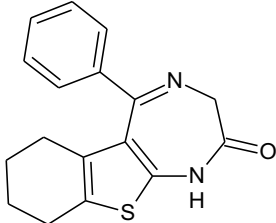
Metabolitos	Formula	Modo	m/z	Q3	Molécula	Referencia
Cloniprazepam	C ₁₉ H ₁₆ ClN ₃ O ₃	[M+H] ⁺	370,0953	316,0430 270,0559 241,0548 214,0452		[124]
Hidroxiclونiprazepam	C ₁₉ H ₁₆ ClN ₃ O ₄	[M+H] ⁺	386,0823	368,0756 55,0540 340,0776 332,0320 280,0316		[124]
Clonazepam	C ₁₅ H ₁₀ ClN ₃ O ₃	[M+H] ⁺	316,0483	270,0581 241,0548 214,0452		[124, 127-130]
Hidroxiclونazepam	C ₁₅ H ₁₀ ClN ₃ O ₄	[M+H] ⁺	332,0401	314,0301 286,0356 240,0753 277,0328 260,0291		[124]

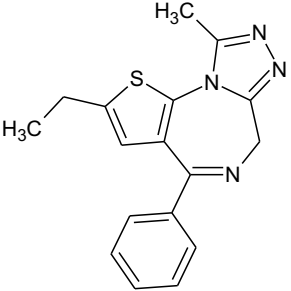
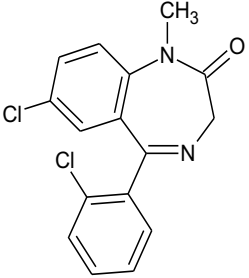
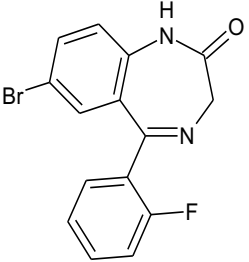
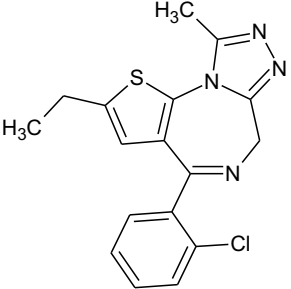
7-aminoclonazepam	C ₁₅ H ₁₂ ClN ₃ O	[M+H] ⁺	286,0749	250,1016 222,1031 121,0		[124, 127, 129-131]
3-cetocloniprazepam	C ₁₉ H ₁₄ ClN ₃ O ₄	[M+H] ⁺	384,0750	55,0165 338,0332 356,0404		[124]
Dihidroxicloniprazepam	C ₁₉ H ₁₆ ClN ₃ O ₅	[M+H] ⁺	402,0854	55,0541 274,0261 302,0465 348,0414 384,0633		[124]
3-OH-7-aminoclonazepam	C ₁₅ H ₁₂ ClN ₃ O ₂	[M+H] ⁺	302,0689	250,1018 269,0530 284,0648		[124]

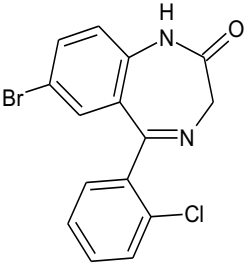
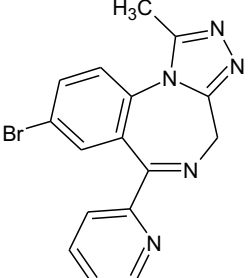
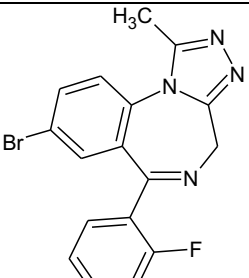
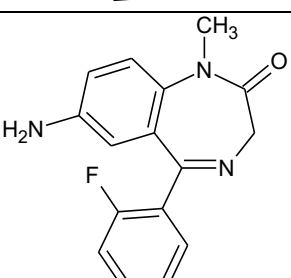
7-aminocloniprazepam	$C_{19}H_{18}ClN_3O$	[M+H] ⁺	340,1231			[124]
Hidroxicloniprazepam-glucurónido	$C_{25}H_{24}ClN_3O_{10}$	[M+H] ⁺	562,1227	386,0984 340,0887		[124]
Flurazepam	$C_{21}H_{23}N_3$	[M+H] ⁺	388,22	100,1 315,1 317,2		[128-131]
Bromazepam	$C_{14}H_{10}BrN_3O$	[M+H] ⁺	318,0	182,2 209,2		[127-132]

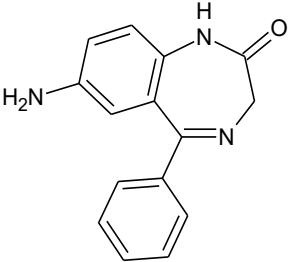
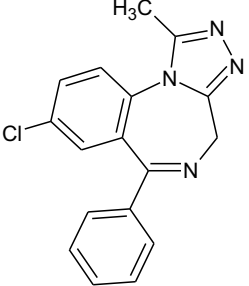
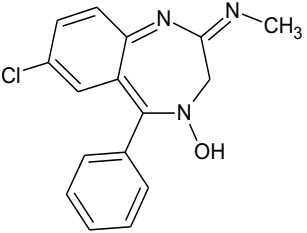
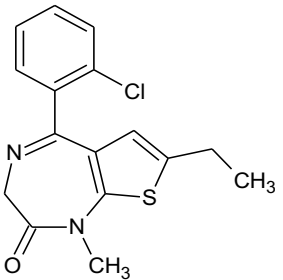
Nitrazepam	C ₁₅ H ₁₁ N ₃ O ₃	[M+H] ⁺	282,14	180,0 236,1		[127-131]
Alfa-hidroxitriazolam	C ₁₇ H ₁₂ Cl ₂ N ₄ O	[M+H] ⁺	359,15	175,9 331,2		[13-131]
Alfa-hidroxiaprazolam	C ₁₇ H ₁₃ ClN ₄ O	[M+H] ⁺	325,18	205,0 297,2 216,1		[129-131]
Clobazam	C ₁₆ H ₁₃ ClN ₂ O ₂	[M+H] ⁺	301,17	224,1 259,1		[128-131]

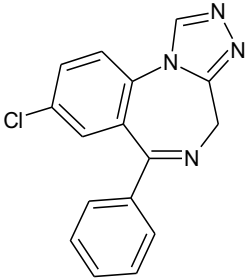
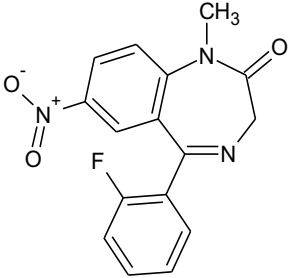
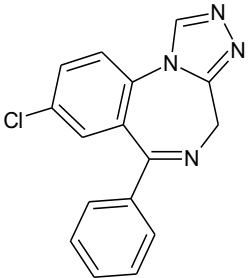
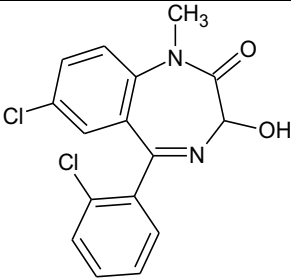
Oxazepam	C ₁₅ H ₁₁ ClN ₂ O ₂	[M+H] ⁺	287,1	104,0 241,1 269,1 141,0		[127-132]
Lorazepam	C ₁₅ H ₁₁ Cl ₂ N ₂ O ₂	[M+H] ⁺	321,13	275,1 303,1 229,2		[127-132]
Desalquilflurazepam	C ₁₅ H ₁₀ ClFN ₂ O	[M+H] ⁺	289,09	140,0 225,9		[129-131]
Nordazepam	C ₁₅ H ₁₁ ClN ₂ O	[M+H] ⁺	271,10	134,0 165,0 140,2 208,2		[127, 129- 131, 132]

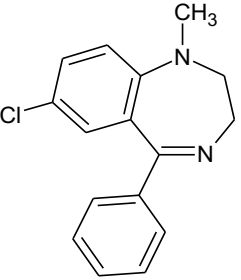
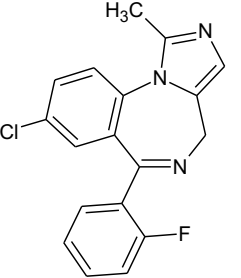
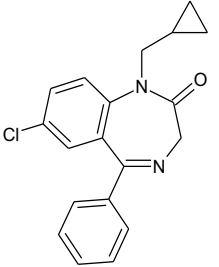
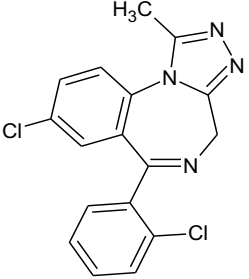
Temazepam	$C_{16}H_{13}ClN_2O_2$	[M+H] ⁺	301,11	255,1 283,3 257,0		[127-132]
Diazepam	$C_{16}H_{13}ClN_2O$	[M+H] ⁺	285,1	193,0 154,0		[127-132]
Nimetazepam	$C_{16}H_{13}N_3O_3$	[M+H] ⁺	296,0	250,1 221,1		[133]
Bentazepam	$C_{17}H_{16}N_2OS$	[M+H] ⁺	297,0	166,2 241,1 139,2		[133]

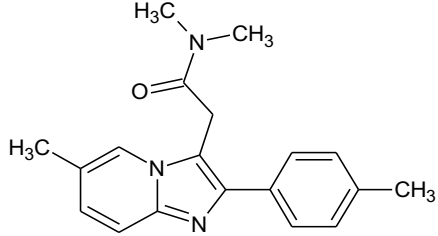
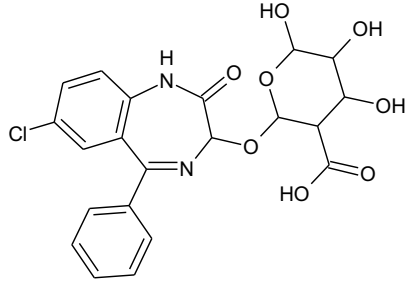
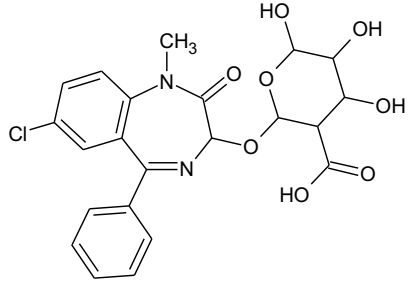
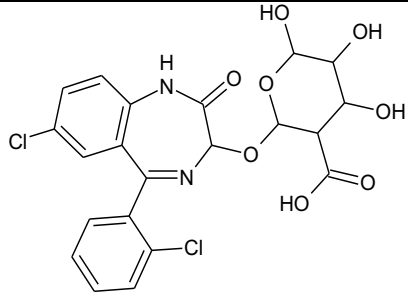
Descloroetizolam	$C_{17}H_{16}N_4S$	[M+H] ⁺	309,14	255,17 280,27 225,0		[133-134]
Diclazepam	$C_{16}H_{12}Cl_2N_2O$	[M+H] ⁺	319,06	227,16 154,10 220,1		[133-134]
Flubromazepam	$C_{15}H_{10}BrFN_2O$	[M+H] ⁺	333,02	226,17 183,09 104,0		[133-134]
Etizolam	$C_{17}H_{15}ClN_4S$	[M+H] ⁺	343,0	314,17 289,0 259,09		[127-128, 133-134]

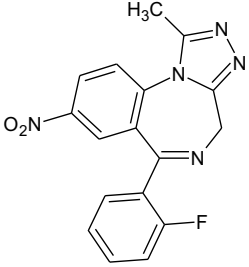
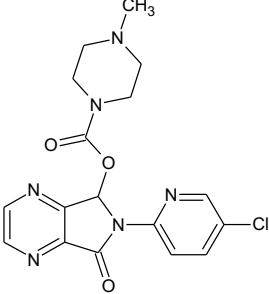
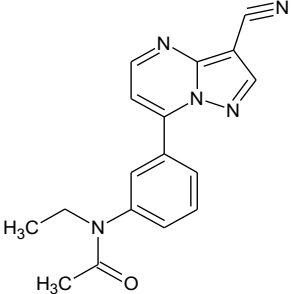
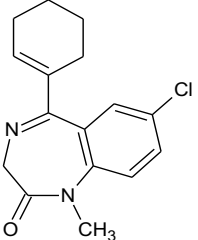
Fenazepam	$C_{15}H_{10}ClBrN_2O$	[M+H] ⁺	350,9	206,20 179,14 185,9 242,0		[127, 133]
Pirazolam	$C_{12}H_{12}BrN_5$	[M+H] ⁺	353,9	167,0 206,0 246,2		[133-134]
Flubromazolam	$C_{17}H_{12}BrFN_4$	[M+H] ⁺	371,0303	343,0120 292,1124 223,0685 181,9601		[133-135]
7-aminoflunitrazepam	$C_{16}H_{14}FN_3O$	[M+H] ⁺	284,1	135,2 227,1		[127-130, 132]

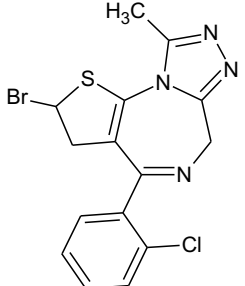
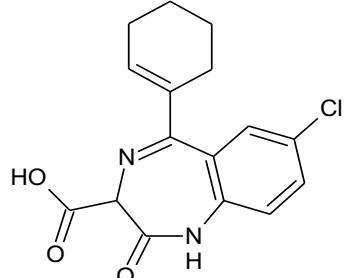
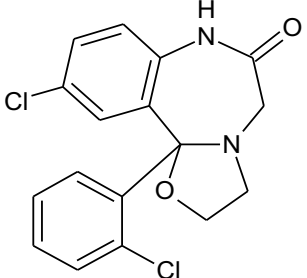
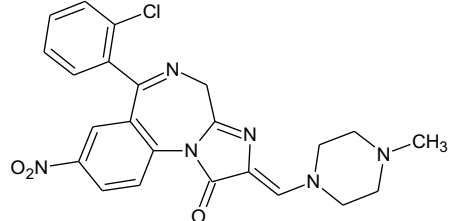
7-aminonitrazepam	$C_{15}H_{13}N_3O$	[M+H] ⁺	252,1	121,1 94,0		[129-130]
Alprazolam	$C_{17}H_{13}ClN_4$	[M+H] ⁺	309,1	281,2 205,1		[128-130]
Clordiazepóxido	$C_{16}H_{14}ClN_3O$	[M+H] ⁺	300,1	227,1 282,2		[127-130]
Clotiazepam	$C_{16}H_{15}ClN_2OS$	[M+H] ⁺	319,1	291,2 154,1		[128-129]

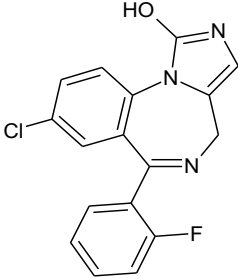
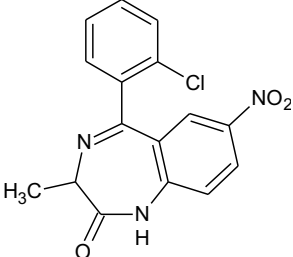
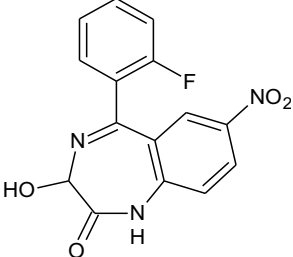
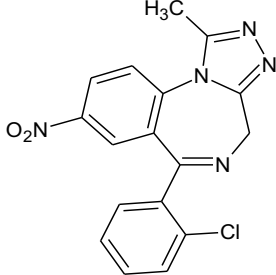
Estazolam	$C_{16}H_{11}ClN_4$	[M+H] ⁺	295,1	267,2 205,2 241,0		[127-130]
Flunitrazepam	$C_{16}H_{12}FN_3O_3$	[M+H] ⁺	314,1	268,2 239,1		[127-130, 132]
1-Hidroximidazolam	$C_{18}H_{13}ClFN_3O$	[M+H] ⁺	342,1	324,2 203,1		[129]
Lormetazepam	$C_{16}H_{12}Cl_2N_2O_2$	[M+H] ⁺	335,1	289,1 291,1 317,0		[127-129]

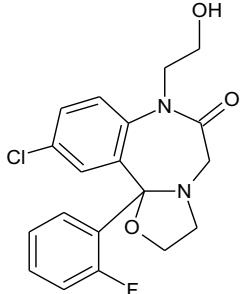
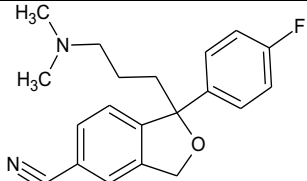
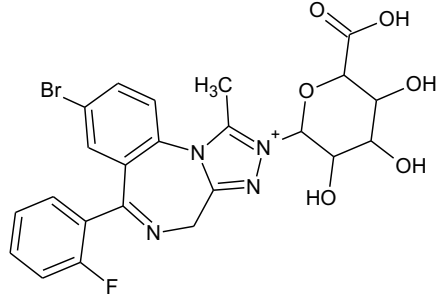
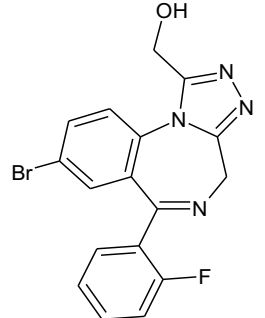
Medazepam	$C_{16}H_{15}ClN_2$	[M+H] ⁺	271,1	91,1 207,3		[127, 129]
Midazolam	$C_{18}H_{13}ClFN_3$	[M+H] ⁺	326,1	291,3 249,2		[127, 129-130]
Prazepam	$C_{19}H_{17}ClN_2O$	[M+H] ⁺	325,1	271,2 140,1		[128-130]
Triazolam	$C_{17}H_{12}Cl_2N_4$	[M+H] ⁺	343,1	239,2 308,1 315,0		[127-130]

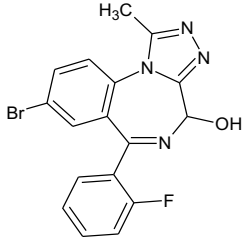
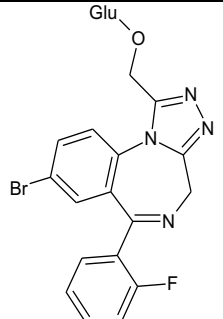
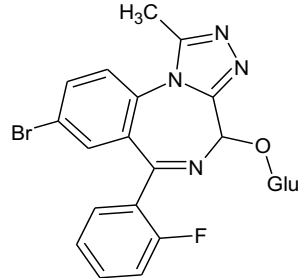
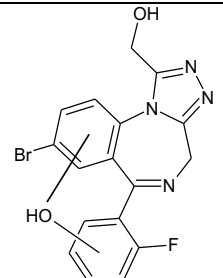
Zolpidem	$C_{19}H_{21}N_3O$	[M+H] ⁺	308,2	235,1 236,3		[127, 129-130]
3R-Oxazepam-glucurónico	$C_{21}H_{19}O_8N_2Cl$	[M+H] ⁺	463,0906	287,0583		[136]
3S-Oxazepam-glucurónico	$C_{21}H_{19}O_8N_2Cl$	[M+H] ⁺	463,0902	287,0583		[136]
3R-Temazepam-glucurónico	$C_{22}H_{21}O_8N_2Cl$	[M+H] ⁺	477,1059	301,0740		[136]
3S-Temazepam-glucurónico	$C_{22}H_{21}O_8N_2Cl$	[M+H] ⁺	477,1059	301,0738		[136]
3R-Lorazepam-glucurónico	$C_{21}H_{18}O_8N_2Cl_2$	[M+H] ⁺	497,0513	301,0192		[136]
3S-Lorazepam-glucurónico	$C_{21}H_{18}O_8N_2Cl_2$	[M+H] ⁺	497,0513	301,0190		[136]

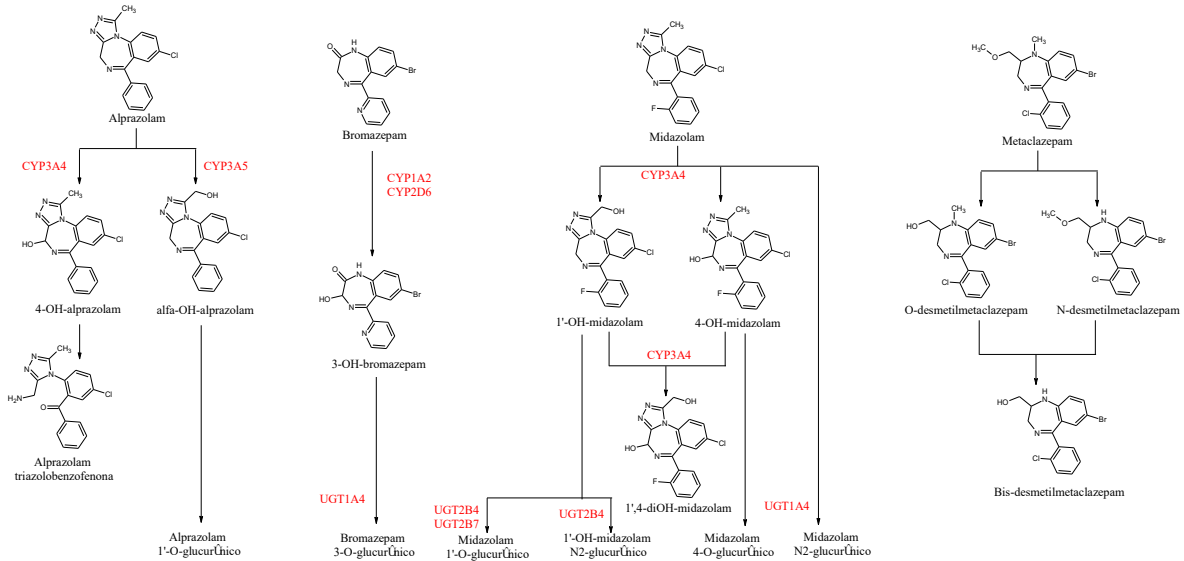
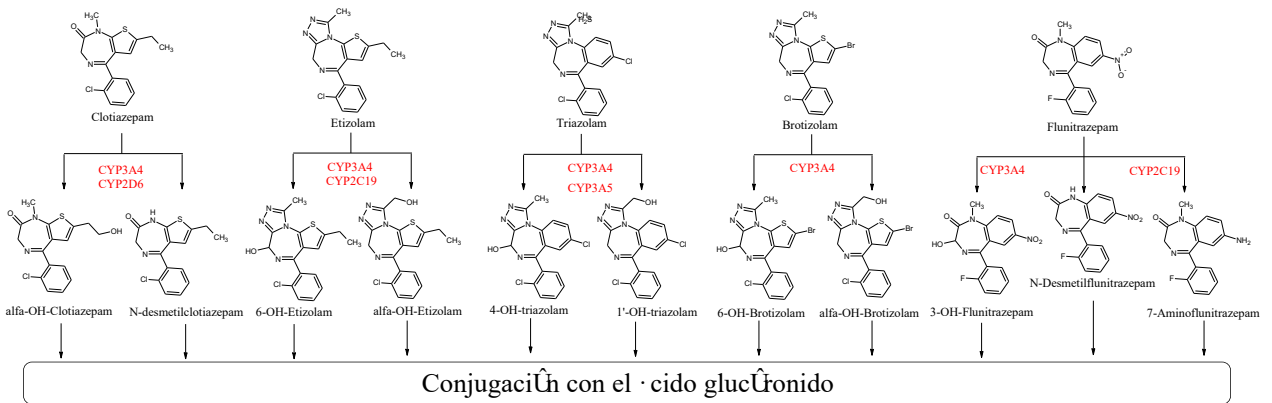
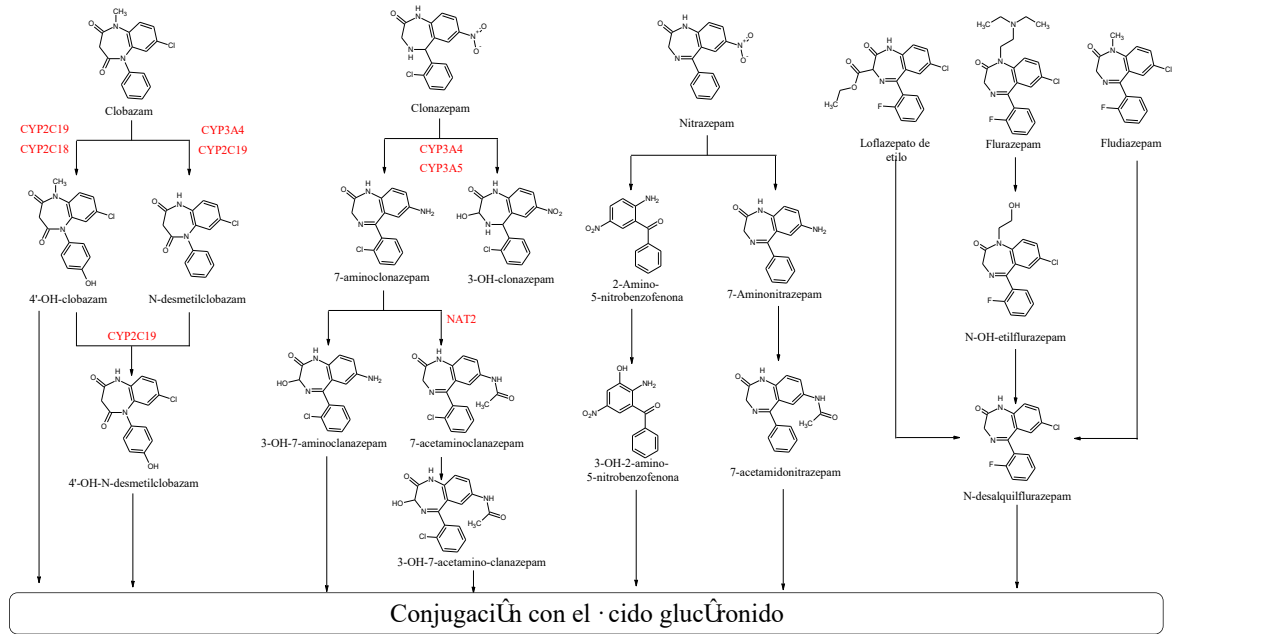
Flunitrazolam	$C_{17}H_{12}FN_5O_2$	[M+H] ⁺	338,1	292,1 264,1		[127]
Zopiclona	$C_{17}H_{17}ClN_6O_3$	[M+H] ⁺	389,1	245,0 217,0		[127-128]
Zaleplon	$C_{17}H_{15}N_5O$	[M+H] ⁺	306,1	264,1 236,1		[127]
Tetrazepam	$C_{16}H_{17}ClN_2O$	[M+H] ⁺	289,1	225,1 197,1		[127]

Brotizolam	$C_{15}H_{10}BrClN_4S$	$[M+H]^+$	393,1	314,1 210,1		[128]
Clorazepato	$C_{16}H_{11}ClN_2O_3$	$[M+H]^+$	271,0	140,1 165,0		[128]
Cloxazolam	$C_{17}H_{14}Cl_2N_2O_2$	$[M+H]^+$	349,1	305,0 140,0		[128]
Loprazolam	$C_{23}H_{21}ClN_6O_3$	$[M+H]^+$	465,2	252,1 408,0		[128]

Alfa-hidroimidazolam	$C_{18}H_{13}ClFN_3O$	$[M+H]^+$	342,1	324,2 203,1		[130]
Meclonazepam	$C_{16}H_{12}ClN_3O_3$	$[M+H]^+$	330,09	284,18 238,20		[134]
Nifoxipam	$C_{15}H_{10}FN_3O_4$	$[M+H]^+$	316,16	224,02 270,19		[134]
Clonazolam	$C_{17}H_{12}ClN_5O_2$	$[M+H]^+$	354,10	308,20 280,17		[134]

Flutazolam	$C_{19}H_{18}ClFN_2O_3$	[M+H] ⁺	395,16	294,19 276,18		[134]
Citalopram	$C_{20}H_{21}FN_2O$	[M+H] ⁺	324,4	58 84 86		[125]
Flubromazolam N-glucurónico	$C_{23}H_{20}BrFN_4O_6$	[M+H] ⁺	547,0628	371,0295 343,0123 292,1117		[135]
Alfa-hidroxi flubromazolam	$C_{17}H_{12}BrFN_4O$	[M+H] ⁺	387,0248	234,0713 359,0056 223,0676 141,0564 261,0820		[135]

4-hidroxi-flubromazolam	C ₁₇ H ₁₂ BrFN ₄ O	[M+H] ⁺	387.0245	300,9785 263,0856 342,0012 236,0694 194,0560		[135]
Alfa-hidroxi-flubromazolam-glucurónico	C ₂₃ H ₂₀ BrFN ₄ O ₇	[M+H] ⁺	563.0573	387,0246 359,0071 369,0134 341,0074 219,9754		[135]
4-hidroxi-flubromazolam-glucurónico	C ₂₃ H ₂₀ BrFN ₄ O ₇	[M+H] ⁺	563.0573	369,0161 342,0021 387,0246 300,9730 263,0849		[135]
Dihidroxi-flubromazolam	C ₁₇ H ₁₂ BrFN ₄ O ₂	[M+H] ⁺	403.0199	374,9988 238,0610 277,0769 141,0531		[135]



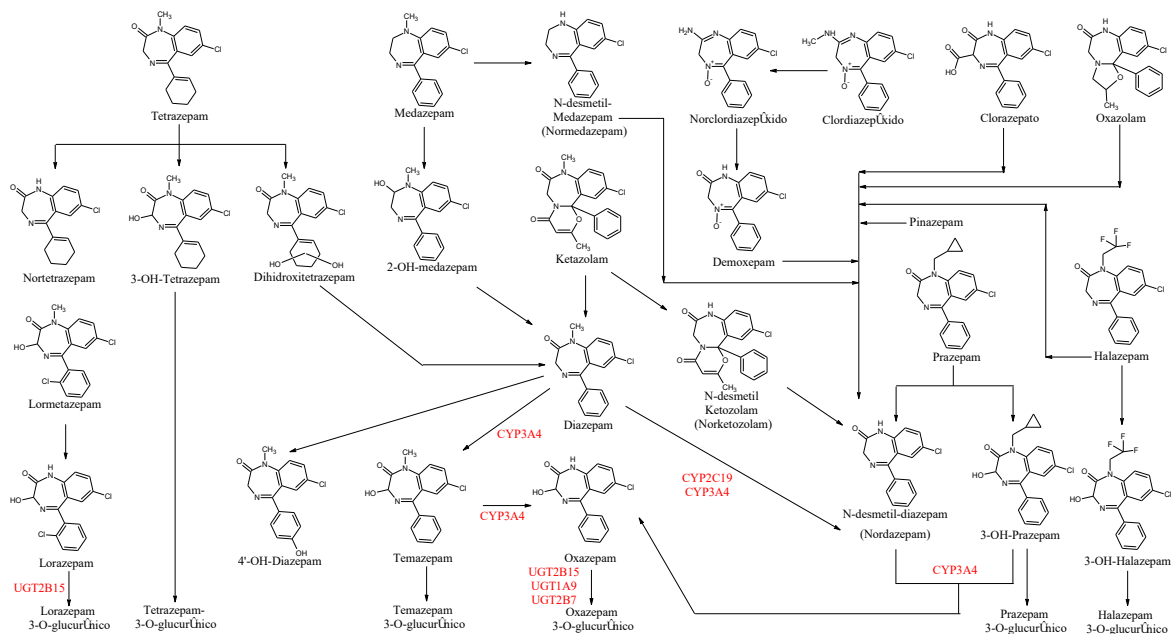


Figura 14. Metabolismo de eliminación de las benzodiazepinas. Fuente [137-151]

7.4. Rutas metabólicas de la heroína (figura 15)

La heroína tiene un tiempo de vida media muy corta (2 a 4 min); se hidroliza rápidamente a 6-monoacetilmorfina (6-MAM) en aproximadamente 30 min, posteriormente se desacetila formando la morfina [152]. Este compuesto sufre una glucuronidación en el grupo hidroxilo fenólico libre en la posición 3 para formar la morfina-3-glucurónido (M3G) inactivo (57,3%), mientras que solo un pequeño porcentaje (10,4%) del grupo alcohol en la posición 6 se convierte en morfina-6-glucurónido (M6G) que es un compuesto activo con un potencial 650 mayor que la morfina [153-154]. La morfina también puede sufrir una N-desmetilación formando la normorfina que luego se glucuronida formando normorfina-3 o 6-glucurónido.

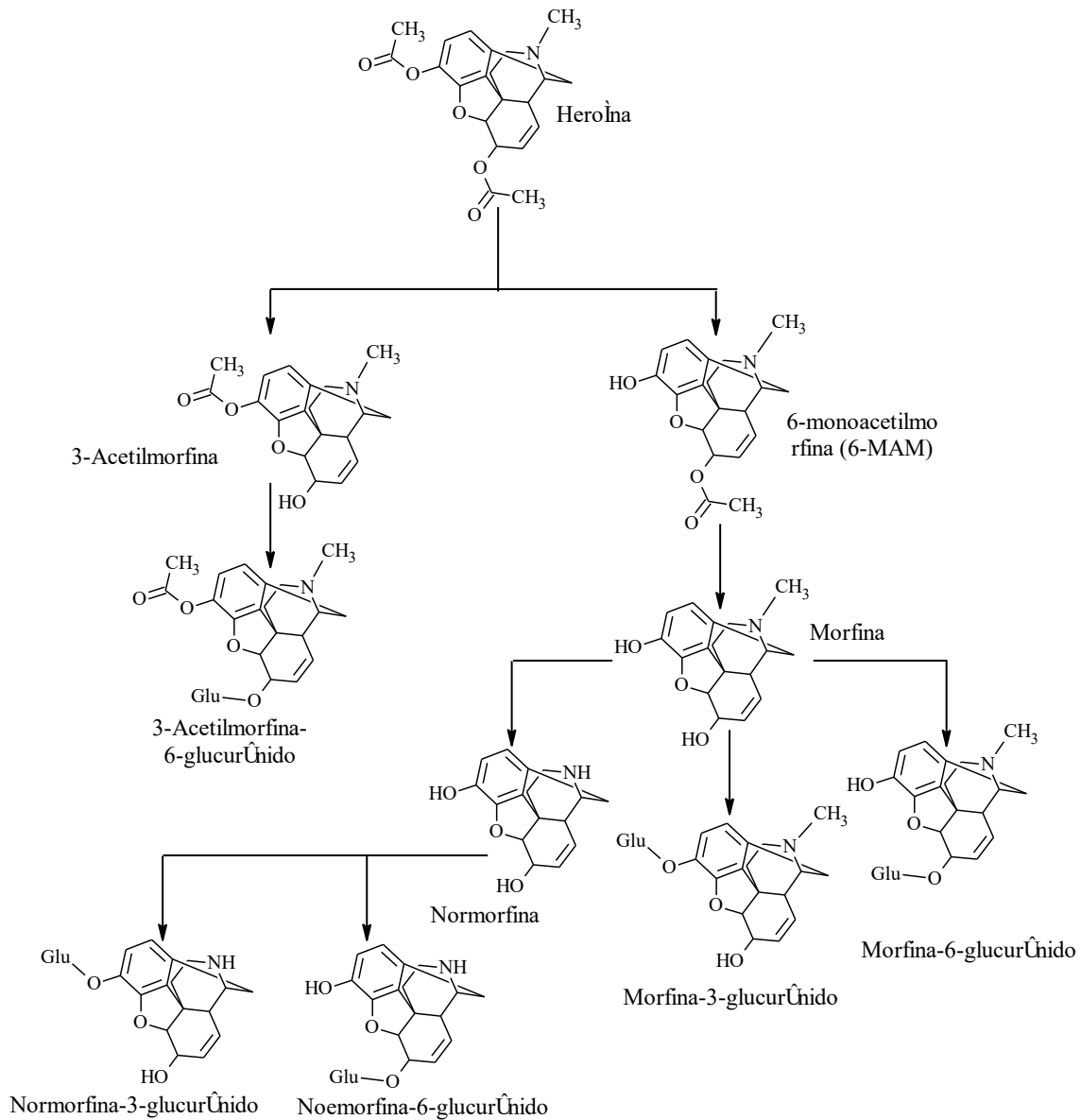
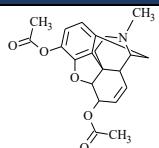
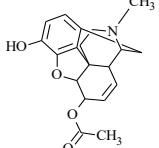
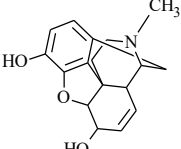
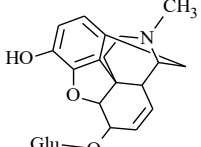
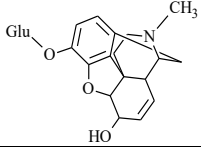
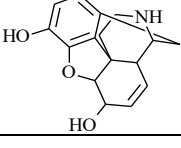


Figura 15. Metabolismo de la heroína. Fuente: [153-159]

Tabla 18. Metabolitos producto de la eliminación de la morfina.

Metabolitos	Fórmula	Modo	Q1	Q3	Molécula	Referencia
Heroína	C ₂₁ H ₂₃ NO ₅	[M+H] ⁺	370	58 310,2 328,2		[156-160]
6-acetilmorfina (6-MAM)	C ₁₉ H ₂₁ NO ₄	[M+H] ⁺	328,1	165,2 211,2		[156-160]
Morfina	C ₁₇ H ₁₉ NO ₃	[M+H] ⁺	286,2	152 165 268,3 229,1		[156-160]
Morfina-6- glucurónido	C ₂₃ H ₂₇ NO ₉	[M+H] ⁺	462,10	286,15 165,10		[156]
Morfina-3- glucurónido	C ₂₃ H ₂₇ NO ₉	[M+H] ⁺	462,11	286,15 165,10		[156]
Normorfina	C ₁₆ H ₁₇ NO ₃	[M+H] ⁺	272,05	165,00 121,00		[156]

8. RETOS

1. Hacer estudios de seguimiento a metabolitos para drogas sintéticas NPS in silico (Química Computacional y Bioinformática) para predecir los posibles metabolitos y usarlos como rutas de rastreo en las nuevas síntesis y puestas en el mercado de los alucinógenos (Conclusión en el Workshop sobre drogas psicoactivas en noviembre de 2020).
2. Hacer mediciones en grandes y masivas aglomeraciones en baños móviles e.g. tipo Rock al Parque y Stereopicnic-Bogotá, carnavales-Pasto y Barranquilla, ferias-Calí y Manizales, festivales-Neiva, Ibagué, Valledupar, Buenaventura, Ginebra. Salento, Popayán etc. (idea de Prof. Dr. Félix Hernández de la Universidad de Jaume-España), lo cual requiere un estudio screening sin patrones de referencia, con equipos de espectrometría de masas de alta resolución (HRMS).
3. Hacer rastreos focalizados en alcantarillas de lugares con dinámicas sociales con alta ascendencia en el consumo de drogas (v.g. escuelas, colegios, universidades, cárceles, batallones, zonas de rumba y ocio, etc.) que permitan crear cercos epidemiológicos de consumos y conductas para entender mejor las dinámicas de acechos y propender por campañas masivas de orientación y prevención.

9. CONCLUSIONES

1. La estrategia de la epidemiología basada en las aguas residuales WBE definitivamente es una herramienta fundamental en el conocimiento de pautas de consumo de drogas de abuso en la zona de influencia de la PTAR evaluada.
2. La aproximación metabólica (rutas y mapas bioquímicos) es decir la identificación de congéneres, biomarcadores y productos de transformación ya sea experimentales (in vivo, in vitro) o modelados (in silico) son indispensables para establecer la conexión entre concentración y consumo.
3. La espectrometría de masas sea acoplada a GC y mejor a LC es la técnica analítica avanzada por excelencia requerible para hacer estas aproximaciones.
4. Estudios en plantas piloto PTAR pequeñas, bajo condiciones controladas, de amplio conocimiento y caracterización profusa, caudales estables y de acceso fácil serán necesarios para estudios futuros bajo la perspectiva de WBE.
5. Los sitios escogidos para el estudio piloto (dos PTARs y un canal colector) gozaron de las ventajas de representatividad, accesibilidad, facilidad, datos históricos, rastreabilidad por separación de distritos sanitarios y sus aguas residuales (origen, características físicas y químicas) son una diversidad de conjuntos que enriquecen la discusión a la luz de estos resultados primeros en su género.
6. Se elucubran las rutas metabólicas para la cocaína, cannabis, benzodiazepinas y heroína (cuatro familias de drogas psicoactivas elegidas para el estudio piloto) y que arrojan luces sobre el mapa teórico de posibles candidatos (más de 40 metabolitos) a encontrar en las aguas residuales de este estudio piloto, y al reconocer en ellos sus características de análisis espectroscópico por MS facilitaron su identificación en LC-MS porque se tuvo una primera pista de iones y fragmentos de screening.
7. El estudio con estos resultados preliminares ha empezado a sentar unas líneas de consumo en cantidad y diversidad que se corresponden con reportes de 2019 de UNODC y MJD y con estudios de igual corte (ósea tipo WBE), pero con sus análisis cromatográficos realizados en el extranjero con LC/MS/MS.
8. Se emplearon dos tipos de métodos miniaturizados de preparación de muestras RDSE y SPME, siendo válidos y aceptables para el estudio, porque los primeros resultados indican un comportamiento con alto grado de concordancia con otros hallazgos.
9. Si bien es cierto aún no se han detectado metabolitos diferentes a los ya establecidos salvo la α -hidroxi-MDMA queda claro que el análisis por GC-MS aquí desarrollado previamente usando extracción con RDSE o SPME se puede

utilizar como una herramienta de tamizaje previo al análisis de LC/MS/MS, con lo cual se analizarían muestras con identificación positiva a la sustancia de interés que podrían permitir un cerco analítico muy efectivo y con reducción en los costos de análisis y en su interpretación posterior.

- 10.** La ciudad de Armenia ha mostrado las mayores concentraciones de cocaína (1200 ng L^{-1}) y benzoilecgonina (6300 ng L^{-1}) respecto de las otras dos ciudades, y por su parte, Pereira mostró las mayores concentraciones de THC (1600 ng L^{-1}) y THC-A (500 ng L^{-1}) en comparación con Armenia y Manizales. Adicionalmente en la ciudad de Armenia se detectó por GC-MS la mayor diversidad de sustancias psicoactivas legales e ilegales.
- 11.** Ya se cuenta con iones precursores reportados bibliográficamente para los metabolitos de la cocaína, cannabis, benzodiazepinas y la heroína para hacer un mejor cerco bórico (relación m/z más estrecha al candidato) de cara al análisis de las muestras por LC-ESI(+)-Orbitrap en la ciudad de Bucaramanga en el mes de enero.
- 12.** En un buen grupo de muestras (173 de 403) correspondientes a los muestreos 5 al 10, empezaron a aparecer compuestos de la familia de cannabinoides de gran ascendencia entre la población consumidora (dronabinol, canabinol y THC) y lo mejor detectados e identificados con el mismo método de preparación de muestras RDSE.
- 13.** Finalmente, la estimación de consumo de cocaína a partir de la carga másica normalizada de su principal metabolito, la benzoilecgonina, es mayor en Pereira con $4857 \text{ mg/día/1000hab}$ que Armenia con $2988 \text{ mg/día/1000hab}$ y además en esta última ciudad la diversidad de moléculas empleadas es más amplia y en general las causas sociales, judiciales, económicas sobre el Eje Cafetero, la presión del ecoturismo extranjero en esta zona puede ser una razón de este comportamiento.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Informe Visión Colombia II Centenario: 2019 Ministerio de Educación Nacional 2000
- [2] <https://www.elspectador.com/noticias/nacional/antioquia/alcaldes-del-mundo-recomiendan-trabajar-por-ciudades-amables-con-la-ciudadania-articulo-870714> consultada en julio 12 de 2019
- [3] C. Kennedy, S. Pincetl, P. Bunje. Review The study of urban metabolism and its applications to urban planning and design. *Environmental Pollution* xxx (2010) 1-9
- [4] L.S. Conke, T.L. Ferreira. Urban metabolism: Measuring the city's contribution to sustainable development. *Environmental Pollution* 202 (2015) 146-152
- [5] Cecinato, C. Balducci, G. Nervegna Occurrence of cocaine in the air of the World's cities: An emerging problem? A new tool to investigate the social incidence of drugs? *Science of The Total Environment* 407 (2009) 1683-1690
- [6] K.V. Thomas, L. Bijlsma, S. Castiglioni, A. Covaci, E. Emke, R. Grabic, F. Hernández, S. Karolak, B. Kasprzyk-Hordern, R.H. Lindberg, M. Lopez de Alda, A. Meierjohann, C. Ort, Y. Pico, J.B. Quintana, M. Reid, J. Rieckermann, S. Terzic, A.L.N. van Nuijs, P. de Voogt. Comparing illicit drug use in 19 European cities through sewage analysis. *Science of the Total Environment* 432 (2012) 432-439
- [7] L. Bijlsma, A.M. Botero-Coy, R.J. Rincón, G.A. Peñuela, F. Hernández. Estimation of illicit drug use in the main cities of Colombia by means of urban wastewater analysis. *Science of the Total Environment* 565 (2016) 984-993
- [8] P.M. Choi, B.J. Tschärke, E. Donner, J.W. O'Brien, S.C. Grant, S.L. Kaserzon, R. Mackie, E. O'Malley, N.D. Crosbie, K.V. Thomas, J.F. Mueller. Wastewater-based epidemiology biomarkers: Past, present and future. *Trends in Analytical Chemistry* 105 (2018) 453-469
- [9] <https://ruvid.org/ri-world/wastewater-analysed-for-epidemiological-purposes/> consultado el 13 octubre de 2020
- [10] Félix Hernández, Sara Castiglioni, Adrian Covaci, Pim de Voogt, Erik Emke, Barbara Kasprzyk-Hordern, Christoph Ort, Malcolm Reid, Juan V. Sancho, Kevin V. Thomas, Alexander L.N. van Nuijs, Ettore Zuccato and Lubertus Bijlsma. Review: Mass spectrometric strategies for the investigation of biomarkers of illicit drug use in wastewater. *Mass Spectrometry Reviews*, 2018, 37, 258-280
- [11] Boumba, V. A., Di Rago, M., Peka, M., Drummer, O. H., & Gerostamoulos, D. (2017). The analysis of 132 novel psychoactive substances in human hair using a single step extraction by tandem LC/MS. *Forensic Science International*, 279, 192-202. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2017.08.031>

- [12] Lehmann, S., Kieliba, T., Beike, J., Thevis, M., & Mercer-Chalmers-Bender, K. (2017). Determination of 74 new psychoactive substances in serum using automated in-line solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1064, 124–138. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.09.003>
- [13] Müller, T. E., Fontana, B. D., Bertoncillo, K. T., Francescon, F., Mezzomo, N. J., Canzian, J., Rosemberg, D. B. (2020, June 8). Understanding the neurobiological effects of drug abuse: Lessons from zebrafish models. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, Vol. 100, p. 109873. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2020.109873>
- [14] Rubio, C., Strano-Rossi, S., Tabernerero, M. J., Anzillotti, L., Chiarotti, M., & Bermejo, A. M. (2013). Hygrine and cuscohygrine as possible markers to distinguish coca chewing from cocaine abuse in workplace drug testing. *Forensic Science International*, 227(1), 60–63. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2012.09.005>
- [15] Kobeissy, F., Mouhieddine, T. H., Nokkari, A., Itani, M., Mouhieddine, M., Zhang, Z., Mechref, Y. (2014). Recent updates on drug abuse analyzed by neuroproteomics studies: Cocaine, Methamphetamine and MDMA. *Translational Proteomics*, 3, 38–52. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.trprot.2014.04.001>
- [16] Corcia, D. Di, D'Urso, F., Gerace, E., Salomone, A., & Vincenti, M. (2012). Simultaneous determination in hair of multiclass drugs of abuse (including THC) by ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 899, 154–159. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.05.003>
- [17] Ogunbiyi, M. O., Hindocha, C., Freeman, T. P., & Bloomfield, M. A. P. (2020). Acute and chronic effects of Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) on cerebral blood flow: A systematic review. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 101, 109900. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2020.109900>
- [18] Kłys, M., Rojek, S., Kulikowska, J., Bożek, E., & Ścisłowski, M. (2007). Usefulness of multi-parameter opiates–amphetamines–cocainics analysis in hair of drug users for the evaluation of an abuse profile by means of LC–APCI-MS-MS. *Journal of Chromatography B*, 854(1), 299–307. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2007.04.040>.
- [19] Vale, A. (2012). Drugs of abuse (amfetamines, BZP, cannabis, cocaine, GHB, LSD). *Medicine*, 40(2), 84–87. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2011.11.018>
- [20] la Iglesia-Larrad, J. I. de, Barral, C., Casado-Espada, N. M., Alarcón, R. de, Maciá-Casas, A., Hernandez, B. Vicente, & Roncero, C. (2020). Benzodiazepine abuse, misuse, dependence, and withdrawal among schizophrenic patients: A

review of the literature. *Psychiatry Research*, 284, 112660. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.psychres.2019.112660>

[21] Bijlsma, L., Celma, A., Castiglioni, S., Salgueiro-González, N., Bou-Iserte, L., Baz-Lomba, J. A., Zuccato, E. (2020). Monitoring psychoactive substance use at six European festivals through wastewater and pooled urine analysis. *Science of the Total Environment*, 725. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138376>

[22] Bade, R., Ghetia, M., Nguyen, L., Tscharke, B. J., White, J. M., & Gerber, C. (2019). Simultaneous determination of 24 opioids, stimulants and new psychoactive substances in wastewater. *MethodsX*, 6, 953–960. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2019.04.016>

[23] Cicero, T. J., Ellis, M. S., & Kasper, Z. A. (2020). Polysubstance use: A broader understanding of substance use during the opioid crisis. *American Journal of Public Health*, 110(2), 244–250. <https://doi.org/10.2105/AJPH.2019.305412>

[24] Urigüen, L., & Callado, L. F. (2010, October 1). Cocaine and brain. *Trastornos Adictivos*, Vol. 12, pp. 129–134. [https://doi.org/10.1016/S1575-0973\(10\)70025-8](https://doi.org/10.1016/S1575-0973(10)70025-8)

[25] Robledo, P. (2008, July 1). Las anfetaminas. *Trastornos Adictivos*, Vol. 10, pp. 166–174. [https://doi.org/10.1016/S1575-0973\(08\)76363-3](https://doi.org/10.1016/S1575-0973(08)76363-3)

[26] de Souza Boff, B., Silveira Filho, J., Nonemacher, K., Driessen Schroeder, S., Dutra Arbo, M., & Rezin, K. Z. (2020). New psychoactive substances (NPS) prevalence over LSD in blotter seized in State of Santa Catarina, Brazil: A six-year retrospective study. *Forensic Science International*, 306, 110002. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2019.110002>

[27] Bijlsma, L., Celma, A., López, F. J., & Hernández, F. (2019, June 1). Monitoring new psychoactive substances use through wastewater analysis: current situation, challenges and limitations. *Current Opinion in Environmental Science and Health*, Vol. 9, pp. 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2019.03.002>

[28] Withey, S., Bergman, J., Huestis, M., George, S., & Madras, B. (2020). THC and CBD Blood and Brain Concentrations Following Daily Administration to Adolescent Primates. *Drug and Alcohol Dependence*, 108129. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2020.108129>

[29] Arias Constantí, V., Sanz Marcos, N., Trenchs Sainz de La Maza, V., Curcoy Barcenilla, A. I., Matalí Costa, J., & Luaces Cubells, C. (2010). Implicación de las sustancias psicoactivas en las consultas de adolescentes en urgencias. *Medicina Clinica*, 134(13), 583–586. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2010.01.019>

[30] Patiño-Masó, J., Gras-Pérez, E., Font-Mayolas, S., & Baltasar-Bagué, A. (2013). Consumo de cocaína y policonsumo de sustancias psicoactivas en jóvenes universitarios. *Enfermería Clinica*, 23(2), 62–67. <https://doi.org/10.1016/j.enfcli.2013.02.003>

- [31] Scoppetta, O., Avendaño Prieto, B. L., & Cassiani Miranda, C. (2020, May 29). Individual Factors Associated with the Consumption of Illicit Substances: a Review of Reviews. *Revista Colombiana de Psiquiatría*. <https://doi.org/10.1016/j.rcp.2020.01.007>
- [32] Daughton CG, Daughton CG. 2001. Pharmaceuticals and personal care products in the environment, scientific and regulatory issues. In: Daughton CG, Jones-Lepp TL, editors. Washington: American Chemical Society. pp. 348–364.
- [33] Zuccato E, Chiabrando C, Castiglioni S, Calamari D, Bagnati R, Schiarea S, Fanelli R. 2005. Cocaine in surface waters: A new evidence-based tool to monitor community drug abuse. *Environ Heal A Glob Access Sci Source* 4:1–7.
- [34] van Nuijs ALN, Castiglioni S, Tarcomnicu I, Postigo C, de Alda ML, Neels H, Zuccato E, Barcelo D, Covaci A. 2011. Illicit drug consumption estimations derived from wastewater analysis: A critical review. *Sci Total Environ* 409:3564–3577.
- [35] Castiglioni S, Thomas KV, Kasprzyk-Hordern B, Vandam L, Griffiths P. 2014. Testing wastewater to detect illicit drugs: State of the art, potential and research needs. *Sci Total Environ* 487:613–620.
- [36] Reid MJ, Derry L, Thomas KV. 2014. Analysis of new classes of recreational drugs in sewage: Synthetic cannabinoids and amphetamine-like substances. *Drug Test Anal* 6:72–79.
- [37] van Nuijs ALN, Gheorghe A, Jorens PG, Maudens K, Neels H, Covaci A. 2014. Optimization, validation, and the application of liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of new drugs of abuse in wastewater. *Drug Test Anal* 6:861–867.
- [38] Kinyua J, Covaci A, Maho W, McCall A-K, Neels H, van Nuijs ALN. 2015. Sewage-based epidemiology in monitoring the use of new psychoactive substances: Validation and application of an analytical method using LC-MS/MS. *Drug Test Anal* 7:812–818.
- [39] Reid MJ, Langford KH, Mørland J, Thomas KV. 2011. Analysis and interpretation of specific ethanol metabolites, ethyl sulfate, and ethyl glucuronide in sewage effluent for the quantitative measurement of regional alcohol consumption. *Alcohol Clin Exp Res* 35:1593–1599.
- [40] Mastroianni N, Lopez de Alda M, Barcelo D. 2014. Analysis of ethyl sulfate in raw wastewater for estimation of alcohol consumption and its correlation with drugs of abuse in the city of Barcelona. *J Chromatogr A* 1360:93–99.
- [41] Rodríguez-Alvarez T, Rodil R, Cela R, Quintana JB. 2014. Ion-pair reversed-phase liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight and triple-quadrupole-mass spectrometry determination of ethyl sulfate in wastewater for alcohol consumption tracing. *J Chromatogr A* 1328:35–42.

- [42] Rodríguez-Alvarez T, Racamonde I, González-Mariño I, Borsotti A, Rodil R, Rodríguez I, Zuccato E, Quintana JB, Castiglioni S. 2015. Alcohol and cocaine co-consumption in two European cities assessed by wastewater analysis. *Sci Total Environ* 536:91–98.
- [43] Boogaerts T, Covaci A, Kinyua J, Neels H, van Nuijs ALN. 2016. Spatial and temporal trends in alcohol consumption in Belgian cities: A wastewater-based approach. *Drug Alcohol Depend* 160:170–176.
- [44] Rodríguez-Alvarez T, Rodil R, Rico M, Cela R, Quintana JB. 2014. Assessment of local tobacco consumption by liquid Chromatography Tandem mass spectrometry sewage analysis of nicotine and its metabolites, cotinine and trans-30 - hydroxycotinine, after enzymatic deconjugation. *Anal Chemistry* 86:10274–10281.
- [45] Castiglioni S, Senta I, Borsotti A, Davoli E, Zuccato E. 2015. A novel approach for monitoring tobacco use in local communities by wastewater analysis. *Tob Control* 24:38–42.
- [46] Tschärke BJ, White JM, Gerber JP. 2016. Estimates of tobacco use by wastewater analysis of anabasine and anatabine. *Drug Test Anal* 8:702–707.
- [47] Venhuis BJ, de Voogt P, Emke E, Causanilles A, Keizers PHJ. 2014. Success of rogue online pharmacies: Sewage study of sildenafil in the Netherlands. *BMJ* 349:g4317.
- [48] Mari F, Politi L, Biggeri A, Accetta G, Trignano C, Di Padua M, Bertol E. 2009. Cocaine and heroin in waste water plants: A 1-year study in the city of Florence, Italy. *Forensic Sci Int* 189:88–92.
- [49] González-Mariño I, Quintana JB, Rodríguez I, Cela R. 2010. Determination of drugs of abuse in water by solid-phase extraction, derivatisation and gas chromatography-ion trap-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1217:1748–1760
- [50] Bijlsma L, Emke E, Hernández F, De Voogt P. 2013b. Performance of the linear ion trap Orbitrap mass analyzer for qualitative and quantitative analysis of drugs of abuse and relevant metabolites in sewage water. *Anal Chim Acta* 768:102–110.
- [51] Hernández F, Ibañez M, Bade R, Bijlsma L, Sancho JV. 2014. Investigation of pharmaceuticals and illicit drugs in waters by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry. *TrAC Trends Anal Chem* 63:140–157.
- [52] Ibañez M, Sancho JV, Bijlsma L, Van Nuijs ALN, Covaci A, Hernández F. 2014. Comprehensive analytical strategies based on high-resolution time-of-flight mass spectrometry to identify new psychoactive substances. *TrAC Trends Anal Chem* 57:107–117.

- [53] Reid MJ, Derry L, Thomas KV. 2014. Analysis of new classes of recreational drugs in sewage: Synthetic cannabinoids and amphetamine-like substances. *Drug Test Anal* 6:72–79.
- [54] Alechaga E, Moyano E, Galceran MT. 2015. Wide-range screening of psychoactive substances by FIA-HRMS: Identification strategies. *Anal Bioanal Chem* 407:4567–4580.
- [55] Bade R, Rousis NI, Bijlsma L, Gracia-Lor E, Castiglioni S, Sancho JV, Hernandez F. 2015c. Screening of pharmaceuticals and illicit drugs in wastewater and surface waters of Spain and Italy by high resolution mass spectrometry using UHPLC-QTOF MS and LC-LTQ-Orbitrap MS. *Anal Bioanal Chem* 407:8979–8988.
- [56] Baz-Lomba JA, Reid MJ, Thomas KV. 2016. Target and suspect screening of psychoactive substances in sewage-based samples by UHPLC-QTOF. *Anal Chim Acta* 914:81–90.
- [57] Hernández F, Bijlsma L, Sancho JV, Díaz R, Ibañez M. 2011a. Rapid wide-scope screening of drugs of abuse, prescription drugs with potential for abuse and their metabolites in influent and effluent urban wastewater by ultrahigh pressure liquid chromatography quadrupole time of light mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 684:96–106.
- [58] Hernández F, Ibañez M, Bade R, Bijlsma L, Sancho JV. 2014. Investigation of pharmaceuticals and illicit drugs in waters by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry. *TrAC Trends Anal Chem* 63:140–157.
- [59] González-Mariño I, Quintana JB, Rodríguez I, González-Díez M, Cela R. 2012. Screening and selective quantification of illicit drugs in wastewater by mixed-mode solid-phase extraction and quadrupole time-of-flight liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal Chem* 84:1708–1717.
- [60] Fedorova G, Randak T, Lindberg RH, Grabic R. 2013. Comparison of the quantitative performance of a Q-Exactive high-resolution mass spectrometer with that of a triple quadrupole tandem mass spectrometer for the analysis of illicit drugs in wastewater. *Rapid Commun Mass Spectrom* 27:1751–1762.
- [61] van der Aa M, Bijlsma L, Emke E, Dijkman E, van Nuijs ALN, van de Ven B, Hernández F, Versteegh A, de Voogt P. 2013. Risk assessment for drugs of abuse in the Dutch watercycle. *Water Res* 47:1848–1857.
- [62] Heuett NV, Ramirez CE, Fernandez A, Gardinali PR. 2015. Analysis of drugs of abuse by online SPE-LC high resolution mass spectrometry: Communal assessment of consumption. *Sci Total Environ* 511: 319–330.
- [63] Hug C, Ulrich N, Schulze T, Brack W, Krauss M. 2014. Identification of novel micropollutants in wastewater by a combination of suspect and nontarget screening. *Environ Pollut* 184:25–32.

- [64] Hernández F, Ibañez M, Portolés T, Cervera MI, Sancho JV, López FJ. 2015b. Advancing towards universal screening for organic pollutants in waters. *J Hazard Mater* 282:86–95.
- [65] Peng, Y., Gautam, L., & Hall, S. W. (2019). The detection of drugs of abuse and pharmaceuticals in drinking water using solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. *Chemosphere*, 223, 438–447. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.02.040>
- [66] Aleksa, K., Walasek, P., Fulga, N., Kapur, B., Gareri, J., & Koren, G. (2012). Simultaneous detection of seventeen drugs of abuse and metabolites in hair using solid phase micro extraction (SPME) with GC/MS. *Forensic Science International*, 218(1), 31–36. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2011.10.002>
- [67] Alves, E., Ferreira, A. S. Agonia, Afonso, C. M., Cravo, S. M., Netto, A. Duarte P., Carvalho, F., & Dinis-Oliveira, R. J. (2015). Validation of a modified QuEChERS extraction/GC–MS methodology for quantification of drugs of abuse in human samples. *Toxicology Letters*, 238(2, Supplement), S376. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.08.1073>
- [68] Kusano, M., Sakamoto, Y., Natori, Y., Miyagawa, H., Tsuchihashi, H., Ishii, A., & Zaito, K. (2019). Development of “Quick-DB forensic”: A total workflow from QuEChERS-dSPE method to GC–MS/MS quantification of forensically relevant drugs and pesticides in whole blood. *Forensic Science International*, 300, 125–135. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2019.03.048>
- [69] V. Manzo, J. Goya-Pacheco, D. Arismendi, M. Becerra-Herrera, A. Castillo-Aguirre, R. Castillo-Felices, M. Rosero-Moreano, E. Carasek, P. Richter (2019) Cork sheet as a sorptive phase to extract hormones from water by rotating-disk sorptive extraction (RDSE) *Analytica Chimica Acta* Volume 1087, 9 December 2019, Pages 1-10
- [70] Kim, K. Y., & Oh, J.-E. (2020). Evaluation of pharmaceutical abuse and illicit drug use in South Korea by wastewater-based epidemiology. *Journal of Hazardous Materials*, 396, 122622. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122622>
- [71] Cheng, W. C., Yau, T. S., Wong, M. K., Chan, L. P., & Mok, V. K. K. (2006). A high-throughput urinalysis of abused drugs based on a SPE-LC-MS/MS method coupled with an in-house developed post-analysis data treatment system. *Forensic Science International*, 162(1–3), 95–107. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2006.04.019>
- [72] Cheng, W.-C., & Dao, K.-L. (2019). Prevalence of drugs of abuse found in testing of illicit drug seizures and urinalysis of selected population in Hong Kong. *Forensic Science International*, 299, 6–16. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2019.03.022>
- [73] Bassotti, E., Merone, G. M., D'Urso, A., Savini, F., Locatelli, M., Tartaglia, A., de Grazia, U. (2020). A new LC-MS/MS confirmation method for the determination of 17

drugs of abuse in oral fluid and its application to real samples. *Forensic Science International*, 110330. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2020.110330>

[74] Fernández, P., González, M., Regenjo, M., Ares, A. M., Fernández, A. M., Lorenzo, R. A., & Carro, A. M. (2017). Analysis of drugs of abuse in human plasma using microextraction by packed sorbents and ultra-high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1485, 8–19. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.01.021>

[75] Maralikova, B., & Weinmann, W. (2004). Confirmatory analysis for drugs of abuse in plasma and urine by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with respect to criteria for compound identification. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 811(1 SPEC. ISS.), 21–30. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.04.039>

[76] Concheiro, M., De Castro, A., Quintela, Ó., López-Rivadulla, M., & Cruz, A. (2006). Determination of drugs of abuse and their metabolites in human plasma by liquid chromatography-mass spectrometry: An application to 156 road fatalities. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 832(1), 81–89. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.12.047>

[77] Orfanidis, Amvrosios, Gika, H., Mastrogianni, O., Krokos, A., Theodoridis, G., Zaggelidou, E., & Raikos, N. (2018). Determination of drugs of abuse and pharmaceuticals in skeletal tissue by UHPLC–MS/MS. *Forensic Science International*, 290, 137–145. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2018.07.004>

[78] Baciú, T., Borrull, F., Aguilar, C., & Calull, M. (2016). Findings in the hair of drug abusers using pressurized liquid extraction and solid-phase extraction coupled in-line with capillary electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 131, 420–428. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.09.017>

[79] Orfanidis, A, Mastrogianni, O., Koukou, A., Psarros, G., Gika, H., Theodoridis, G., & Raikos, N. (2017). A GC–MS method for the detection and quantitation of ten major drugs of abuse in human hair samples. *Journal of Chromatography B*, 1047, 141–150. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.11.011>

[80] Girod, C., & Staub, C. (2000). Analysis of drugs of abuse in hair by automated solid-phase extraction, GC/EI/MS and GC ion trap/CI/MS. *Forensic Science International*, 107(1), 261–271. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0379-0738\(99\)00169-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0379-0738(99)00169-3)

[81] Fiorentin, T. R., Logan, B. K., Martin, D. M., Browne, T., & Rieders, E. F. (2020). Technical note: Assessment of a Portable Quadrupole-Based Gas Chromatography Mass Spectrometry for Seized Drug Analysis. *Forensic Science International*, 110342. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2020.110342>

[82] Bletsou AA, Jeon J, Hollender J, Archontaki E, Thomaidis NS. 2015. Targeted and non-targeted liquid chromatography-mass spectrometric workflows for

identification of transformation products of emerging pollutants in the aquatic environment. *TrAC Trends Anal Chem* 66:32–44.

[83] Bijlsma L, Emke E, Hernandez F, De Voogt P. 2012. Investigation of drugs of abuse and relevant metabolites in Dutch sewage water by liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry. *Chemosphere* 89:1399–1406.

[84] E. Omena, A. L. Oenning, J. Merib, P. Richter, M. Rosero-Moreano, and E. Carasek, "A green and simple sample preparation method to determine pesticides in rice using a combination of SPME and rotating disk sorption devices," *Anal. Chim. Acta*, vol. 1069, pp. 57–65, 2019.

[85] G. G. Saravanabhavan, R. Helleur, and J. Hellou, "GC–MS/MS measurement of natural and synthetic estrogens in receiving waters and mussels close to a raw sewage ocean outfall," *Chemosphere*, vol. 76, no. 8, pp. 1156–1162, 2009.

[86] Choi PM, Tscharke BJ, Donner E, Brien JWO, Grant SC, Kaserzon SL, et al. Trends in Analytical Chemistry Wastewater-based epidemiology biomarkers: Past, present, and future. *Trends Anal Chem* [Internet]. 2018; 105:453–69. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.06.004>

[87] Zheng Q, Gartner C, Tscharke BJ, Brien JWO, Gao J, Ahmed F, et al. Long-term trends in tobacco use assessed by wastewater-based epidemiology and its relationship with consumption of nicotine containing products. *Environ Int* [Internet]. 2020; 145(106088):1–6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106088>

[88] Zuccato E, Chiabrando C, Castiglioni S, Bagnati R, Fanelli R. Estimating Community Drug Abuse by Wastewater Analysis. *Environ Heal Perspect*. 2008; 116(8):1027–32.

[89] Gracia-Ior E, Zuccato E, Castiglioni S. Science of the Total Environment Re fi ning correction factors for back-calculation of illicit drug use. *Sci Total Environ* [Internet]. 2016; 573:1648–59. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.179>

[90] Kelly C. Machado, Marco Tadeu Grassi, Cristiane Vidal, Igor C. Pescara, Wilson F. Jardim, Andreia N. Fernandes, Fernando F. Sodré, Fernanda V. Almeida, Joyce S. Santana Maria Cristina Canela, Camila R.O. Nunes, Kátia M. Bichinho, Flaviana J.R. Severo A preliminary nationwide survey of the presence of emerging contaminants in drinking and source waters in Brazil *Science of The Total Environment*, (2016) 572, 138-146

[91] Workshop Drogas de abuso organizado por el Grupo SolinDrugs de la Universidad de Valencia disponible en Twitter diciembre 2020

[92] Esperanza Cárdenas Pachón | Comportamiento del consumo de sustancias psicoactivas entre los jóvenes de la Fundación Universitaria del Área Andina, Seccional Pereira, 2009-2010 *av.enferm.*, XXX (3): 60-69, 2012

- [93] Lubertus Bijlsma, Ana M. Botero-Coy, Rolando J. Rincón, Gustavo A. Peñuela, Félix Hernández. Estimation of illicit drug use in the main cities of Colombia by means of urban wastewater analysis. *Science of the Total Environment* 565 (2016) 984-993
- [94] El Reporte de drogas Colombia 2017, realizado por el Observatorio Colombiano de Drogas ODC del Ministerio de Justicia.
- [95] Eleazar Mena Vargas, Comunicación personal (2020), perito de Medicina Legal Regional Pereira
- [96] X. Chen, X. Zheng, K. Ding, Z. Zhou, C. G. Zhan, and F. Zheng, "A quantitative LC-MS/MS method for simultaneous determination of cocaine and its metabolites in whole blood," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 134, pp. 243-251, Feb. 2017.
- [97] A. W. Jones, "Forensic Drug Profile: Cocaethylene," *Journal of Analytical Toxicology*, vol. 43, no. 3. Society of Forensic Toxicologists, pp. 155-160, 01-Apr-2019.
- [98] D. Yao, X. Shi, L. Wang, B. A. Gosnell, and C. Chen, "Characterization of differential cocaine metabolism in mouse and rat through metabolomics-guided metabolite profiling," *Drug Metab. Dispos.*, vol. 41, no. 1, pp. 79-88, Jan. 2013.
- [99] E. T. Shimomura, G. F. Jackson, and B. D. Paul, "Chapter 17 - Cocaine, Crack Cocaine, and Ethanol: A Deadly Mix," in *Critical Issues in Alcohol and Drugs of Abuse Testing (Second Edition)*, Second Edi., A. Dasgupta, Ed. Academic Press, 2019, pp. 215-224.
- [100] R. L. Brim et al., "The ability of bacterial cocaine esterase to hydrolyze cocaine metabolites and their simultaneous quantification using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry," *Mol. Pharmacol.*, vol. 80, no. 6, pp. 1119-1127, Dec. 2011.
- [101] F. Zheng and C.-G. Zhan, "Chapter 67 - Actions of Butyrylcholinesterase Against Cocaine," in *The Neuroscience of Cocaine*, V. R. Preedy, Ed. San Diego: Academic Press, 2017, pp. 663-672.
- [102] M. Minoli et al., "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.*, vol. 172, pp. 167-174, Aug. 2019.
- [103] A. G. de Castro-Neto, R. C. Rameh-de-Albuquerque, P. F. P. de Medeiros, and R. Uchôa, "Chapter 55 - Neuroscience of Alcohol and Crack Cocaine Use: Metabolism, Effects and Symptomatology," in *Neuroscience of Alcohol*, V. R. Preedy, Ed. Academic Press, 2019, pp. 537-544.
- [104] T. M. Pizzolato, M. J. L. de Alda, and D. Barceló, "LC-based analysis of drugs of abuse and their metabolites in urine," *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 26, no. 6, pp. 609-624, Jun. 2007.

- [105] A. Orfanidis, H. Gika, G. Theodoridis, O. Mastrogianni, and N. Raikos, "Development of a UHPLC-MS/MS method for the determination of 84 pharmaceuticals and drugs of abuse in human liver," *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 1151, p. 122192, Aug. 2020.
- [106] Huestis MA. 2007. Human cannabinoid pharmacokinetics. *Chem Biodivers* 4:1770–1804. doi:10.1002/cbdv.200790152.Human
- [107] Koch CD, Xu L, Curtis SA, Roberts JD, Bunch DR, El-khoury JM. 2020. Clinica Chimica Acta Urinary cannabinoid mass spectrometry profiles differentiate dronabinol from cannabis use. *Clin Chim Acta* 510:515–521. doi:10.1016/j.cca.2020.08.014
- [108] Ocque AJ, Hagler CE, Difrancesco R, Lombardo J, Morse GD. 2019. Development and validation of an assay to measure cannabidiol and Δ^9 -tetrahydrocannabinol in human EDTA plasma by UHPLC-MS/MS. *J Chromatogr B* 1112:56–60. doi:10.1016/j.jchromb.2019.03.002
- [109] Palazzoli F, Citti C, Licata M, Vilella A, Manca L, Zoli M, Vandelli MA, Forni F, Cannazza G. 2018. Development of a simple and sensitive liquid chromatography triple quadrupole mass spectrometry (LC – MS/MS) method for the determination of cannabidiol (CBD), 9 -tetrahydrocannabinol (THC) and its metabolites in rat whole blood after oral adminis. *J Pharm Biomed Anal* 150:25–32. doi:10.1016/j.jpba.2017.11.054
- [110] Lacroix C, Saussereau E. 2012. Fast liquid chromatography/tandem mass spectrometry determination of cannabinoids in micro volume blood samples after dabsyl derivatization. *J Chromatogr B* 905:85–95. doi:10.1016/j.jchromb.2012.08.006
- [111] Concheiro M, Lee D, Lendoiro E, Huestis MA. 2013. Simultaneous quantification of 9 -tetrahydrocannabinol , 11-nor-9-carboxy-tetrahydrocannabinol , cannabidiol and cannabinol in oral fluid by microflow-liquid chromatography – high resolution mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1297:123–130. doi:10.1016/j.chroma.2013.04.071
- [112] Schwope DM, Karschner EL, Gorelick DA, Huestis MA. 2011. Identification of Recent Cannabis Use: Whole-Blood and Plasma Free and Glucuronidated Cannabinoid Pharmacokinetics following Controlled Smoked Cannabis Administration. *Clin Chem* 57:1406–1414. doi:10.1373/clinchem.2011.171777
- [113] Brunet B, Mura P. 2014. Cannabis and Drug-Facilitated Crimes Toxicological Aspects of Drug-Facilitated Crimes. Elsevier Inc. pp. 139–158. doi:10.1016/B978-0-12-416748-3.00006-2
- [114] Pichini S, Malaca S, Gottardi M, Pérez-Acevedo AP, Farr M, Papaseit E, Perez-Mañá C, Pacifici R, Tagliabracci A, Mannocchi G, Busardo FP. 2021. UHPLC-MS/MS analysis of cannabidiol metabolites in serum and urine samples . Application to an individual treated with medical cannabis. *Talanta* 223:1–7.

- [115] Dulaurent S, Gaulier JM, Imbert L, Morla A, Lachatre G. 2014. Simultaneous determination of D9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol, cannabinol and 11-nor-D 9-tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in hair using liquid chromatography – tandem mass spectrometry. *Forensic Sci Int* 236:151–156. doi:10.1016/j.forsciint.2014.01.004
- [116] Jensen TL, Wu F, McMillin GA. 2019. Detection of in utero Exposure to Cannabis in Paired Umbilical Cord Tissue and Meconium by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Clin Mass Spectrom* 14:115–123. doi:10.1016/j.clinms.2019.01.002
- [117] Scheidweiler KB, Newmeyer MN, Barnes AJ, Huestis MA. 2016. Quantification of cannabinoids and their free and glucuronide metabolites in whole blood by disposable pipette extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1453:34–42. doi:10.1016/j.chroma.2016.05.024
- [118] Gerace E, Petrova S, Di Corcia D, Salomone A, Vincenti M. 2020. Determination of cannabinoids in urine, oral fluid and hair samples after repeated intake of CBD-rich cannabis by smoking. *Forensic Sci Int* 1–6. doi:10.1016/j.forsciint.2020.110561
- [119] Mercolini L, Mandrioli R, Protti M, Conti M, Serpelloni G, Raggi MA. 2013. Monitoring of chronic Cannabis abuse: An LC–MS/MS method for hair analysis. *J Pharm Biomed Anal* 76:119–125. doi:10.1016/j.jpba.2012.12.015
- [120] Montesano C, Sergi M, Odoardi S, Simeoni MC, Compagnone D, Curini R. 2014. Analysis A μ -SPE procedure for the determination of cannabinoids and their metabolites in urine by LC–MS/MS. *J Pharm Biomed Anal* 91:169–175. doi:10.1016/j.jpba.2013.12.035
- [121] Fattore M, Montesano D, Pagano E, Teta R, Borrelli F, Mangoni A, Seccia S, Albrizio S. 2016. Journal of Food Composition and Analysis Carotenoid and flavonoid profile and antioxidant activity in "Pomodoro Vesuviano" tomatoes. *J Food Compos Anal* 53:61–68. doi:10.1016/j.jfca.2016.08.008
- [122] Míguez-Framil M, Cocho JÁ, Tabernero MJ, Bermejo AM, Moreda-Piñeiro A, Bermejo-Barrera P. 2014. An improved method for the determination of Δ 9-tetrahydrocannabinol, cannabinol and cannabidiol in hair by liquid chromatography – tandem mass spectrometry. *Microchem J* 117:7–17. doi:10.1016/j.microc.2014.05.015
- [123] Beekwilder J, Alvarez M, Neef E, Verstappen FWA, Bouwmeester HJ. 2004. Functional Characterization of Enzymes Forming Volatile Esters from Strawberry and Banana. *Plant Physiol* 135:1865–1878. doi:10.1104/pp.104.042580.during
- [124] Mortelé O, Vervliet P, Gys C, Degreef M, Cuykx M, Maudens K, Covaci A, Nuijs A, Lai FY. 2018. In vitro Phase I and Phase II metabolism of the new designer benzodiazepine cloniprazepam using liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* 153:158–167. doi:10.1016/j.jpba.2018.02.032

[125] Cartiser N, Bévalot F, Meur C Le, Gaillard Y, Malicier D, Hubert N, Guitton J. 2011. Gas chromatography – tandem mass spectrometry assay for the quantification of four benzodiazepines and citalopram in eleven postmortem rabbit fluids and tissues , with application to animal and human samples. *J Chromatogr B* 879:2909–2918. doi:10.1016/j.jchromb.2011.08.023

[126] Linares Rebollo M. 2013. Identificación de metabolitos de benzodiazepinas en orina mediante las técnicas de inmunoensayo y GC/MS

[127] Banaszkiwicz L, Kacper M, Kata M, Domagalska E, Wiergowski M, Szpiech B, Kot-Wasik A. 2020. Rapid and simple multi-analyte LC – MS / MS method for the determination of benzodiazepines and Z-hypnotic drugs in blood samples: Development , validation and application based on three years of toxicological analyses. *J Pharm Biomed Anal* 191:1–11

[128] Boeck M De, Missotten S, Dehaen W, Tytgat J, Cuypers E. 2017. Development and validation of a fast ionic liquid-based dispersive liquid – liquid microextraction procedure combined with LC – MS / MS analysis for the quantification of benzodiazepines and benzodiazepine-like hypnotics in whole blood. *Forensic Sci Int* 274:44–54. doi:10.1016/j.forsciint.2016.12.026

[129] Kim J, Lee S, In S, Choi H, Chung H. 2011. Validation of a simultaneous analytical method for the detection of 27 benzodiazepines and metabolites and zolpidem in hair using LC – MS / MS and its application to human and rat hair. *J Chromatogr B* 879:878–886. doi:10.1016/j.jchromb.2011.02.038

[130] Lee H, Park Yujin, Jo J, In S, Park Yonghoon, Kim E, Pyo J, Choe S. 2015. Analysis of benzodiazepines and their metabolites using DBS cards and LC–MS/MS. *Forensic Sci Int* 255:137–145. doi:10.1016/j.forsciint.2015.07.004

[131] Ming DS, Heathcote J. 2011. A rapid and accurate UPLC/MS/MS method for the determination of benzodiazepines in human urine. *J Chromatogr B* 879:421–428. doi:10.1016/j.jchromb.2010.12.029

[132] Dziadosz M, Teske J, Henning K, Klintschar M, Nordmeier F. 2018. LC–MS/MS screening strategy for cannabinoids, opiates, amphetamines, cocaine, benzodiazepines and methadone in human serum, urine and post-mortem blood as an effective alternative to immunoassay based methods applied in forensic toxicology for preliminary. *Forensic Chem* 7:33–37. doi:10.1016/j.forc.2017.12.007

[133] Švidrnoch M, Boránová B, Tomková J, Ondra P, Maier V. 2018. Simultaneous determination of designer benzodiazepines in human serum using non-aqueous capillary electrophoresis – Tandem mass spectrometry with successive multiple ionic – Polymer layer coated capillary. *Talanta* 176:69–76. doi:10.1016/j.talanta.2017.08.010

[134] Petterson M, Helander A, Beck O. 2016. Development and application of a multi-component LC–MS/MS method for determination of designer

benzodiazepines in urine. *J Chromatogr B* 1035:104–110. doi:10.1016/j.jchromb.2016.08.047

[135] Wohlfarth A, Vikingsson S, Roman M, Andersson M, Kugelberg FC, Green H, Kronstrand R. 2017. Looking at flubromazolam metabolism from four different angles : Metabolite profiling in human liver microsomes , human hepatocytes , mice and authentic human urine samples with liquid chromatography high-resolution mass spectrometry. *Forensic Sci Int* 274:55–63. doi:10.1016/j.forsciint.2016.10.021

[136] Pallmann T, Jonas U, Wagner M, Thevis M, Kaefenstein H, Rothschild MA, Bender K. 2010. Enzyme-assisted synthesis and structural characterization of pure benzodiazepine glucuronide epimers. *Eur J Pharm Sci* 39:233–240. doi:10.1016/j.ejps.2009.12.005

[137] Boels D, Chhun S, Meyer G, Lelièvre B, Souday V. 2019. Clinical consequences related to a defective elimination of clobazam caused by homozygous mutated CYP2C19 allele. *Clin Toxicol* 1–5. doi:10.1080/15563650.2018.1550198

[138] El-haj BM, Ahmed SBM. 2020. Metabolic-hydroxy and carboxy functionalization of Alkyl Moieties in Drug Molecules: Prediction of Structure Influence and Pharmacologic Activity. *Molecules* 25:1–29

[139] Hosagrahara V, Hansen L, Remmel RP. 2017. Induction of the metabolism of midazolam by rifampin in cultured porcine hepatocytes : Preliminary evidence for CYP3A isoforms in pigs. *Drug Metab Dispos* 27:1512–1518

[140] Klieber S, HUGLA S, Ngo R, Arabeyre-Fabre C, Meunier V, Sadoun F, Fedeli O, Rival M, Bourrie M, Guillou F, Maurel P, Fabre G. 2008. Contribution of the N-Glucuronidation Pathway to the Overall in Vitro Metabolic Clearance of Midazolam in Humans. *Drug Metab Dispos* 36:851–862. doi:10.1124/dmd.107.019539.MDZ

[141] Leahy JT, Chu-shore CJ, Fisher JL. 2011. Clobazam as an adjunctive therapy in treating seizures associated with Lennox – Gastaut syndrome. *Neuropsychiatr Dis Treat* 7:673–681

[142] Mandrioli R, Mercolini L, Raggi MA. 2008. Benzodiazepine Metabolism: An Analytical Perspective. *Curr Drug Metab* 9:827–844

[143] Moody DE. 2012. Drug Interactions with Benzodiazepines: Epidemiologic Correlates with Other CNS Depressants and In Vitro Correlates with Inhibitors and Inducers of Cytochrome P450 3A4 *Handbook of Drug Interactions: A Clinical and Forensic Guide*. pp. 25–116. doi:10.1007/978-1-61779-222-9

[144] Pavlic M, Libiseller K, Grubwieser P, Schubert H, Rabl W. 2007. Medicolegal aspects of tetrazepam metabolism. *Int J Leg Med* 121:169–174. doi:10.1007/s00414-006-0118-6

- [145] Schubert B, Pavlic M, Libiseller K, Oberacher H. 2008. Unraveling the metabolic transformation of tetrazepam to diazepam with mass spectrometric methods. *Anal Bioanal Chem* 392:1299–1308. doi:10.1007/s00216-008-2447-4
- [146] Shini S. 2000. A review of diazepam and its use in the horse. *J equine Vet Sci* 20:443–449
- [147] Smith M, Evans L, Eadie M, Tyrer J. 1979. Pharmacokinetics of Prazepam in Man. *Eur J Clin Pharmacol* 16:141–147
- [148] Tian D-D, Leonowens C, Cox EJ, González-Pérez V, Frederick KS, Scarlett Y V, Fisher MB, Paine MF. 2019. Indinavir Increases Midazolam N -Glucuronidation in Humans: Identification of an Alternate CYP3A Inhibitor Using an In Vitro to In Vivo Approach. *Drug Metab Dispos* 47:724–731
- [149] Tóth K, Csukly G, Sirok D, Belic A, Kiss Á, Háfra E, Déri M, Menus Á, Bitter I, Monostory K. 2016. Optimization of Clonazepam Therapy Adjusted to Patient ' s CYP3A Status and NAT2 Genotype. *Int J Neuropsychopharmacol* 19:1–9. doi:10.1093/ijnp/pyw083
- [150] Watanabe S, Vikingsson S, Åstrand A, Auwärter V, Gréen H. 2019. Metabolism of the benzodiazepines norflurazepam , flurazepam , fludiazepam and cinolazepam by human hepatocytes using high - resolution mass spectrometry and distinguishing their intake in authentic urine samples. *Forensic Toxicol* 1–16. doi:10.1007/s11419-019-00488-9
- [151] Wennerholm A. 2003. Characteristics of cytochrome p450- catalysed drug metabolism with focus on a black tanzanian population
- [152] Qiao S, Xu H, Zhang W, Yang W, Guo D, Wang W, et al. Identification of characteristic heroin metabolites in urine based on data- mining technology and multivariate statistics analysis combined with a targeted verification approach for distinguishing heroin abusers. *J Chromatogr B* [Internet]. 2020;1152:1–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2020.122251>
- [153] Dinis-Oliveira RJ. Metabolism and metabolomics of opiates: A long way of forensic implications to unravel. *J Forensic Leg Med* [Internet]. 2019;61:128–40. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jflm.2018.12.005>
- [154] Thaulow CH, Høiseth G, Andersen JM, Handal M, Mørland J. Pharmacokinetic interactions between ethanol and heroin : A study on post-mortem cases. *Forensic Sci Int* [Internet]. 2014;242:127–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2014.06.032>
- [155] Stefanidou M, Athanaselis S, Spiliopoulou C, Dona A, Maravelias C. Biomarkers of opiate use. *International J Clin Pract*. 2010;64:1712–8.

- [156] Jakobsson G, Truver MT, Wrobel SA, Gréen H, Kronstrand R. Heroin-Related Compounds and Metabolic Ratios in Postmortem Samples Using LC–MS–MS. *J Anal Toxicol*. 2020;1–11.
- [157] Bogen IL, Boix F, Nerem E, Mørland J, Andersen JM. A Monoclonal Antibody Specific for 6-Monoacetylmorphine Reduces Acute Heroin Effects in Mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 2014;568–76.
- [158] Meadway C, George S, Braithwaite R. A rapid GC – MS method for the determination of dihydrocodeine, codeine, norcodeine , morphine, normorphine and 6-MAM in urine. *Forensic Sci Int*. 2002;127:136–41.
- [159] Qi X-H, Mi J-Q, Zhang X-X, Chang W-B. Design and preparation of novel antibody system and application for the determination of heroin metabolites in urine by capillary electrophoresis. *Anal Chim Acta*. 2005;551:115–23.
- [160] Qian Y, Gilliland TK, Markowitz JS. The influence of carboxylesterase 1 polymorphism and cannabidiol on the hepatic metabolism of heroin. *Chem Biol Interact* [Internet]. 2020;316:108914. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.108914>