

cejfe

Valoració de l'etilglucurònid com a biomarcador de consum recent d'alcohol etílic en detinguts de catalunya (2019)

Ajut a la investigació 2020

Autors

Francisco Javier Defez Torán - Metge Forense

Geli Gallego Herruzo - Metgessa Forense. Cap del Servei de Laboratori Forense IMLCFC

Cristina Banchs Ruiz - Titulada Superior Químic

Helena Martín Sánchez - Titulada Superior Químic

Inmaculada Agustí Grediaga - Auxiliar/Tècnic

Any 2021



El Centre d'Estudis Jurídics i Formació Especialitzada ha editat aquesta recerca respectant el text original dels autors, que en són responsables de la correcció lingüística.

Les idees i opinions expressades en la recerca són de responsabilitat exclusiva dels autors, i no s'identifiquen necessàriament amb les del Centre d'Estudis Jurídics i Formació Especialitzada.

Avis legal



Els continguts d'aquesta obra estan subjectes a una llicència de Reconeixement _no Comercial_ Sense Obra derivada 4.0. Internacional (CC BY-NC-ND 4.0) de Creative Commons. Se'n permet la reproducció, la distribució i la comunicació pública sempre que se'n citi el titular dels drets (Generalitat de Catalunya, Centre d'Estudis Jurídics i formació Especialitzada) i no se'n faci un ús comercial. Aquesta obra no es pot transformar per generar obres derivades. La llicència completa es pot consultar a: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

© **Generalitat de Catalunya**
Centre d'Estudis Jurídics
i Formació Especialitzada

Índex

Resum -----	1
Resumen -----	2
Abstract -----	3
Introducció -----	4
Finalitat del projecte-----	5
Objectius -----	6
Marc teòric -----	7
Antecedents del tema i estat actual-----	7
La valoració de la toxicomania en detinguts-----	8
L'orina com a mostra per a anàlisi toxicològica-----	9
El Servei de Laboratori Forense (SLF)-----	11
Etanol-----	13
Epidemiologia del consum d'etanol-----	14
Toxicocinètica de l'etanol-----	15
Detecció de l'etanol al laboratori-----	16
Limitacions en la determinació d'etanol en un detingut-----	17
Etilglucurònid (EtG)-----	18
Detecció de l'EtG al laboratori-----	19
El desenvolupament d'una tècnica de confirmació d'un anàlit al laboratori -----	22
Revisió bibliogràfica-----	23
Estudi de la molècula-----	23
Comprovació de tècniques d'extracció de l'anàlit problema-----	23
Extracció en fase sòlida (Solid Phase Extraction – SPE)-----	23
Extracció en fase líquida o extracció amb dissolvents (Liquid solvent extraction – L L)-----	24
Comprovació de tècniques analítiques confirmatòries amb equips cromatogràfics amb patrons-----	26
La cromatografia-----	26
Els detectors-----	28
Comprovació de l'estabilitat de la substància problema en el temps-----	29
Hipòtesi -----	30

Metodologia (material i mètodes)	31
Part 1 - Estudi epidemiològic de la població objecte de pericial de toxicomania a Catalunya al 2019	31
Tipus d'estudi realitzat	31
Mostra d'estudi	31
Variables estudiades	32
Part 2 - Desenvolupament de la tècnica de confirmació per a la determinació d'EtG.	33
Cerca bibliogràfica	33
Estudi de les característiques moleculars de l'EtG:	33
Comprovació de tècniques d'extracció de l'EtG	34
Comprovació de tècniques analítiques confirmatòries per a patrons d'EtG amb equips cromatogràfics del SLF	39
Substàncies i reactius	39
Patrons	39
Instrumentació	41
Condicions cromatogràfiques	42
Comprovació de l'estabilitat de l'EtG en el temps.	48
Aspectes ètics:	49
Resultats	50
Part 1	50
Part 2	56
Cerca bibliogràfica	56
Característiques moleculars de l'EtG	56
Tècniques d'extracció de l'EtG	58
Tècniques analítiques confirmatòries per a patrons d'EtG amb equips cromatogràfics del SLF	61
Comprovació de l'estabilitat de l'EtG en el temps.	65
Discussió dels resultats	66
Limitacions	70
Conclusions	71
Propostes	73
Referències bibliogràfiques (bibliografia)	74

Annexos	79
Annex 1: Llistat d'abreviatures i símbols	79
Annex 2: Taula resum de les extraccions valorades amb el resultat	82

Resum

En pericials de toxicomania de detinguts que refereixen consum d'alcohol es pot obtenir una mostra d'orina per a la determinació d'etilglucurònid, un dels seus metabòlits. Tenir-ne un mètode analític de confirmació és de gran utilitat.

Objectius: 1) Estudi retrospectiu de les pericials toxicològiques de consum d'etanol en detinguts. 2) Valorar la utilitat de l'etilglucurònid com a biomarcador de consum d'etanol en orines de detinguts. 3) Desenvolupar un mètode analític confirmatori de detecció d'etilglucurònid com a millora respecte a mètodes presumptius d'immunoassaig.

Metodologia: Estudi de les pericials de toxicomania a l'IMLCFC al 2019 amb presa de mostra d'orina rebuda al SLF: variables epidemiològiques, judicials i toxicològiques. Desenvolupament de tècnica de confirmació per a etilglucurònid: estudi molecular, assaig de tècniques d'extracció i de detecció cromatogràfica, i comprovació de l'estabilitat.

Resultats: De 2911 pericials valorades en 127 s'havia pres una mostra d'orina, (homes 93,8%, mitjana de 35,8 anys); en detinguts, el 28% de casos negatius a etanol van ser positius a etilglucurònid, el 44% va ser positiu quan aquests referien un consum recent d'etanol. L'etilglucurònid és una molècula polar, derivatitzable, àcida, descomposable a 150°C, amb un espectre de fragmentació característic. Es van provar 9 extraccions, una va resultar-ne la més eficient. 23 proves diferents amb cromatògrafs de gasos no van detectar l'etilglucurònid. La cromatografia de líquids no va poder ser avaluada.

Conclusions: La detecció d'etilglucurònid en orina en valoracions de detinguts és útil quan refereixen un consum recent d'alcohol. La cromatografia de líquids és la tècnica confirmatòria més adient per a la determinació d'aquest metabòlit.

Paraules clau: etilglucurònid, etanol, mètode de confirmació, detingut

Resumen

En periciales de toxicomanía de detenidos que refieran consumo de alcohol se puede obtener una muestra de orina para la determinación de etilglucurónido, uno de sus metabolitos. Tener su método analítico de confirmación es de gran utilidad.

Objetivos: 1) Estudio retrospectivo de periciales toxicológicas de consumo de etanol en detenidos. 2) Valorar utilidad del etilglucurónido como biomarcador de consumo de etanol en orinas de detenidos 3) Desarrollar un método analítico confirmatorio de detección del etilglucurónido como mejora respecto a métodos presuntivos de inmunoensayo.

Metodología: Estudio de periciales de toxicomanía del IMLCFC en el 2019 con toma de muestra de orina recibida en el SLF: variables epidemiológicas, judiciales y toxicológicas. Desarrollo de técnica de confirmación para el etilglucurónido: estudio molecular, ensayo de técnicas de extracción y de detección cromatográfica, y comprobación de su estabilidad.

Resultados: De 2911 periciales valoradas, en 127 se había tomado una muestra de orina, (hombres 93,8%, media de 35,8 años); en detenidos, el 28% de casos negativos a etanol fueron positivos a etilglucurónido, el 44% fue positivo cuando éstos referían un consumo reciente de etanol. El etilglucurónido es una molécula polar, derivatizable, ácida, que descompone a 150°C, con un espectro de fragmentación característico. Se probaron 9 extracciones, una resultó la más eficiente. 23 pruebas diferentes con cromatógrafos de gases no detectaron etilglucurónido. La cromatografía líquida no se pudo evaluar.

Conclusiones: Detectar etilglucurónido en orina en valoraciones de detenidos es útil cuando refieren consumo reciente de alcohol. La cromatografía líquida es la técnica confirmatoria más adecuada para determinar este metabolito.

Palabras clave: etilglucurónido, etanol, método de confirmación, detenido

Abstract

In drug addiction evaluations of arrested people who admit to alcohol consumption, it is possible to obtain a urine sample for ethylglucuronide determinations, a metabolite of alcohol. It is very useful to have a confirmatory analysis method for it.

Objectives: 1) Retrospective study of toxicological evaluations of alcohol consumption in arrested people. 2) To assess utility of ethylglucuronide as a biomarker of alcohol consumption in urine of arrested. 3) To develop a confirmatory analysis method as an improvement to immunological screening assays.

Methods: Drug addiction evaluations study, with urine sample received in SLF, in IMLCFC in 2019: epidemiological, judicial and toxicological variables. Development of ethylglucuronide confirmatory analysis method: molecular study, extraction and chromatographic detection procedures, and stability check.

Results: a urine sample was taken in 127 of 2911 evaluations, (men 93,8%, mean 35,8 years old); in arrested people, 28% ethanol negative cases were ethylglucuronide positive, and 44% were positive when they admitted to recent alcohol consumption. Ethylglucuronide is a polar compound, able to derivatize, acid, decomposable at 150°C, with a characteristic fragmentation pattern. 9 extractions were performed, one of them was the most efficient. 23 different tests with gas-chromatography didn't detect ethylglucuronide. Liquid-chromatography couldn't be tested.

Conclusions: Urine ethylglucuronide detection in arrested people is useful when they admit to recent alcohol consumption. Liquid-chromatography is the most recommended confirmatory analysis method for this metabolite determination.

Keywords: ethylglucuronide, ethanol, confirmatori analysis method, arrested people

Introducció

Els metges forenses són un cos de funcionaris de carrera que desenvolupen funcions d'assistència tècnica a Jutjats, Tribunals, Fiscalies i Oficines del Registre Civil, en les matèries de la seva disciplina professional.

Dins de les funcions que tenen, en el marc de l'activitat del Jutjat de Guàrdia, es troben, entre altres, l'assistència al detingut i la realització de pericials de toxicomania.

Les pericials de toxicomania, que poden realitzar-se a detinguts, a excarcelats o a investigats, impliquen una valoració de la biografia de l'explorat, la psicobiografia, els antecedents patològics, l'historial del consum i les referències de consum en el moment dels fets enjudiciats. En alguns dels casos, l'exploració es pot acompanyar d'una exploració física per determinar estigmes de consum de tòxics; igualment, i depenent del cas, es pot valorar la presa de mostres biològiques per tal de corroborar o contradir el relat del detingut, en relació al consum de substàncies en el moment dels fets denunciats.

Tenint en compte la cronologia que s'esdevé habitualment, en el cas dels detinguts, la mostra més idònia és l'orina que, després de ser remesa al Servei de Laboratori Forense (SLF) de l'Institut de Medicina Legal i Ciències Forenses de Catalunya (IMLCFC), s'analitza. El resultat de l'anàlisi toxicològica es remet al jutjat i al metge forense qui, amb tota la informació obtinguda, pot emetre un informe medicoforense definitiu.

L'etanol és la droga d'abús més consumida al món i, tenint en compte les alteracions cognitives i conductuals que pot tenir en la persona que la consumeix, pot estar implicada en situacions de delictes (lesions, furts, violència sobre la dona, etc.). Si bé la seva anàlisi pot resultar d'utilitat

medicolegal i judicial, en el marc d'un detingut, l'etanol no sempre es pot determinar, a causa del seu ràpid metabolisme. En aquests casos, pot resultar útil la determinació de l'etilglucurònid (EtG), un dels seus metabòlits. Actualment, al SLF es determina l'EtG mitjançant una tècnica de despistatge (*screening*).

Finalitat del projecte

Aquest projecte del SLF, que té com a títol *Valoració de l'etilglucurònid com a biomarcador de consum recent d'alcohol etílic en detinguts de Catalunya*, va ser concebut per trobar una metodologia de detecció confirmatòria de l'anàlit EtG, i demostrar-ne la utilitat per al metge forense en la valoració del consum d'alcohol en detinguts. Per la qual cosa, era necessari la realització d'un estudi amb un equip multidisciplinar format per metges forenses i facultatius químics/bioquímics del Servei.

Per part de l'equip investigador s'ha iniciat el procés per tal de desenvolupar una tècnica analítica de confirmació de l'anàlit EtG en orina, conforme als mitjans i equipament del qual disposa el SLF de l'IMLCFC.

Paral·lelament, s'ha estudiat la població objecte d'aquesta anàlisi, amb les seves característiques judicials, epidemiològiques i, especialment, toxicològiques, per tal de conèixer la població susceptible d'aquesta determinació analítica, i el context en què pot ser útil per als metges forenses.

Objectius

1. Realitzar un estudi retrospectiu de les pericials toxicològiques de consum d'etanol a l'Institut de Medicina Legal i Ciències Forenses de Catalunya en detinguts a Catalunya en 2019.
2. Valorar la utilitat dels biomarcadors de consum d'etanol (concretament l'etilglucurònid) en mostres de detinguts rebudes al Servei de Laboratori Forense l'any 2019.
3. Desenvolupar un mètode analític confirmatori de detecció d'etilglucurònid com a millora respecte a mètodes presumptius.

Marc teòric

Antecedents del tema i estat actual

La prevalença del consum de drogues al nostre medi és elevada, cosa que comporta un elevat interès com a causa de morbiditat i mortalitat. Actualment, predomina el consum de drogues legals, i dins d'aquestes, l'alcohol (alcohol etílic o etanol) és la substància psicoactiva més freqüent: el 93% de la població de 15 a 64 anys manifesta haver consumit begudes alcohòliques algun cop a la vida. (Observatorio Español de las Drogas y las Adicciones, 2021).

A l'àmbit judicial, aquest consum té elevada importància, ja que la jurisprudència majoritària entén en l'abús de drogues una disminució de la imputabilitat del subjecte, en funció de la seva incidència en les capacitats intel·lectuals i volitives (Vázquez-Portomeñe F, 2016). És, per tant, la intoxicació plena o l'abús/addicció a substàncies una de les atenuants possibles sol·licitades per la defensa. L'*Observatorio contra la violencia doméstica y de género*, en la seva anàlisi de les sentències dictades en l'any 2018 per motiu d'homicidi o assassinat per violència de gènere, feia referència que, de 38 sentències, en 10 s'havien apreciat circumstàncies modificatives de la responsabilitat penal. D'aquestes, 3 apreciaven l'atenuant d'embriaguesa o addicció a substàncies, i en cap cas, l'eximent completa o incompleta. En altres 3 casos, havien estat al·legades per la defensa, però rebutjades pels tribunals, com a la sentència de l'Audiència Provincial (AP) de Badajoz 5/2018 en què es fa constar que "*no hay pruebas, ni análisis médicos, ni testigos que lo justifiquen*". (Observatorio contra la violencia doméstica y de género, 2020)

Així, per a l'apreciació de l'eximent/atenuant de la responsabilitat penal es precisa d'una connexió entre la drogoaddicció i el fet delictiu, i per establir-la,

s'ha de valorar que la disminució de les capacitats psíquiques estigui present en el moment de cometre el delictes (Vázquez-Portomeña F, 2016). Per aquest motiu, i quan l'exploració medicoforensa es realitza temps després dels fets, la detecció de drogues d'abús, com l'etanol, als laboratoris forenses en matrius biològiques obtingudes de la persona investigada pot acreditar un consum previ i recent de substàncies, i orientar cap a una afectació cognitiva i/o volitiva en funció de l'historial de consum.

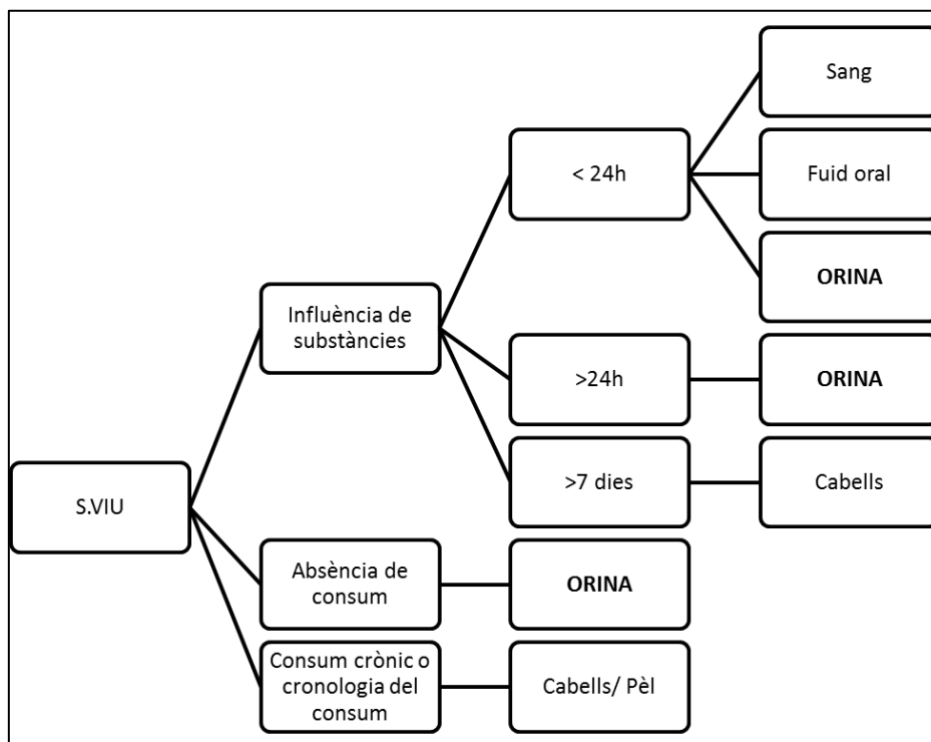
La valoració de la toxicomania en detinguts

Les pericials de toxicomania són habituals a la pràctica medicoforensa i consisteixen en una exploració medicolegal del subjecte, principalment respecte del seu consum de tòxics referit o documentat.

En les valoracions de toxicomanies de detinguts en les quals el subjecte refereix haver consumit un tòxic prèviament als fets, la presa d'una mostra biològica per tal de realitzar-ne anàlisis toxicològiques té especial rellevància ja que aquestes pericials es fan habitualment en un moment proper als fets (de 24 a 72 hores després).

Tenint en compte la cronologia d'aquests casos, l'obtenció d'una mostra d'orina seria la més adequada per a aquestes valoracions, ja que el tòxic, habitualment, de 24-48 hores en endavant, ja no es troba en sang. Malgrat això si la seva eliminació encara no ha estat completa, es poden trobar en orina restes del tòxic o dels seus metabòlits.

Igualment, per a aquest tipus de valoracions, una mostra de cabell no seria útil, ja que després de la seva anàlisi no pot donar aquest tipus d'informació toxicològica. (Imatge 1)



Imatge 1: Recomanacions generals en el mostreig del subjecte viu en drogues d'abús (adaptat de Marrón T *et al*, 2020)

L'orina com a mostra per a anàlisi toxicològica

L'orina és una substància aquosa que es produeix al ronyó, com a producte del filtratge de la sang. En ella es troben dissolts productes de rebuig de l'organisme, i a més es poden trobar tòxics i/o els seus metabòlits.

És una mostra que es pot obtenir fàcilment del subjecte viu. La seva obtenció implica un procediment senzill i no agressiu per a la persona explorada (Imatge 2).

S'ha de recollir per micció voluntària i preferentment presenciada, tota la mostra que es pugui en un flascó estèril i tancat de 50 mL, al qual no cal afegir-li cap tipus d'additiu ni conservant.



Convé conservar-la refrigerada a 4°C fins al moment de la seva anàlisi.

Imatge 2: Mostra d'orina arribada al SLF per a anàlisi toxicològica

Les mostres d'orina, de la mateixa manera que totes les mostres que s'obtenen en el marc d'un procediment medicolegal, han d'estar correctament identificades, acompanyades de la sol·licitud d'anàlisi i de la corresponent cadena de custòdia.

Per tal de ser analitzades, les mostres s'han de remetre al laboratori corresponent.

L'orina es considera una matriu d'eliminació, per tant significa que la detecció de tòxics i/o metabòlits es pot relacionar amb un consum previ de la substància i no amb el fet que el subjecte estigui sota els efectes de la droga en el moment de la presa de la mostra.

SUBSTÀNCIA	TEMPS
Amfetamines/metamfetamina	48 h
Cocaïna	2-4 dies
Cànnabis	
Consum ocasional	3 dies
Consum moderat (4 cops/setmana)	5-7 dies
Consum diari	10-15 dies
Consum habitual prolongat	30 dies
Opioides	
Morfina, codeïna i heroïna	48 h
Metadona	3 dies

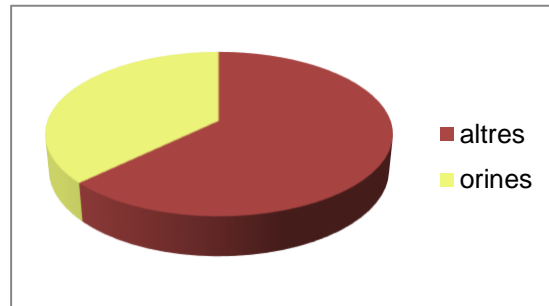
Taula 1. Taula de drogues: Extracte de la taula de l'article Martínez Sánchez L, Velasco Rodríguez J, 2010 (Adaptada)

El Servei de Laboratori Forense (SLF)

D'acord al Reglament dels Instituts de Medicina Legal (RD 296/96, de 23 de febrer), el Serveis de Laboratori Forense realitzaran anàlisis biològiques, clíniques i de toxicologia.

El SLF de l'IMLCFC és un dels laboratoris pericials encarregats de realitzar les determinacions en aquests tipus de mostres, i es troba a les dependències de la Ciutat de la Justícia de Barcelona i l'Hospitalet de Llobregat. Rep mostres per a fer anàlisis d'actuacions medicolegals de tota Catalunya .

Durant l'any 2019, al SLF es van rebre 4580 casos, 4001 dels quals van ser per a estudis toxicològics.



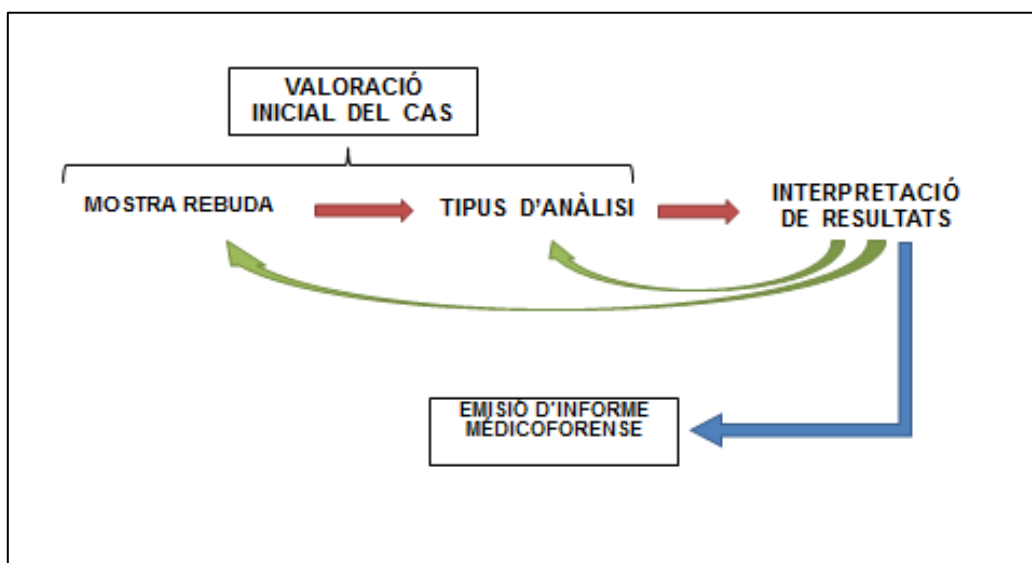
El 34% de les mostres (1533) rebudes eren de subjecte viu, de les quals 569 eren d'orina (Gràfic 1). (IMLCFC, 2019)

Gràfic 1: Distribució de les mostres de subjecte viu rebudes al SLF per a anàlisi toxicològica l'any 2019.

Altres: correspon a mostres de cabell i sang, principalment

La realització d'anàlisis toxicològiques implica un seguit de tasques, que es realitzen per part del personal que treballa al SLF: metges forenses, facultatius químics i auxiliars/tècnics de laboratori. Tots els casos rebuts al SLF se sotmeten als procediments normalitzats de treball del Servei, que inclouen les següents fases (Imatge 3):

1. Recepció, registre i conservació de les mostres:
Rebuda del cas al laboratori, comprovació de la documentació i registre al laboratori.
2. Avaluació del cas:
Valoració medicolegal del cas i decisió de tipus d'anàlisi i submostra a analitzar.
3. Pretractament de la mostra:
Preparació de la mostra, d'acord a la tècnica escollida.
4. Anàlisi i interpretació de resultats:
Injecció de la mostra a l'aparell i interpretació de resultats.



Imatge 3: Esquema del circuit avaluació-anàlisi de mostres al SLF.

Les diferents tècniques de pretractament i anàlisi de la mostra (reactius, aparells, etc.) ve donada per les característiques d'aquesta, el cas en qüestió i, molt especialment, el tipus de tòxic que es vol analitzar.

Els tòxics que principalment s'analitzen i es detecten al SLF són les drogues d'abús habituals, entre elles, especialment l'etanol, que representa pràcticament el 25% del total de les anàlisis toxicològiques realitzades al SLF anualment (5504 anàlisis realitzades l'any 2019). (IMLCFC, 2019).

Etanol

L'etanol o alcohol etílic, anomenat de manera comuna com a alcohol, és la droga d'abús més consumida al món, conjuntament amb el tabac, amb importants implicacions individuals i socials. Això suposa també un elevat nombre d'implicacions medicolegals. Per exemple, les principals causes de mort relacionades amb el consum d'etanol en menors de 35 anys van ser lesions intencionades (suïcidis i homicidis), i no intencionades (accidents de trànsit, caigudes, cremades...) (Colom, J, Segura-García, L, 2020; Ministerio de Sanidad, 2020), totes aquestes subsidiàries d'autòpsia judicial.

Es consumeix principalment per via oral, en forma de begudes alcohòliques, que poden tenir una quantitat variable d'alcohol pur.

És una droga depressora del sistema nerviós central, i l'afectació que produeix a l'organisme, tant a nivell físic com psíquic, ha estat àmpliament estudiada. El seu consum agut produeix una falsa eufòria a baixes concentracions i una progressiva depressió de les funcions del subjecte conforme n'augmenta la dosi consumida. El consum crònic d'alcohol pot produir diferents problemes mèdics de diferent gravetat.

El seu consum pot estar associat a situacions de violència contra la parella, entre joves, etc. encara que es discuteix que aquest sigui la causa directa d'aquestes accions. No obstant, és coneguda l'afectació directa en les capacitats cognitives i físiques, amb reducció de l'autocontrol, disminució de la capacitat de processament de la informació i avaluació de riscos, increment de la labilitat emocional i la impulsivitat, entre altres, de forma que els individus són menys capaços de trobar una solució no violenta als problemes i les confrontacions (Organización Mundial de la Salud, 2006a; 2006b) .

És una droga que produeix tolerància, dependència i una síndrome d'abstinència amb simptomatologia greu. Els trastorns psiquiàtrics relacionats amb l'ús de l'etanol es recullen al DSM-V (American Psychiatric Association, 2013), manual de referència en l'especialitat de psiquiatria.

Epidemiologia del consum d'etanol

L'alcohol és un dels principals factors de risc que es poden preveure de malaltia i mort en el món (Villalbí, J.R., Bosques-Prous, M, 2020). L'Organització Mundial de la Salut (OMS) xifra en unes 3 milions de morts en el món a causa del consum nociu d'alcohol, i estableix que el 5,1% de la

càrrega mundial de morbiditat i lesions és atribuïble a aquest consum (OMS, 2018).

A Espanya el consum d'alcohol és el quart factor de risc en percentatge d'anys de vida ajustats per discapacitat, i en el període de 2010-2017 es van produir més de 15000 morts a l'any atribuïbles a l'alcohol (Colom, J *et al*, 2020).

Segons el ja mencionat informe EDADES, el consum d'etanol és estable, i se situa en valors alts, en població entre 15 i 64 anys. Predomina en homes i sobretot el consum de cervesa i vi els dies laborables. Al 2019, un 77,2% de la població enquestada va manifestar haver consumit alcohol l'últim any, i un 63% en l'últim més, i d'aquests, un 15,4% havia fet aquest consum en forma de consum episòdic intensiu – *binge drinking* – (Observatorio Español de las Drogas y las Adicciones, 2021). És aquest *binge drinking* el que suposa més conseqüències negatives per a altres persones, per a la societat i per a l'economia.

Toxicocinètica de l'etanol

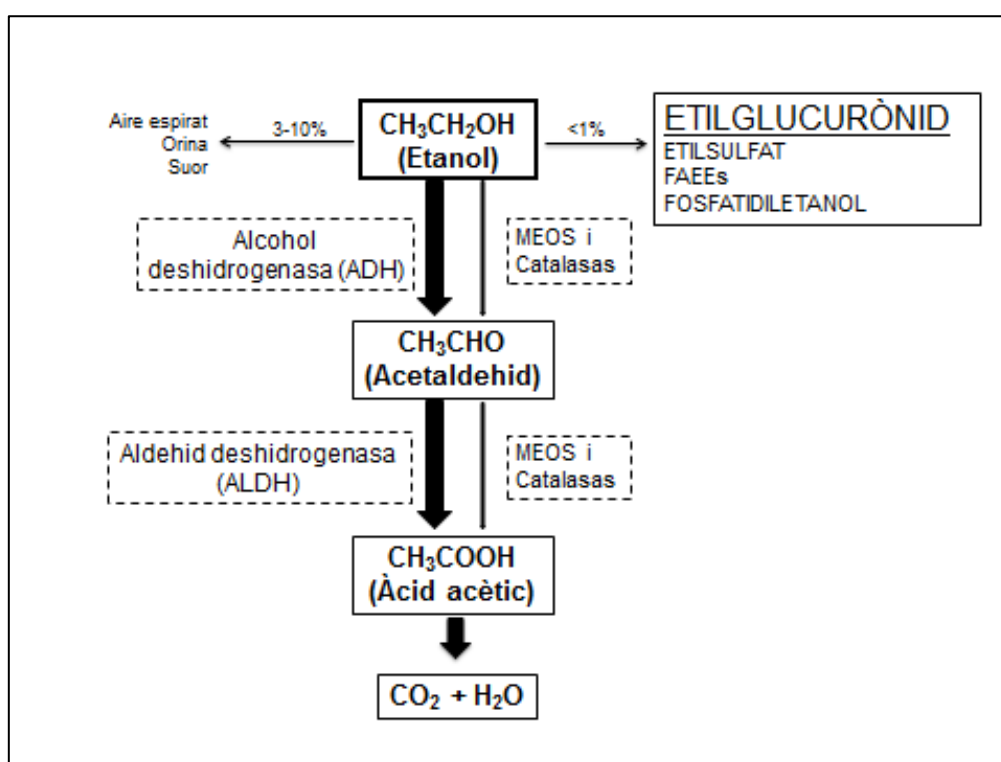
La toxicocinètica és el conjunt de processos que pateix un tòxic, des de la seva entrada a l'organisme humà (absorció) fins a la seva sortida (eliminació). Conèixer i entendre la toxicocinètica d'una substància és molt important per a l'anàlisi de la mostra i per a la interpretació correcta dels resultats toxicològics.

El consum d'etanol es fa principalment per via oral, motiu pel qual la seva absorció és majoritàriament digestiva (a nivell de la mucosa intestinal). Un cop absorbit, es distribueix ràpida i àmpliament per l'organisme, a través de la sang. A nivell de sistema nerviós central, travessa fàcilment la barrera hematoencèfalica, de manera que arriba sense problemes al cervell, on té els principals efectes psicoactius.

Per a la seva eliminació, només una molt petita part absorbida s'elimina directament per orina, suor i aire espirat, mentre que la majoria de l'etanol es

metabolitza. Aquest metabolisme de l'etanol té lloc principalment al fetge, per unes vies principals i unes minoritàries (Imatge 4):

- Les vies principals del metabolisme hepàtic de l'etanol són les de l'alcohol-aldehid deshidrogenasa i el sistema microsomal oxidatiu de l'etanol (MEOS)
- Les vies minoritàries del metabolisme hepàtic són les de les catalases i la conjugació.



Imatge 4: Esquema del metabolisme de l'etanol. Elaboració pròpia.

Detecció de l'etanol al laboratori

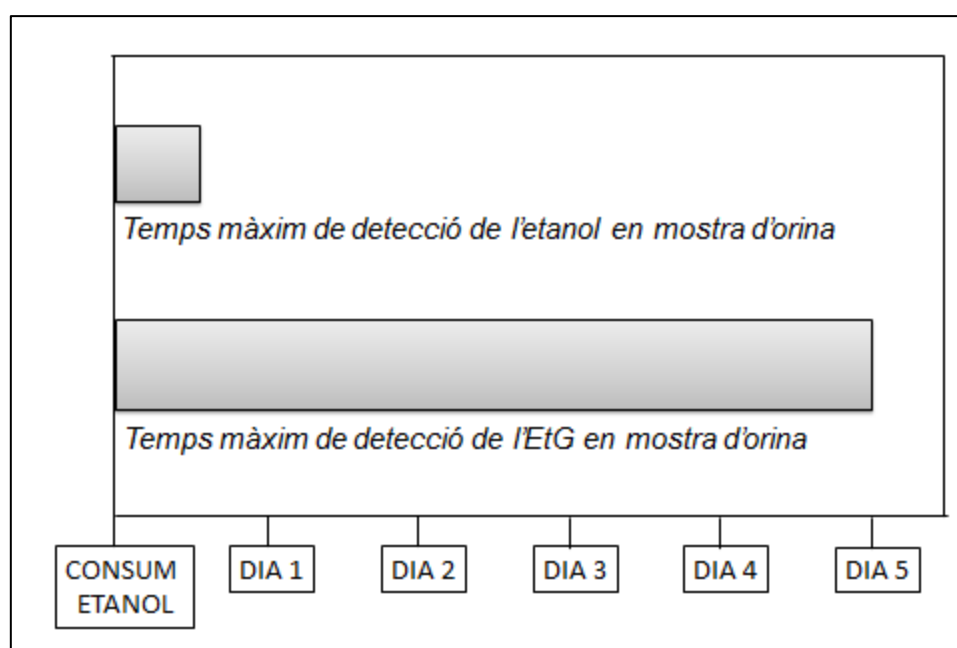
Existeixen diferents tècniques i aparells amb els quals es poden detectar l'etanol en mostres biològiques.

Com ja s'ha comentat anteriorment, la detecció de l'etanol al SLF de l'IMLCFC és una constant d'anàlisi a les mostres biològiques, i es realitza mitjançant la

tècnica cromatogràfica confirmatòria següent: la cromatografia de gasos (CG) amb espai de cap (*headspace*-HS) i detector d'ionització de flama (FID), CG-HS/FID. En algunes situacions particulars, es pot fer servir també la CG amb detecció per espectrometria de masses (CG-MS).

Limitacions en la determinació d'etanol en un detingut

En el cas particular de l'alcohol, davant d'un detingut que en manifesti el consum, i pel temps transcorregut entre aquest i la visita del metge forense, la determinació directa d'etanol, en sang i orina, està limitada, ja que aquest tòxic s'elimina de l'organisme, normalment, en 10-12h. En aquests casos s'ha de valorar-ne la detecció dels metabòlits, principalment, l'EtG. (Imatge 5).



Imatge 5: Cronologia comparativa de detecció d'etanol i EtG en mostres d'orina. Elaboració pròpia

Etilglucurònid (EtG)

És un metabòlit minoritari de l'etanol, de forma que només el 0,02-0,06% de l'alcohol consumit es transforma en EtG, per la glucuronització d'aquest dins del cos humà (Imatge 6). Amb aquest procés metabòlic s'aconsegueix una substància més hidrofílica i fàcil d'eliminar (Høiseth, G, 2007).



Imatge 6: Esquema de biotransformació de l'etanol en etilglucurònid. Elaboració pròpia

Un cop format l'EtG es pot trobar a les mostres habituals de sang, orina i cabell, i d'altres menys habituals com ara el meconi o teixits *postmortem*, i és detectable fins a 24 – 130 hores després del consum, període en el qual l'etanol ja s'ha eliminat completament de l'organisme. Aquesta característica analítica el converteix en un biomarcador (o marcador bioquímic) directe del consum d'etanol, i és freqüentment utilitzat per tal de confirmar l'abstinència a alcohol en subjectes en tractament deshabitador, principalment (Barrio, P, Wurst, F.M., Gual, A, 2018). No obstant, no té una relació quantitativa amb l'etanol consumit.

Al Servei de Laboratori Forense de l'IMLCFC, la determinació d'EtG s'analitza en orina, principalment en subjectes vius, com ara en casos d'agressions sexuals i mesures de seguretat. En el cas particular dels detinguts, pot ajudar al metge forense a fer pericials toxicològiques més acurades d'aquests, quan s'al·lega un consum d'alcohol previ als fets; en definitiva, ajuda que aquestes pericials puguin ser més útils als tribunals de justícia.

Detecció de l'EtG al laboratori

La determinació d'EtG al SLF es realitza mitjançant tècniques d'immunoassaig homogeni DRI®.

Les tècniques d'immunoassaig són tècniques presumptives, ràpides i sensibles però poc específiques, de manera que es poden produir falsos negatius i falsos positius. Aquesta tècnica permet la detecció de substàncies de forma qualitativa o semiquantitativa (Marrón T *et al*, 2020).

Es basa en el principi de la unió competitiva antígen-anticòs:

- Antigen (Ag): és l'anàlit problema que es pot trobar a la mostra, en el aquest cas seria l'EtG
- Anticòs (Ac): forma part del reactiu comercial, i interactua específicament amb l'Ag

Depenent de la presència o absència de l'anàlit a la mostra (Ag), es produeix un senyal mesurable mitjançant un aparell analitzador.

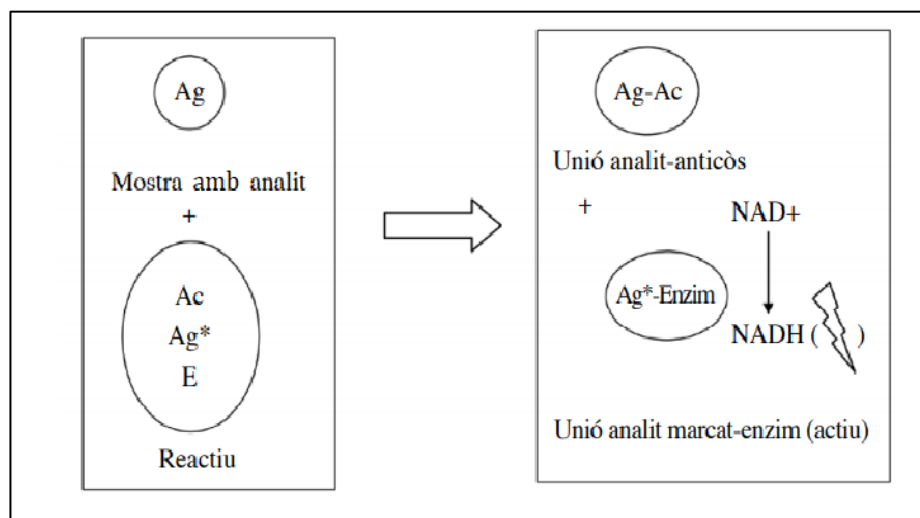
Concretament, la tècnica DRI®, és una tècnica d'enzimoimmunoassaig (EIA) que fa servir l'enzim glucosa-6-fosfat deshidrogenasa (G6P). El reactiu que es fa servir en aquesta tècnica conté:

- El complex (Ag-Ac)
- L'enzim G6P (E)
- El cofactor (NAD⁺)

Es poden produir dues situacions possibles en funció de si l'anàlit problema està present o no a la mostra:

- En presència de l'anàlit problema (Ag):

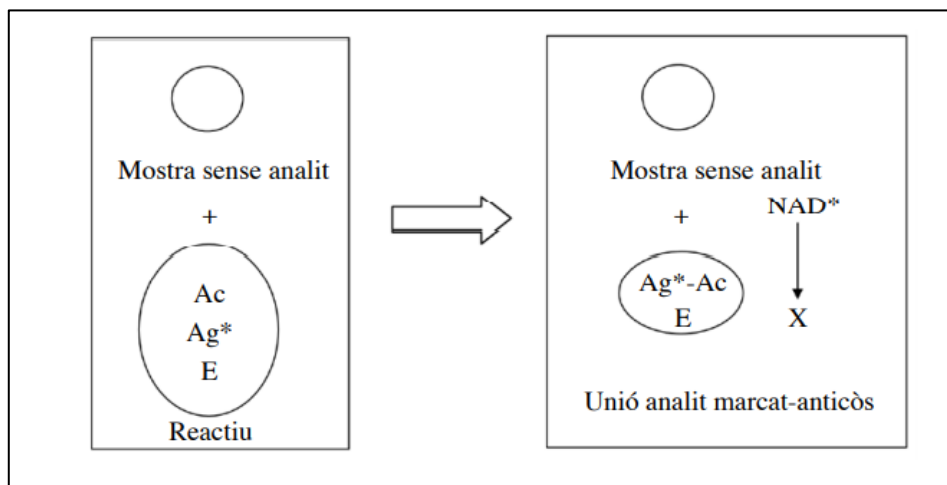
En afegir el reactiu, l'antigen de mostra problema té major afinitat per l'anticòs i desplaça l'Ag del reactiu. Aquest Ag lliure forma un complex amb l'enzim (E), Ag-E que actua sobre la NAD^+ , el transforma en NADPH, i provoca un senyal detectable. A més quantitat d'anàlit problema, més senyal s'obté (Imatge 7).



Imatge 7: Esquema de reacció de la tècnica d'enzimoimmunoassaig DRI® en presència d'anàlit problema (Marrón T *et al*, 2020)

- En absència d'anàlit problema:

En afegir el reactiu (Ag-Ac), aquest Ag no s'allibera i no hi ha cap reacció amb l'enzim (E). El cofactor NAD^+ no es transforma i no es produeix cap senyal mesurable. (Imatge 8).



Imatge 8: Esquema de reacció de la tècnica d'enzimimmunoassaig DRI® en absència d'anàlit problema (Marrón T *et al*, 2020)

A dia d'avui, la tècnica de confirmació per a la detecció de l'EtG no està posada a punt al SLF de l'IMLCFC, a diferència de la de detecció de l'etanol (Taula 2).

TÈCNIQUES		ETANOL	ETG
Confirmatòries	Cromatografia de gasos acoblada a detector per ionització de flama, amb injecció per espai de cap "headspace" (HS-GC-FID)	X	
	Cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses (GC/MS)	X	
Screening o despistatge	Enzimoimmunoassaig homogeni DRI®		X

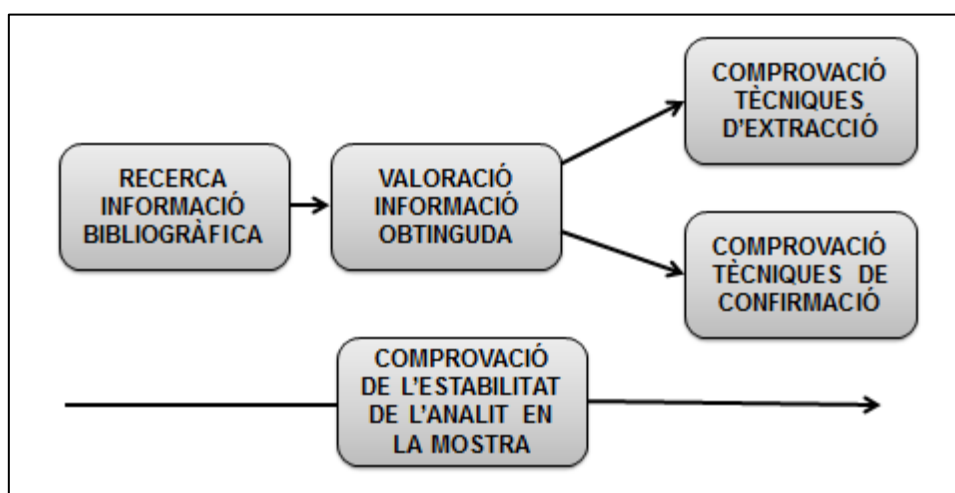
Taula 2: Resum de tècniques de detecció de l'etanol i l'EtG al SLF en el moment actual

El desenvolupament d'una tècnica de confirmació d'un anàlit al laboratori

A tots els laboratoris, especialment als que es dediquen a tasques pericials, la posada en marxa de procediments de confirmació de substàncies és seqüencial, tenint en compte diversos aspectes, entre ells, la necessitat de detecció. D'aquesta manera, amb el pas del temps i l'aparició o generalització de consum de noves substàncies, els laboratoris amplien el seu catàleg de substàncies que poden detectar.

En els laboratoris, com és el cas de l'etilglucurònid al SLF, algunes substàncies es detecten mitjançant immunoassaig (proves de despistatge també anomenades d'*screening*) i, si es considera necessari, es poden desenvolupar tècniques de confirmació.

Per tal de posar en marxa la tècnica de confirmació d'un anàlit, és recomanable dur a terme un seguit d'etapes (Imatge 9), que es detallen a continuació:



Imatge 9: Esquema de les etapes en el desenvolupament d'una tècnica de confirmació d'un anàlit al laboratori. Elaboració pròpia.

Revisió bibliogràfica

Recopilació d'articles científics sobre els aspectes més rellevants de la substància i els seus mètodes d'anàlisi (publicats per parts d'altres laboratoris), sempre tenint en compte les capacitats tècniques del laboratori.

Estudi de la molècula

Valoració de les característiques fisicoquímiques de l'anàlit, obtingudes de la bibliografia existent, per tal de poder dissenyar les condicions adequades del mètode d'anàlisi.

Aquesta informació és necessària per conèixer com les molècules queden retingudes a la columna cromatogràfica i com es fragmenten, aspectes bàsics per a la seva detecció.

Comprovació de tècniques d'extracció de l'anàlit problema

Per tal de poder detectar i/o quantificar un tòxic en una mostra, cal realitzar-ne primer un procediment d'extracció. Aquestes tècniques permeten obtenir una petita quantitat de solució líquida on estan dissolts els anàlits presents a una mostra, cosa que permet una anàlisi més acurada. Existeixen diferents procediments d'extracció, uns més generals i d'altres més específics per a certes substàncies.

Les principals tècniques d'extracció són:

Extracció en fase sòlida (Solid Phase Extraction – SPE)

És una tècnica que permet la concentració i separació d'un anàlit mitjançant una fase sòlida estacionària (un cartutx o columna cromatogràfica iònica que

actua com a filtre, de manera que es fa passar la mostra a través seu). S'utilitza habitualment al SLF en matriu complexa com ara la sang.

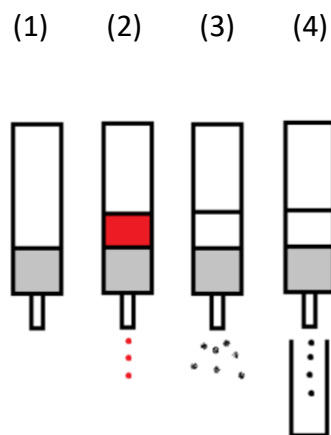
La SPE consta de 4 etapes :

(1) acondicionament de cartutx

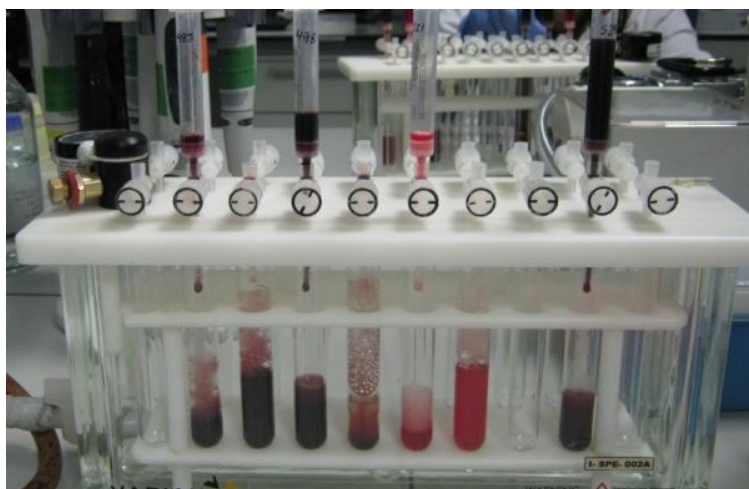
(2) addició de mostra on queden absorbits els anàlits

(3) neteja per eliminar impureses

(4) elució dels anàlits d'interès amb una barreja de dissolvents



Imatge 10: Esquema del procés de SPE (Marrón T *et al*, 2020)



Extracció en fase líquida o extracció amb dissolvents (Liquid solvent extraction – L L)

És una tècnica que permet la concentració i separació d'un anàlit aprofitant la diferència de solubilitat entre dos líquids immiscibles (que no es poden barrejar entre ells, com per exemple aigua i oli). Un dels líquids és la mostra

problema (fase aquosa) i l'altre és el dissolvent que extreu l'anàlit d'interès (fase orgànica). La barreja dels dos líquids s'agita i l'anàlit passa a la fase orgànica (per major afinitat); aquesta última, després de la separació, és la que s'analitzarà.

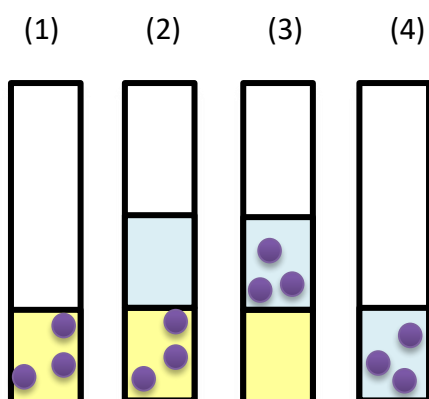
El procediment L-L consta de 4 fases:

(1) Addició de la mostra d'orina a un tub (fase aquosa)

(2) Addició del dissolvent (fase orgànica)

(3) Barreja de les dues fases, l'anàlit d'interès passa a la fase orgànica.

(4) Separació de la fase orgànica amb els anàlits d'interès.



Imatge 12: Esquema del procés de L-L.

Elaboració pròpia



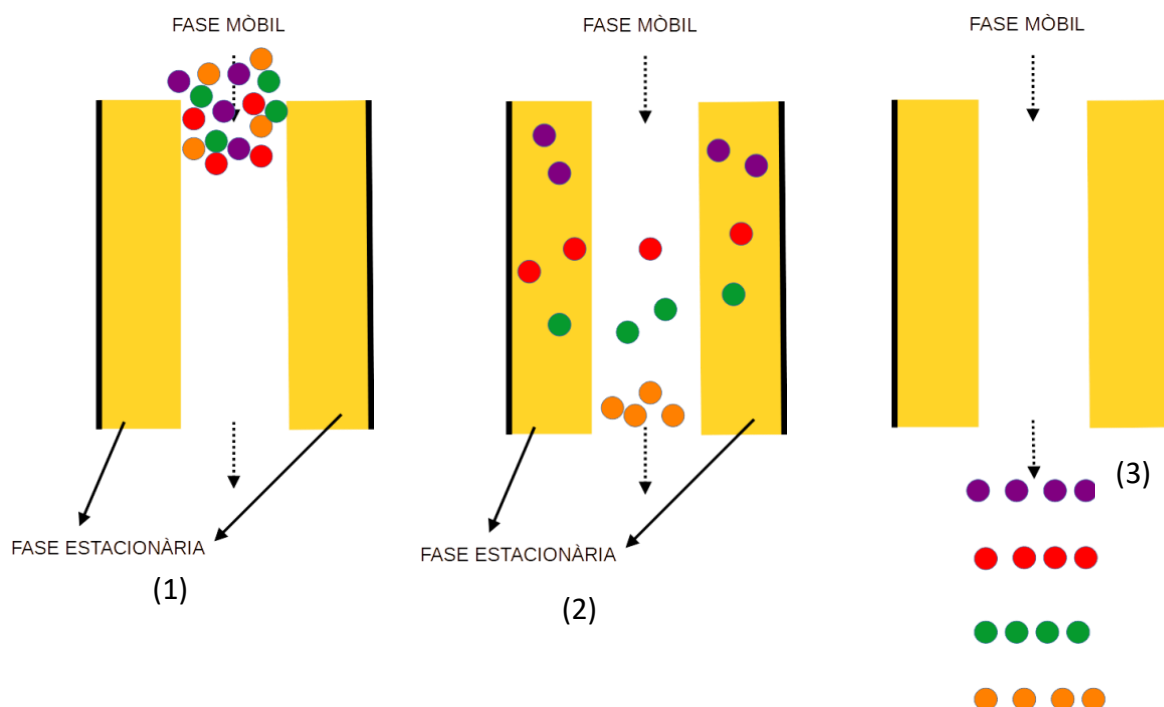
Imatge 13: Procés de L-L en set mostres d'orina al SLF

Comprovació de tècniques analítiques confirmatòries amb equips cromatogràfics amb patrons

Es basen en tècniques cromatogràfiques.

La cromatografia

La cromatografia és una tècnica analítica de separació de substàncies d'una mescla. Es basa en la interacció entre les substàncies de la mostra amb 2 fases: una fase mòbil que transporta la mostra, i una fase estacionària. En funció de la naturalesa de les molècules (mida, polaritat, grups funcionals, estructura...), aquestes presenten diferent afinitat per a les dues fases, de forma que unes quedaran més retingudes per la fase estacionària, mentre que altres viatjaran més lliurement juntament a la fase mòbil, i així se separaran unes de les altres.



Imatge 14 : Esquema del procés cromatogràfic en una columna capil·lar de cromatografia de gasos. Elaboració pròpia.

- (1) Les substàncies entren a la columna cromatogràfica mesclades.
- (2) Les diferents substàncies (diferents colors) queden més o menys retingudes a la columna.
- (3) Les substàncies surten separades de la columna.

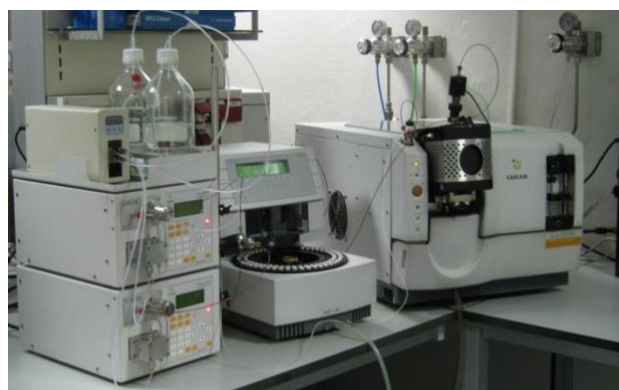
La fase estacionària es troba fixada sobre un suport anomenat columna.

Atenent a la naturalesa de la fase mòbil, existeixen diferents tipus de cromatografies:

- En la **cromatografia de gasos** (GC) és un gas. Aquesta permet la separació de diferents compostos fàcilment volatilitzables i tèrmicament estables. En algunes substàncies, cal fer una modificació (derivatització) per millorar la seva volatilitat i estabilitat, afegint algun reactiu per a formar derivats, com ara els trimetilsilats (TMS).
- En la **cromatografia líquida** (LC) és un líquid. Permet la separació de compostos no volàtils, molècules grans, substàncies amb baixa estabilitat tèrmica o compostos iònics. La tècnica més utilitzada actualment és la cromatografia líquida d'alta afinitat (*High Performance Liquid Chromatography*-HPLC), que és una tècnica d'alta sensibilitat i selectivitat.



Imatge 15: Equip GC-MS del SLF



Imatge 16: Equip HPLC-MS/MS del SLF

Per introduir una mostra al cromatògraf, i per tal de posar-la en contacte amb la fase mòbil i l'estacionària, s'utilitza un sistema d'injecció. El més senzill és la injecció directa de la mostra, però en alguns casos, en què les substàncies són més volàtils, com l'etanol, s'utilitza un sistema anomenat injecció en espai

de cap (*headspace* – HS). Aquesta tècnica consisteix en sotmetre la mostra, introduïda a un vial hermètic, a una temperatura controlada un temps concret, de forma que l'anàlit volàtil passa a la part gasosa del vial, que és el que s'injectarà al cromatògraf, de manera que s'evita que passin a la columna les substàncies no desitjades.

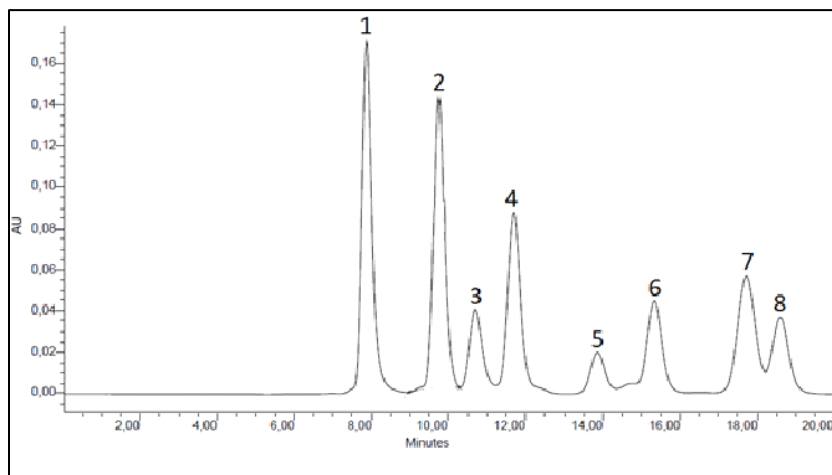
En resum, la mostra s'introdueix a l'equip d'anàlisi mitjançant un sistema d'injecció i, després que les substàncies recorrin la columna, ja separades, arriben a un detector.

Els detectors

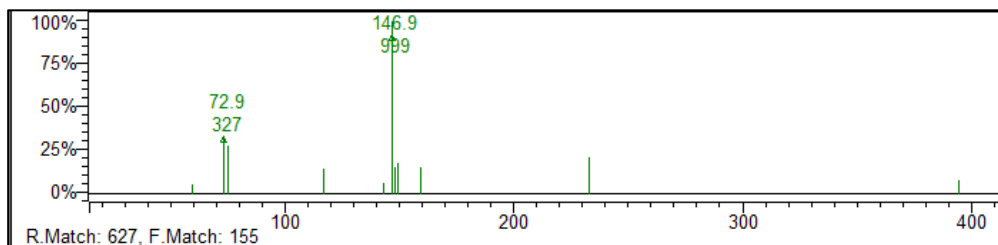
Identifiquen les substàncies i en permeten la quantificació. Hi han diferents tipus de detectors basats en diferents tècniques.

El detector més utilitzat actualment es basa en l'**espectrometria de masses** (*Mass Spectrometry-MS*). Aquesta és una tècnica d'anàlisi utilitzada per obtenir informació sobre l'estructura de les molècules. Al detector es fragmenten i s'ionitzen els fragments. El conjunt de fragments ionitzats, amb la corresponent intensitat de cadascun és el que s'anomena espectre de masses (Imatge 18). És característic de la molècula, cosa que permet un alt nivell d'identificació de les substàncies, i es pot considerar com la seva empremta química. Una variant de la MS és l'**espectrometria de masses/masses** (MS/MS) que realitza una doble fragmentació, de manera que s'obté un resultat més identificatiu de les substàncies analitzades i una sensibilitat més alta.

Finalment, quan s'utilitza un cromatògraf acoblat a un espectròmetre de masses s'obté un cromatograma (Imatge 17) on es mostren les diferents substàncies separades (pics) i, per a cadascuna, el seu espectre de masses (Imatge 18).



Imatge 17: Exemple de cromatograma. (<https://www.researchgate.net>)



Imatge 18: Exemple d'espectre de masses. Elaboració pròpia

Comprovació de l'estabilitat de la substància problema en el temps

Un aspecte important, un cop s'han comprovat les tècniques anteriors amb l'anàlit comercial (patró) del tòxic, és comprovar la detecció en mostres reals (detectar la substància problema en mostres biològiques que se sap que la contenen).

Per aquest motiu, confirmar l'estabilitat de la substància és un procediment indispensable que permet descartar que la manca de reproductibilitat de les proves analítiques al llarg del temps sigui per culpa de la degradació de la pròpia substància.

Hipòtesi

La determinació d'etilglucurònid en orina, en detinguts, és un marcador analític de molta utilitat en la pràctica medicoforense habitual, quan s'al·lega un consum recent d'etanol. El seu interès medicolegal fa rellevant el disposar d'una tècnica confirmatòria per a la seva detecció al SLF del IMLCFC.

Metodologia (material i mètodes)

Aquest projecte es va organitzar en dues parts diferenciades, cada una d'elles amb una metodologia pròpia, que es corresponen a dues seccions específiques de l'apartat de resultats.

Totes les parts del projecte han estat portades a terme al Servei de Laboratori Forense de l'Institut de Medicina Legal i Ciències Forenses de Catalunya, per part de l'equip investigador.

Part 1 - Estudi epidemiològic de la població objecte de pericial de toxicomania a Catalunya al 2019

Tipus d'estudi realitzat

Estudi retrospectiu, transversal i descriptiu, de les pericials toxicològiques per a valoració de consum d'etanol en detinguts, realitzades en l'IMLCFC (en l'àmbit de totes de les divisions), a l'any 2019.

Mostra d'estudi

Per tal de realitzar aquest estudi, s'han considerat aquelles pericials de toxicomanies en les quals s'havia obtingut una mostra d'orina.

Per aquest motiu, s'han valorat totes les pericials toxicològiques realitzades pels metges forenses de l'IMLCFC de tota Catalunya introduïdes al programa informàtic EJCAT com a actuacions "Toxicomania/drogues", des de l'1 de gener de 2019 al 31 de desembre de 2019. El número de pericials valorades va ser de 2911, de les quals 127 van complir els criteris d'inclusió en l'estudi.

Variables estudiades

S'han recollit variables epidemiològiques, judicials, i toxicològiques dels informes presents en el programa EJCAT:

- Informes medicoforenses
- Sol·licituds de toxicologia per al laboratori
- Informes de resultats d'anàlisi toxicològica

Mentre es revisaven els casos, s'ha considerat complementar les variables proposades inicialment amb altres d'interès medicoforense.

Variables epidemiològiques:
<ul style="list-style-type: none">• Sexe del detingut• Edat del detingut• Tipus de consum d'alcohol: ocasional, crònic o recent• Si la pericial és per acreditar o no una deshabitació de consum
Variables judicials:
<ul style="list-style-type: none">• Divisió IMLCFC• Partit judicial• Tipus de jutjat sol·licitant• Tipus de procediment• Origen de la sol·licitud de la pericial• Detingut sí/no• Hores transcorregudes des del delictes
Variables toxicològiques:
<ul style="list-style-type: none">• Mostra rebuda: sang, orina i/o cabells• Data de recollida de la mostra• Característiques de la mostra al arribar al SLF• Data de la realització de l'anàlisi d'etanol• Resultat de l'anàlisi d'etanol• Data de la realització de l'anàlisi per immunoassaig de l'EtG• Resultat de l'anàlisi per immunoassaig de l'EtG• Data de la realització de l'anàlisi per cromatografia de l'EtG• Resultat de l'anàlisi per cromatografia de l'EtG• Altres troballes toxicològiques

Taula 3: Variables estudiades en l'estudi epidemiològic

Amb aquestes dades obtingudes per a cada un dels casos, s'ha creat una base de dades on s'han inclòs tots ells, de manera anonimitzada.

Part 2 - Desenvolupament de la tècnica de confirmació per a la determinació d'EtG.

Per tal de realitzar aquesta part del treball, s'han dut a terme les següents tasques:

Cerca bibliogràfica

Revisió bibliogràfica a partir d'articles científics cercats a la base de dades Medline (Pubmed) i a altres repositoris. S'han utilitzat combinacions de les paraules clau següents: *etilglucuronide, ethanol, urine, method, chromatography, analisis, determination, GC-MS, HPLC-MS, mass spectrum*. S'han considerat articles recents (a partir de l'any 2000).

Igualment, s'han consultat llibres de referència en matèria de toxicologia i química.

S'han valorat:

- característiques de l'anàlit
- tècniques d'extracció
- tècniques de confirmació

Estudi de les característiques moleculars de l'EtG:

Valoració pormenoritzada de les seves característiques fisicoquímiques, per tal de poder dissenyar les condicions adequades del mètode d'anàlisi.

Les dades principals són: polaritat, possibilitat de ser derivatitzada, pes molecular i temperatura de descomposició.

Comprovació de tècniques d'extracció de l'EtG

S'han valorat 9 tipus d'extraccions diferents: 6 de tipus SPE i 3 de tipus L-L.

Algunes d'elles són d'ús habitual al SLF per a anàlisis toxicològiques (5,6,7,8 i 9); d'altres són tècniques d'extracció especials per a aquest anàlit, que s'han obtingut de la bibliografia consultada.

Per tal de desenvolupar aquestes tècniques d'extracció, s'ha utilitzat el següent material:

- Patró comercial d'etilglucurònid de 1000 ppm en 1 mL de metanol, de marca Cerilliant.
- Mostres d'orines de voluntaris de l'equip investigador dopada amb patró d'etilglucurònid per obtenir una concentració de 2000 ng/mL (60 µL del patró comercial d'EtG en 29.940 mL d'orina)
- Tub comercial Toxil-lab® Toxi-Tubes® A Extraction Tubes de marca Varian.
- Tub comercial Toxil-lab® Toxi-Tubes® B Extraction Tubes de marca Varian.
- Columna d'extracció: Cartutxos – Spe-ed SPE Cartridges Scan THC 100mg/3mL. Referència #2613
- Dissolvents: metanol, acetonitril, diclorometà, isopropanol i aigua de qualitat HPLC, de marca Chem-Lab.
- Reactius: àcid clorhídric 37%, àcid acètic glacial, àcid fòrmic i amoníac 25%, de marca Romil, i dihidrogen fosfat de potassi, de marca Chem-lab.
- Instrumentació: Vacumm Manifolds Solid Phase Extraction Varian, orbital giratori, pipetes automàtiques, centrífuga i vòrtex.

Per tal de comprovar l'eficiència de les extraccions provades, el producte resultant d'aquestes s'ha analitzat mitjançant l'autoanalitzador d'immunoassaig, que és la tècnica que actualment està validada al SLF. Addicionalment, 5 mostres d'orina de casos reals, que van ser objecte d'anàlisi previ d'etilglucurònid al SLF, van ser utilitzades per valorar la fiabilitat de l'extracció.

S'ha utilitzat el material següent:

- Reactiu: DRI Ethyl Glucuronide Assay® de Thermo Scientific, per a mostres d'orina humana. Referència: 10015626.
- Aparell: autoanalitzador d'immunoassaig Indiko Plus® de ThermoFisher Scientific.

Els valors considerats per a aquesta tècnica van ser:

- *Cut-off* (valor a partir del qual el resultat es considera positiu al SLF): 500 ng/mL.
- Límit de quantificació superior (valor màxim que es pot mesurar per aquesta tècnica): 2000 ng/mL.
- Límit de quantificació inferior (valor mínim que es pot mesurar per aquesta tècnica): 0 ng/mL.

Les extraccions han estat:

Extracció 1 (Hernandez-Domínguez D *et al*, 2011)

- Preparació de la mostra : 2 mL d'orina en 100 µL tampó NH₄/NH₃ pH 9.2.
- Tipus d'extracció: SPE

- Procediment:

1. Acondicionament amb 2 mL de metanol i, seguidament, 2 mL d'aigua.
2. Addició de la mostra.
3. Neteja amb 2 mL d'aigua.
4. Elució amb 2 mL de metanol.

Extracció 2 (López Matayoshi CY, 2015)

- Preparació mostra: 200 µL d'orina en 1800 µL d'acetonitril.

- Tipus d'extracció: SPE

- Procediment:

1. Acondicionament amb 3 mL de metanol, 3 mL d'aigua i 3 mL d'acetonitril, seqüencialment.
2. Addició de la mostra.
3. Neteja amb 3 mL d'acetonitril i, seguidament, 3 mL de metanol .
4. Elució amb 3 mL d'àcid clorhídric 2% en acetonitril.

Extracció 3 (Côte L, 2014)

- Preparació mostra: 50 µL d'orina en 450 µL tampó 0.5% d'àcid fòrmic en aigua.

- Tipus d'extracció: SPE

- Procediment:

1. Acondicionament amb 2 mL de metanol i seguidament 2 mL d'aigua.
2. Addició de la mostra.
3. Neteja amb 1 mL d'acetonitril.
4. Elució amb 2 mL d'àcid fòrmic 5% en metanol i, seguidament 2mL d'àcid clorhídric 2% en acetonitril.

Extracció 4 (Paul R *et al*, 2011)

- Preparació mostra: 500 µL d'orina.
- Tipus d'extracció: SPE
- Procediment:
 1. Acondicionament amb 1 mL de metanol i, seguidament, 1 mL d'aigua.
 2. Addició de la mostra.
 3. Neteja amb 1 mL d'amoniac 5% en aigua, 1 mL d'aigua i 1 mL de metanol, seqüencialment.
 4. Elució amb 1 mL d'àcid acètic 5% en metanol.

Extracció 5

- Preparació mostra: 2 mL d'orina en 4 mL tampó fosfat (PO_4^-) 0.1 M pH 6.1.
- Tipus d'extracció: SPE
- Procediment:
 1. Acondicionament amb 2 mL de metanol i, seguidament, 2 mL de tampó fosfat 0.1M.
 2. Addició de la mostra.
 3. Neteja amb 3 mL d'aigua i 3 mL d'àcid acètic 1M.
 4. Elució amb 3mL d'una barreja de diclorometà /hidròxid d'amoni/isopropanol (4mL/20µL/1mL).

Extracció 6

- Preparació mostra: 2 mL d'orina en 4 mL tampó fosfat (PO_4^-) 0.1 M pH 6.1.
- Tipus d'extracció: SPE
- Procediment:
 1. Acondicionament amb 2 mL de metanol i, seguidament, 2 mL de tampó fosfat 0.1M.
 2. Addició de la mostra.
 3. Neteja amb 3 mL d'aigua i 3 mL d'àcid acètic 1M.
 4. Elució amb 1.5 mL de metanol.

Extracció 7

- Preparació mostra: 2 mL d'orina en 2 mL tampó fosfat (PO_4^-) 0.1 M pH 6.1.
- Tipus d'extracció: L-L (àcida comercial- Toxil-lab® Toxi-Tubes® A)
- Procediment:
 1. Addició de la mostra d'orina i tampó fosfat en un tub (fase aquosa).
 2. Addició del dissolvent del tub comercial (fase orgànica).
 3. Barreja de les dues fases i centrifugació a 14000rpm 10 min, per separar-les.
 4. Separació fase orgànica i evaporació a temperatura ambient.

Extracció 8

- Preparació mostra: 2 mL d'orina en 2 mL tampó fosfat (PO_4^-) 0.1 M pH 6.1
- Tipus d'extracció: L-L (bàsica comercial- Toxil-lab® Toxi-Tubes® B)
- Procediment:
 1. Addició de la mostra d'orina i tampó fosfat en un tub (fase aquosa).
 2. Addició del dissolvent del tub comercial (fase orgànica).
 3. Barreja de les dues fases i centrifugació a 14000 rpm 10 min, per separar-les.
 4. Separació fase orgànica i evaporació a temperatura ambient.

Extracció 9

- Preparació mostra: 100 μL d'orina
- Tipus d'extracció: L-L
- Procediment:
 1. Addició de la mostra d'orina en un tub (fase aquosa).
 2. Addició de 200 μL d'acetonitril (fase orgànica).
 3. Barreja de les dues fases i centrifugació a 14000 rpm 10 min per separar-les.
 4. Separació agafant 150 μL de la fase orgànica i deixar evaporar a temperatura ambient.

Comprovació de tècniques analítiques confirmatòries per a patrons d'EtG amb equips cromatogràfics del SLF

S'han realitzat 23 proves amb els aparells del SLF.

El material i aparells utilitzats van ser:

Substàncies i reactius

- Patró comercial d'etilglucurònid de 1000ppm en 1 mL de metanol, de marca Cerilliant.
- Dissolvents metanol i aigua de qualitat HPLC, de marca Chem-Lab.
- Derivatitzant *N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide* amb *trimethylchlorosilane* (BSFTA), de marca Sigma-Aldrich.
- Clorur de sodi, sòlid, de marca J.T. Baker.
- Glucuronidasa Abalonase™ de marca UCT, amb activitat >50.000 unitats/mL.
- Patró comercial de tertbutilalcohol del 98%, de marca TRC (Toronto Research Chemicals INC).

Patrons

S'han preparat 11 patrons d'EtG de diferents concentracions fent dilucions a partir del patró comercial de 1000ppm en metanol i derivatitzant amb BSFTA (TMS) per formar els derivats trimetilsilats.

Patró	Concentració en vial (ppm)	Derivatitzat	Dissolvent	Preparació
P1	50	NO	Metanol	Dilució 1/20 del patró comercial: s'afegeixen 50 µL del patró comercial d'EtG de 1000 ppm a 950 µL de metanol
P2	200	NO	Metanol	Dilució 1/5 del patró comercial: s'afegeixen 100 µL del patró comercial d'EtG de 1000 ppm a 400 µL de metanol
P3	100	SI	BSFTA (TMS)	Del patró P2, es prenen 25 µL i es deixen assecar a l'aire. Després s'hi afegeix 50 µL de BSFTA i es derivatitza ¹
P4	200	SI	BSFTA (TMS)	Del patró P2, es prenen 50 µL i es deixen assecar a l'aire. Després s'hi afegeix 50 µL de BSFTA i es derivatitza ²
P5	50	SI	BSFTA (TMS)	Del patró P1, es prenen 50 µL i es deixen assecar a l'aire. Després s'hi afegeix 50 µL de BSFTA i es derivatitza ²
P6	10	SI	BSFTA (TMS)	Dilució 1/5 del patró P5: es prenen 20µL del patró P5 i s'hi afegeix 80 µL de BSFTA.
P7	1	SI	BSFTA (TMS)	Dilució 1/10 del patró P6: es prenen 20µL del patró P6 i s'hi afegeix 180 µL de BSFTA.
P8	10	NO	Metanol	Dilució 1/5 del patró P1: es prenen 20µL del patró P1 i s'hi afegeix 80 µL de metanol.
P9	1,3	SI	BSFTA (TMS)	Vial provinent del resultat de la Prova d'extracció 1, amb orina dopada amb el patró P1.
P10	2,6	SI	BSFTA (TMS)	Vial provinent del resultat de la Prova d'extracció 1, amb orina dopada amb el patró P3.
P11	2,0	SI	BSFTA (TMS)	Vial provinent del resultat de la Prova d'extracció 7, amb orina dopada.

Taula 4: Resum de les dilucions usades per a la preparació de patrons

¹ Condicions de derivatització: bany sec de 70°C durant almenys 20 min.

Instrumentació

Per a l'anàlisi instrumental, s'han provat diferents mètodes en dos equips de cromatografia diferents: cromatografia de gasos amb espectrometria de masses (GC-MS), i cromatografia de gasos amb injecció d'espai de cap (*headspace*) i espectrometria de masses (HS-GC-MS).

En el cas de la GC-MS, s'han utilitzat dos equips amb dues columnes de diferent polaritat. Un d'aquests és el mateix equip que s'ha utilitzat per a la HS-GC-MS, amb el sistema d'injecció de *headspace* desactivat.

Les característiques dels equips són les següents:

Equip	GC-MS¹	GC-MS²	HS-GC-MS
Tipus	Cromatografia de gasos amb espectrometria de masses	Cromatografia de gasos amb espectrometria de masses	Cromatografia de gasos amb injecció d'espai de cap i espectrometria de masses
Marca	Varian/Bruker	Varian/Bruker	
Model bombes	-----	-----	
Model sistema injecció	Bruker Pal Autosampler (CombiPal)	Varian Pal Autosampler (CombiPal)	Varian Pal Autosampler (CombiPal) amb mòdul <i>headspace</i> .
Model cromatògraf	Varian 450-GC Gas Chromatograph	Bruker 450-GC Gas Chromatograph	
Model detector	Varian 240-MS IT Mass Spectrometer	Bruker 320-MS TQ Mass Spectrometer (300MS)	
Columna cromatogràfica	Agilent VF-5ms 30x0,25x0,25 CP8944 Tipus: Fase reversa, baixa polaritat	MetaBLOOD 1 30x32x1,8 Tipus: Fase reversa, polaritat mitja	

Taula 5: Característiques del equips cromatogràfics utilitzats

Condicions cromatogràfiques

S'han provat diferents mètodes d'anàlisi en els diferents equips. 23 proves amb 9 mètodes cromatogràfics:

- amb patrons preparats del patró comercial (dilucions i formació de derivats trimetilsilats-TMS)
- amb mostres d'orines dopades amb post-extracció.

Es descriuen els mètodes a la taula 6:

Equip:	GC-MS ¹			
Nom del mètode:	M1	M2 (Hernández D, 2011)	M3	M4
Mode d'injecció	Directe	Directe	Directe	Directe
Temperatura injector	270°C	250°C	250°C	280°C
Flux de columna	Constant de 1,0 mL/min	Constant de 1,0 mL/min	Constant de 1,0 mL/min	Constant de 1,0 mL/min
Split	Splitless	Splitless	Splitless	Splitless
Temperatures del forn	Isoterma de 60°C durant 1 min Rampa de 12°C/min fins a 300°C Isoterma de 300°C durant 9 min	Isoterma de 60°C durant 2 min Rampa de 10°C/min fins a 200°C Rampa de 15°C/min fins a 250°C Isoterma de 250°C durant 20 min	Isoterma de 60°C durant 2 min Rampa de 15°C/min fins a 200°C Isoterma de 200°C durant 9 min Rampa de 20°C/min fins a 300°C Isoterma de 300°C durant 9 min	Isoterma de 50°C durant 2 min Rampa de 20°C/min fins a 120°C Rampa de 75°C/min fins a 300°C Rampa de 50°C/min fins a 320°C
Durada del mètode	30,00 min	48,33 min	34,33 min	34,33 min
Temperatura del detector	200°C	200°C	200°C	280°C
Segments del MS	2	2	2	1
Segment 1	De 0:00 a 4:50 min Ionització: off	De 0:00 a 4:50 min Ionització: off	De 0:00 a 5:00 min Ionització: off	De 0:00 a 8:30 min <i>Full scan</i> de rang de masses de 40 a 550
Segment 2	De 4:50 a 30:00 min <i>Full scan</i> de rang de masses de 40 a 550	De 4:50 a 48:00 min <i>Full scan</i> de rang de masses de 40 a 550	De 5:00 a 34:00 min <i>Full scan</i> de rang de masses de 40 a 550	-----
Tipus d'ionització del MS	EI	EI	EI	EI

Equip:	GC-MS ¹			
Nom del mètode:	M1	M2 (Hernández D, 2011)	M3	M4
Proves realitzades	Prova 1: Patró P5, s'injecta 1 µL. Prova 2: Patró P3, s'injecta 1 µL. Prova 3: Patró P4, s'injecta 1 µL. Prova 4: Patró P6, s'injecta 1 µL. Prova 5: Patró P7, s'injecta 1 µL. Prova 6: Patró P4, s'injecta dues vegades amb 1 i 2 µL, el mateix dia. Prova 7: Patró P1, s'injecta 1 µL. Prova 8: Patró P8, s'injecta 1 µL. Prova 9: Patró P9, s'injecta 1 µL. Prova 10: Patró P10, s'injecta 1 µL. Prova 11: Patró P11, s'injecta 1 µL.	Prova 12: Patró P5, s'injecta 2 µL. Prova 13: Patró P3, s'injecta 2 µL.	Prova 14: Patró P5, s'injecta 1 µL. Prova 15: Patró P3, s'injecta 1 µL.	Prova 16: Patró P5, s'injecta 1 µL. Prova 17: Patró P3, s'injecta 1 µL.

Equip:	GC-MS²	
Nom del mètode:	M5	M6
Mode d'injecció	Manual	Manual
Temperatura injector	200°C	200°C
Flux de columna	Constant de 1,5 mL/min	Constant de 1,5 mL/min
Split	<i>Splitless</i>	<i>Splitless</i>
Temperatures del forn	Isoterma de 36°C durant 1 min Rampa de 10°C/min fins a 220°C Isoterma de 220°C durant 1 min	Isoterma de 50°C durant 2,5 min Rampa de 10°C/min fins a 220°C Isoterma de 220°C durant 1 min
Durada del mètode	20,40 min	20,50 min
Temperatura del detector	50°C	50°C
Segments del MS	1	1
Delay	De 0:00 a 1:50 min Ionització: off	De 0:00 a 2:50 min Ionització: off
Segment 1	De 1:50 a 20:40 min <i>Full scan</i> de rang de masses de 29 a 350	De 2:50 a 20:50 min <i>Full scan</i> de rang de masses de 29 a 350
Tipus d'ionització del MS	EI	EI
Proves realitzades	Prova 18: Patró P1, s'injecta 2 µL.	Prova 19: Patró P1, s'injecta 2 µL. Prova 20: Patró P2, s'injecta 2 µL dues vegades i 5 µL una vegada.

Equip:	HS-GC-MS		
Nom del mètode:	M7	M8	M9
Mode d'injecció	<i>Headspace</i>	<i>Headspace</i>	<i>Headspace</i>
Volum del vial	10 mL	10 mL	10 mL
Volum d'injecció	1 mL	1 mL	1 mL
Temperatura de xeringa	80°C	80°C	70°C
Temperatura en vial <i>headspace</i>	80°C	80°C	70°C
Temps d'incubació <i>headspace</i>	10 min	10 min	20 min
Velocitat d'agitació <i>headspace</i>	500 rpm	500 rpm	500 rpm
Temperatura injector	200 °C	200 °C	200 °C
Flux de columna	Constant de 1,5 mL/min	Constant de 1,5 mL/min	Constant de 1,5 mL/min
<i>Split</i>	10	10	10
Temperatures del forn	Isoterma de 36°C durant 7 min Rampa de 10°C/min fins a 135°C	Isoterma de 36°C durant 5 min Rampa de 10°C/min fins a 210°C Isoterma de 210°C durant 1 min	Isoterma de 36°C durant 7 min Rampa de 10°C/min fins a 135°C
Durada del mètode	16,90 min	23,40 min	16,90 min
Temperatura del detector	50°C	50°C	50°C
Segments del MS	1	1	1
<i>Delay</i>	De 0:00 a 1:40 min Ionització: off	De 0:00 a 2:50 min Ionització: off	De 0:00 a 1:40 min Ionització: off
Segment 1	De 1:40 a 16:90 min <i>Full scan</i> de rang de masses de 29 a 350	De 2:50 a 23:40 min <i>Full scan</i> de rang de masses de 29 a 350	De 1:40 a 16:90 min <i>Full scan</i> de rang de masses de 29 a 350
Tipus d'ionització del MS	EI	EI	EI

Equip:	HS-GC-MS		
Nom del mètode:	M7	M8	M9
Proves realitzades	<p>Prova 21: Es prepara el vial de <i>headspace</i> amb 125 µL de patró P2 (200 ppm en metanol), 250 µL de patró intern (tertbutilalcohol), 0,5 g de clorur de sodi i 4625 µL d'aigua.</p>	<p>Prova 22: Es prepara el vial de <i>headspace</i> amb 25 µL de patró comercial de 1000 ppm en metanol, 250 µL de patró intern (tertbutilalcohol), 0,5 g de clorur de sodi i 4800 µL d'aigua.</p>	<p>Prova 23 Es preparen 3 vials de <i>headspace</i> de 10 mL amb:</p> <p>A-.250 µL de tertbutilalcohol (com a patró intern), 500 µL de β-glucuronidasa i 4250 µL d'aigua.</p> <p>B-. 250 µL de tertbutilalcohol (com a patró intern), 500 µL d'orina blanca dopada amb EtG (2 ppm) i 4250 µL d'aigua.</p> <p>C-. 250 µL de tertbutilalcohol (com a patró intern), 500 µL d'orina blanca dopada amb EtG (2 ppm), 500 µL de β-glucuronidasa i 3750 µL d'aigua.</p>

Taula 6: Descripció de les diferents proves i mètodes realitzats

Es realitzen 20 proves amb 6 mètodes (M) amb els equips de GC-MS (taula 5) on s'analitzen els diversos patrons preparats de la taula 4:

- 17 proves amb 4 mètodes amb l'equip GC-MS¹: M1, M2, M3 i M4 (taula 6)
- 3 proves amb 2 mètodes amb l'equip GC-MS²: M5 i M6 (taula 6).

S'han fet 3 proves amb l'equip HS-GC-MS (taula 5), amb 3 mètodes: M7, M8 i M9 (taula 6). Per a l'anàlisi, la preparació de la mostra s'ha realitzat afegint directament al vial de *headspace* un volum concret de mostra i aigua. S'ha afegit depenent del mètode:

- En els mètodes M7 i M8, NaCl per augmentar la polaritat de la fase aquosa del vial de *headspace* i millorar la volatilitat de l'EtG. Això fa augmentar la sensibilitat del mètode.
- En el mètode M9, l'enzim β -glucuronidasa. Es tracta d'un mètode indirecte per determinar l'EtG amb la mesura d'etanol obtingut com a producte de l'hidròlisi enzimàtica.

Comprovació de l'estabilitat de l'EtG en el temps.

Per tal de realitzar aquesta determinació s'ha utilitzat:

- Reactiu: DRI Ethyl Glucuronide Assay® de Thermo Scientific, per a mostres d'orina humana. Referència: 10015626
- Aparell: autoanalitzador d'immunoassaig Indiko Plus® de ThermoFisher Scientific

Mostra utilitzada: 41 mostres d'orina de diferents característiques, les quals van ser objecte d'anàlisi d'etilglucurònid al SLF del IMLCFC i que estaven conservades a -20°C (mètode de conservació habitual al SLF) durant diferents períodes de temps.

S'ha reproduït el mateix procediment d'anàlisi inicial i s'han comparat els resultats



Imatge 19: Autoanalitzador d'immunoassaig Indiko Plus® de ThermoFisher Scientific del SLF

Estudi estadístic comparatiu dels dos grups de resultats (abans i després de temps de congelació) mitjançant comparativa de mitjanes amb IBM SPSS Statistics Base 22.0.

Aspectes ètics:

En tot moment, i especialment en el tractament de les dades recopilades, s'ha tingut en compte l'anonimitat de les dades, d'acord amb el redactat a la *Ley Orgànica 3/2018 sobre protección de datos personales y garantía de los derechos digitales*.

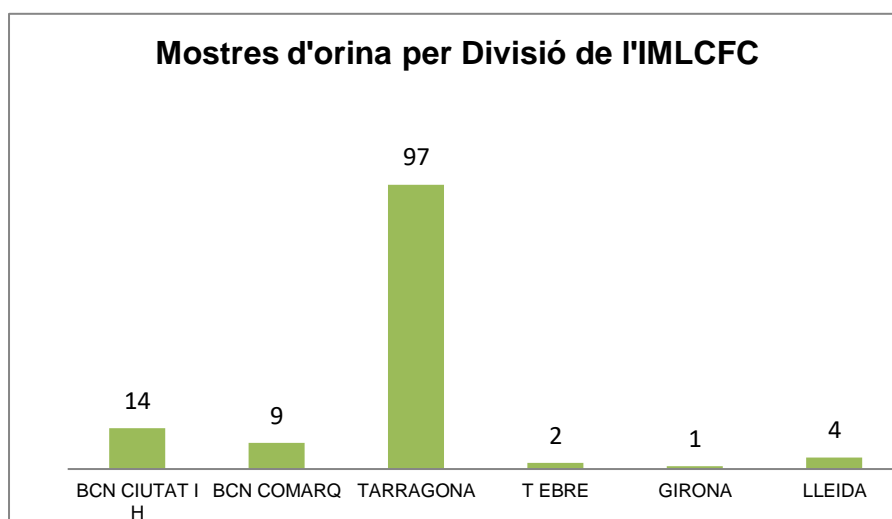
Resultats

Part 1

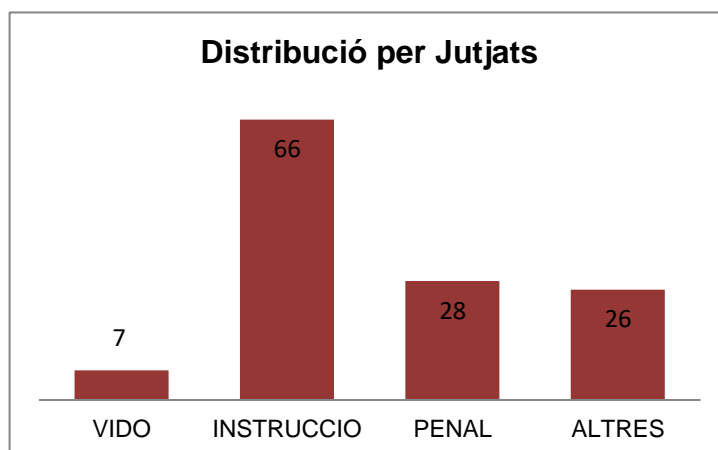
Es van analitzar les 2911 pericials de valoració de toxicomania (actuacions de "Toxicomania/drogues del programari EJCat) de l'any 2019. Un 6% dels casos corresponien a valoracions en detinguts. Del total, 127 corresponien a actuacions en què s'havia pres una mostra d'orina per a estudi toxicològic. En 2 es va remetre també mostra de sang, i mostra de cabells en 19.

Quant a la distribució territorial de les orines, principalment es van rebre al SLF mostres d'orina de la divisió de Tarragona (n=97) seguida de la divisió de Barcelona Ciutat i L'Hospitalet de Llobregat (n=14) (Gràfic 2). La major part de les mostres es van remetre del partit judicial de Tarragona (n=77), seguit de Reus, El Vendrell i Barcelona, amb n=9 en tots els casos.

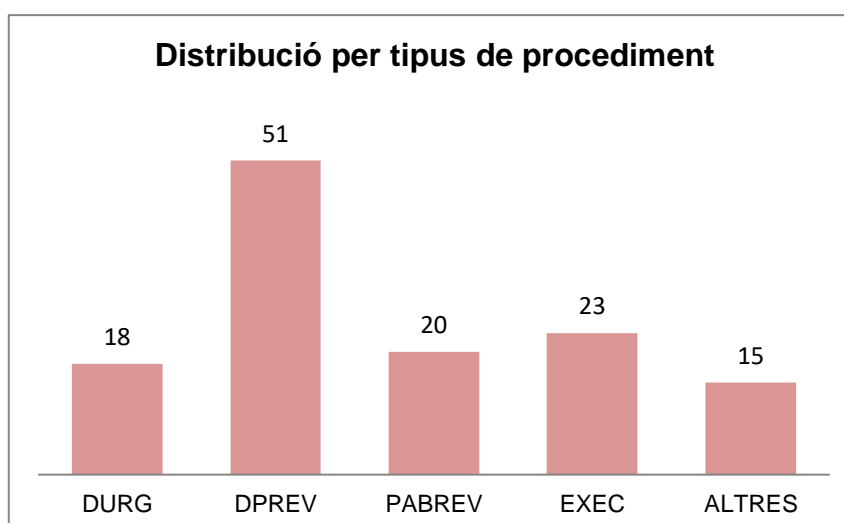
D'acord a les variables judicials estudiades, les mostres per a anàlisi toxicològic s'ha fet majoritàriament en procediments de jutjats d'instrucció (o primera instància i instrucció en el seu cas), amb un total de 66 pericials en què la mostra d'orina s'ha considerat com a complementaria a l'exploració medicoforense (Gràfic 3). Respecte als tipus de procediments, han predominat les diligències prèvies (n=51) (Gràfic 4).



Gràfic 2: Distribució de les mostres rebudes per divisió de l'IMLCFC



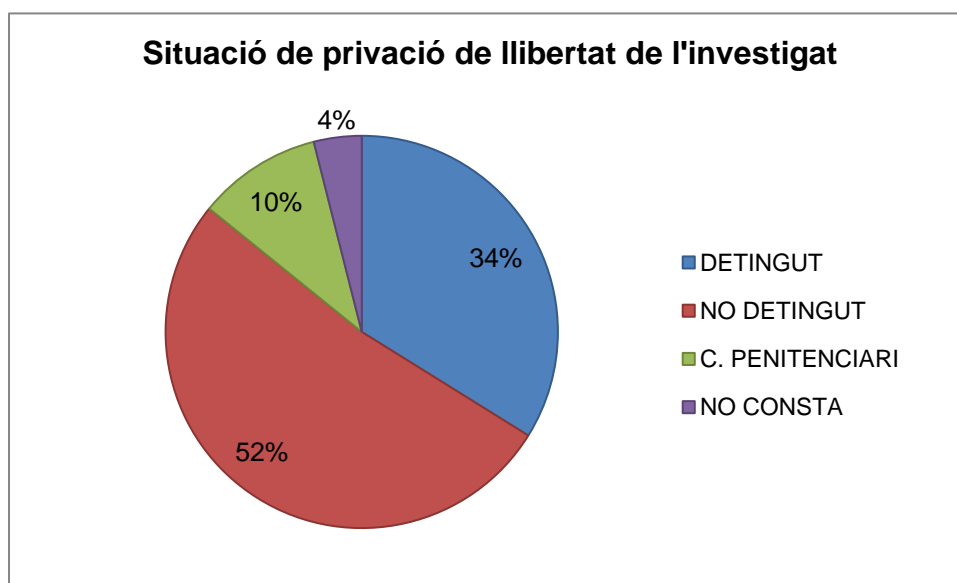
Gràfic 3: Distribució de les mostres rebudes per tipus de jutjat



Gràfic 4: Distribució de les mostres rebudes per tipus de procediment judicial

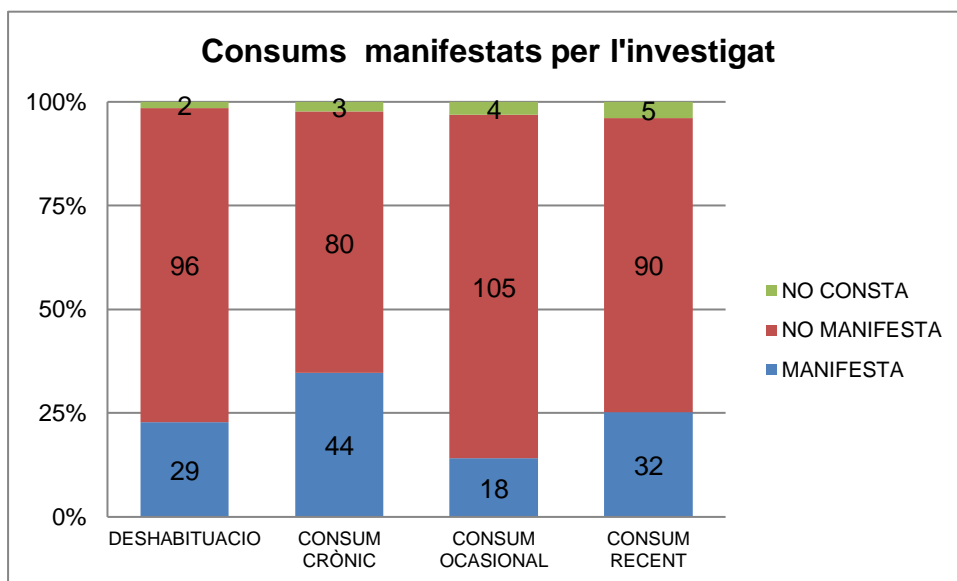
Les mostres es van obtenir, principalment, sol·licitades al tribunal per part del metge forense que va realitzar la valoració de l'investigat (n=90). En la resta, es fa constar que s'obtenen "per ordre judicial", sense haver-se pogut esbrinar si han estat sol·licitades directament pels tribunals o acordades a petició de la defensa.

En relació a les característiques epidemiològiques dels investigats, el 93,70% (n=119) de les mostres d'orina es van rebre d'homes. L'edat mitjana era de 35,8 anys [min: 18; màx: 59]. Les valoracions de les toxicomanies es va fer en 43 detinguts, mentre que la major part (n=66) eren investigats sense privació de llibertat. En 13 casos es tractava de persones ingressades en centres penitenciaris (Gràfic 5).

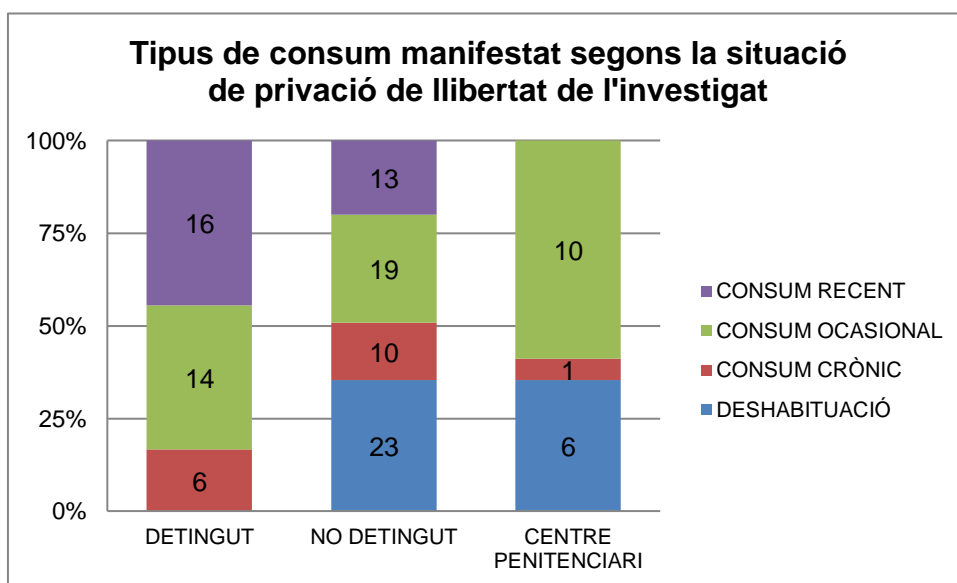


Gràfic 5: Distribució de la situació de privació de llibertat de l'investigat

Pel que fa al tipus de consum manifestat, la major part dels subjectes entrevistats van explicar un consum crònic (55,88%) i/o recent (40,64%). Els resultats es mostren en el Gràfic 6 i 7.



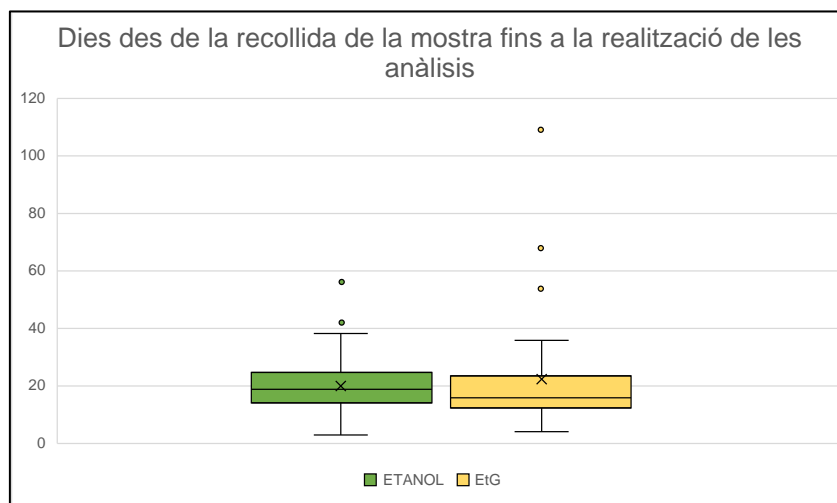
Gràfic 6: Tipus de consums manifestats per l'investigat



Gràfic 7: Distribució de les mostres rebudes per tipus de procediment judicial

Respecte als resultats toxicològics, dels 127 casos que es van rebre, 20 es van remetre a laboratoris externs per sol·licitud expressa del metge forense o el jutjat responsable del procediment; per aquest motiu van quedar 107 casos per a l'anàlisi de l'etanol i l'EtG al SLF. Per a la investigació de l'etanol les mostres es van processar en un temps promig de 20'19 dies [min: 3; max: 56] des de la recollida, i per a l'estudi del EtG, aquest temps promig va ser de

22'19 dies [min: 4; max: 109] (Gràfic 8). La distribució de resultats positius a etanol i EtG es mostra a la Taula 7.



Gràfic 8: Distribució dels dies des de la recollida de la mostra fins a la realització de les anàlisis

Determinació d'etanol i etilglucurònid (n=107*)											
Detinguts (n=32)				No detinguts (n=60)				Centre Penitenciari (n=10)			
Etanol		EtG		Etanol		EtG		Etanol		EtG	
Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg
0	32	9	23	2	58	9	51	0	10	1	9

Taula 7: Resultats de determinació d'etanol i etilglucurònid. Un 28% dels casos de detinguts amb etanol negatiu van resultar positius a etilglucurònid. *En cinc casos no constava si la mostra d'orina procedia de detingut, de no detingut o d'intern en centre penitenciari.

A la submostra de detinguts, un 50% van manifestar un consum recent, i en aquests es va valorar el temps que va transcórrer des de la detenció fins a la valoració medicoforensa, i la relació entre els resultats de les anàlisis d'etanol i EtG. Totes les mostres van ser negatives per a l'etanol, i 7 van resultar positives per a l'EtG (Taula 8).

Resultats d'etanol i EtG en detinguts amb consum recent d'etanol manifestat (n=16)			
Hores des de la detenció	N (%)	Etanol Positiu	EtG Positiu
24	6 (37,5)	0	5
36	1 (6,25)	0	0
48	3 (18,75)	0	1
72	6 (37,5)	0	1

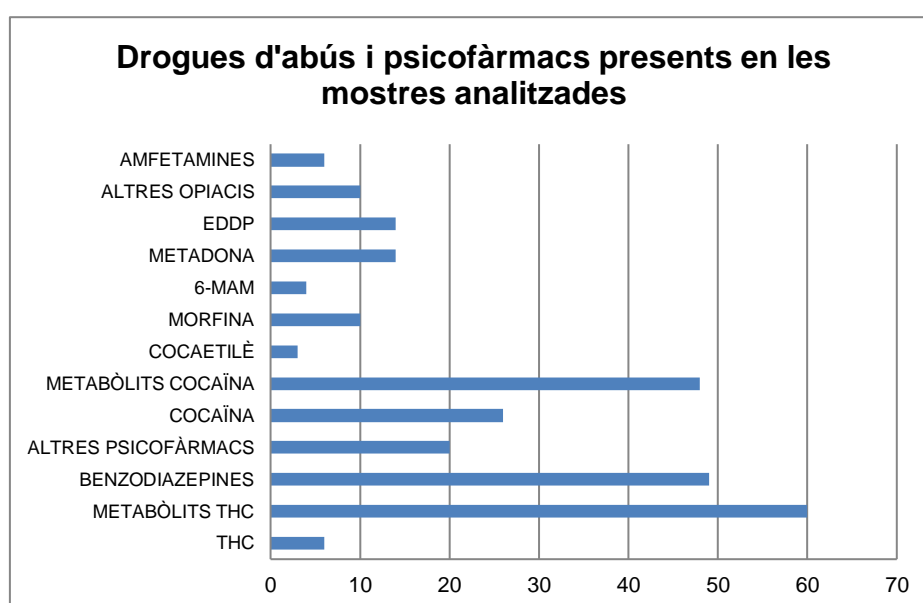
Taula 8: Resultats d'etanol i EtG en detinguts amb consum recent d'etanol manifestat. En el 44% dels casos que els detinguts manifestaven aquest consum, el resulta va ser positiu per a etilglucurònid.

La Taula 9 mostra els resultats en els no detinguts i els interns en centre penitenciari.

Resultats d'etanol i EtG en no detinguts i interns en centre penitenciari amb consum recent d'etanol manifestat			
	N	Etanol Positiu	EtG Positiu
No detinguts	13	1	2
Interns en centre penitenciari	0	0	0

Taula 9: Resultats d'etanol i EtG en no detinguts i interns en centre penitenciari amb consum recent d'etanol manifestat

Altres drogues o substàncies psicoactives es van trobar a les mostres analitzades, principalment metabòlits del THC (n=60), benzodiazepines (n=49) i metabòlits de la cocaïna (n=48) (Gràfic 9).



Gràfic 9: Resultats de drogues d'abús i psicofàrmacs a les mostres analitzades

Part 2

Cerca bibliogràfica

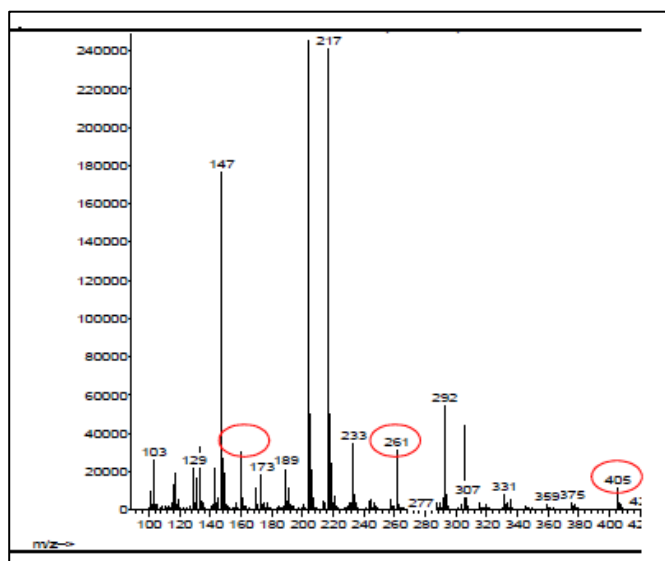
De la recerca bibliogràfica, s'han obtingut un total de 40 articles i altres documents científics, que s'han valorat.

Característiques moleculars de l'EtG

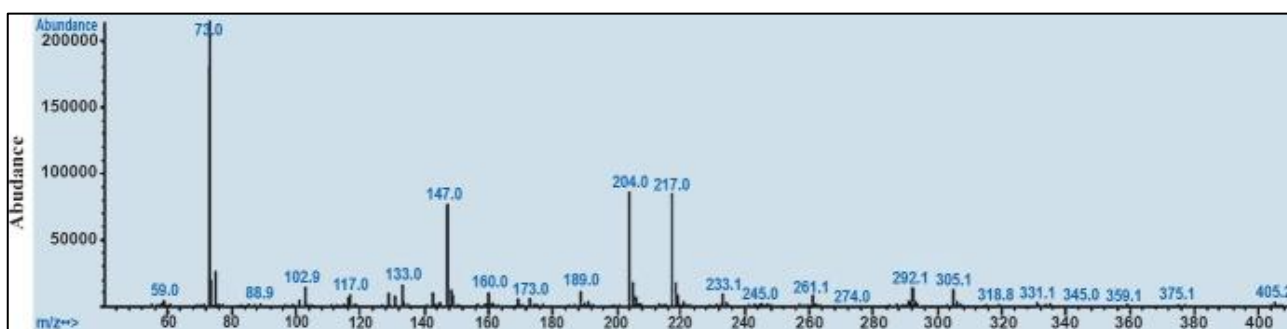
Les principals característiques d'interès analític de la molècula de l'EtG són:

- Es tracta d'una molècula amb estructura d'àcid i per tant és una molècula polar, és a dir, té més afinitat per les superfícies polars de caràcter hidrofílic. Aquesta propietat afavoreix la seva capacitat de retenció en una columna cromatogràfica més polar i per tant la seva detectabilitat.
- És derivatitzable amb BSFTA, cosa que millora la seva detectabilitat en els equips d'anàlisi de CG.
- El seu pes molecular és 222.19 g/mol, per tant és gran i amb un pes considerable respecte de l'etanol (pes molecular 46.07 g/mol).
- Temperatura de descomposició: 150°C. A una temperatura superior podria ser inestable i no detectar-se.

S'ha obtingut l'espectre de masses de l'EtG-TMS de dos articles de la bibliografia (Imatge 20 i 21).



Imatge 20: Espectre de masses de l'EtG-TMS (Hernández-Domínguez D, 2011)



Imatge 21: Espectre de masses de l'EtG-TMS (Sharma, P, Bharat, V, Murthy, P, 2015)

Els fragments ionitzats a tenir en compte per detectar l'EtG-TMS han estat: 217, 147, 160, 204, 261, 405, 292 i 510 ó 511 (fragment-ió molecular). Per identificar l'EtG sense derivatitzar s'ha utilitzat el fragment molecular: 222.

Tècniques d'extracció de l'EtG

Els resultats de les extraccions d'orines dopades amb patró comercial es mostren a la taula 10:

	EtG (ng/ml)
Extracció 1	197
Extracció 2	0
Extracció 3	0
Extracció 4	220
Extracció 5	62
Extracció 6	53
Extracció 7	21
Extracció 8	31
Extracció 9	480

Taula 10: Resultats del valor d'EtG obtinguts per l'autoanalitzador Indiko Plus® dels diferents tipus d'extraccions realitzades amb orina dopada.

L'extracció més eficient, que va obtenir una major concentració d'EtG en el producte resultant de l'extracció (480 ng/mL), va ser la número 9. La resta d'extraccions no han ofert tan bon resultat, tot i que s'ha extret una certa quantitat de l'anàlit.

En analitzar 5 mostres d'orina reals amb valor d'EtG conegut amb aquest mètode d'extracció (9) es van obtenir els següents resultats pre i post-extracció (taula 11).

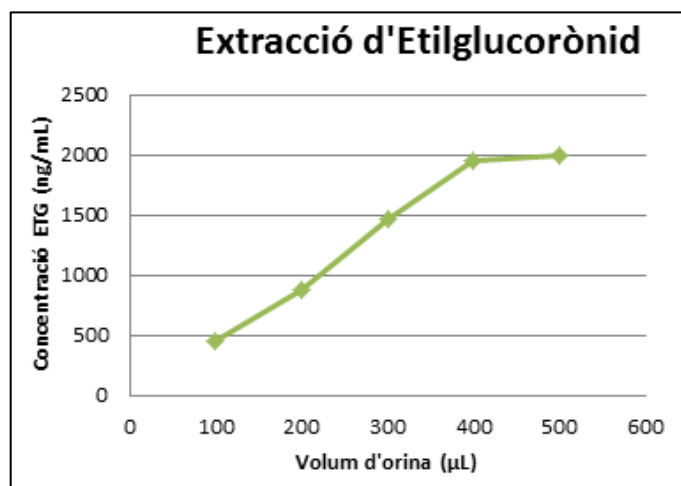
MOSTRES	ETG PRE-EXTRACCIÓ (ng/mL)	ETG POST-EXTRACCIÓ (ng/mL)
Mostra A	POSITIU (>2000)	NEGATIU (460)
Mostra B	POSITIU (>2000)	POSITIU (641)
Mostra C	POSITIU (>2000)	NEGATIU (481)
Mostra D	POSITIU (>2000)	POSITIU (>2000)
Mostra E	POSITIU (>2000)	POSITIU (>2000)

Taula 11: Comparativa de resultats positius i negatius respecte al *cut-off* (500 ng/mL) d'EtG establert en orines reals analitzades per l'autoanalitzador d'immunoassaig Indiko Plus® pre i post-extracció.

Dels diferents volums d'una mateixa mostra (mostra A), provats amb aquesta extracció (9), es va obtenir un resultat positiu per a l'EtG (>500 ng/mL) a partir de 200 µL de mostra. Els resultats es mostren a la taula 12:

Extracció 9 - Mostra A					
Volum (µL)	100	200	300	400	500
EtG (ng/mL)	NEGATIU (460)	POSITIU (875)	POSITIU (1470)	POSITIU (951)	POSITIU (2000)

Taula 12: Resultats de l'extracció 9 realitzada amb diferents volums d'una mateixa mostra d'orina (mostra A).



Gràfic 10: Relació volum mostra – concentració d'EtG resultant

S'observa que a més volum de mostra utilitzat, més etilglucurònid s'extreu, fins un màxim de saturació (400-500 ng/mL).

Tècniques analítiques confirmatòries per a patrons d'EtG amb equips cromatogràfics del SLF

A les proves realitzades per al desenvolupament d'un mètode per cromatografia de gasos, no es va veure clarament l'EtG i per tant, no es va determinar ni el temps de retenció ni l'espectre de masses que permetria identificar-lo.

Els resultats de cada una de les proves (taula 6) es resumeix a la taula 13:

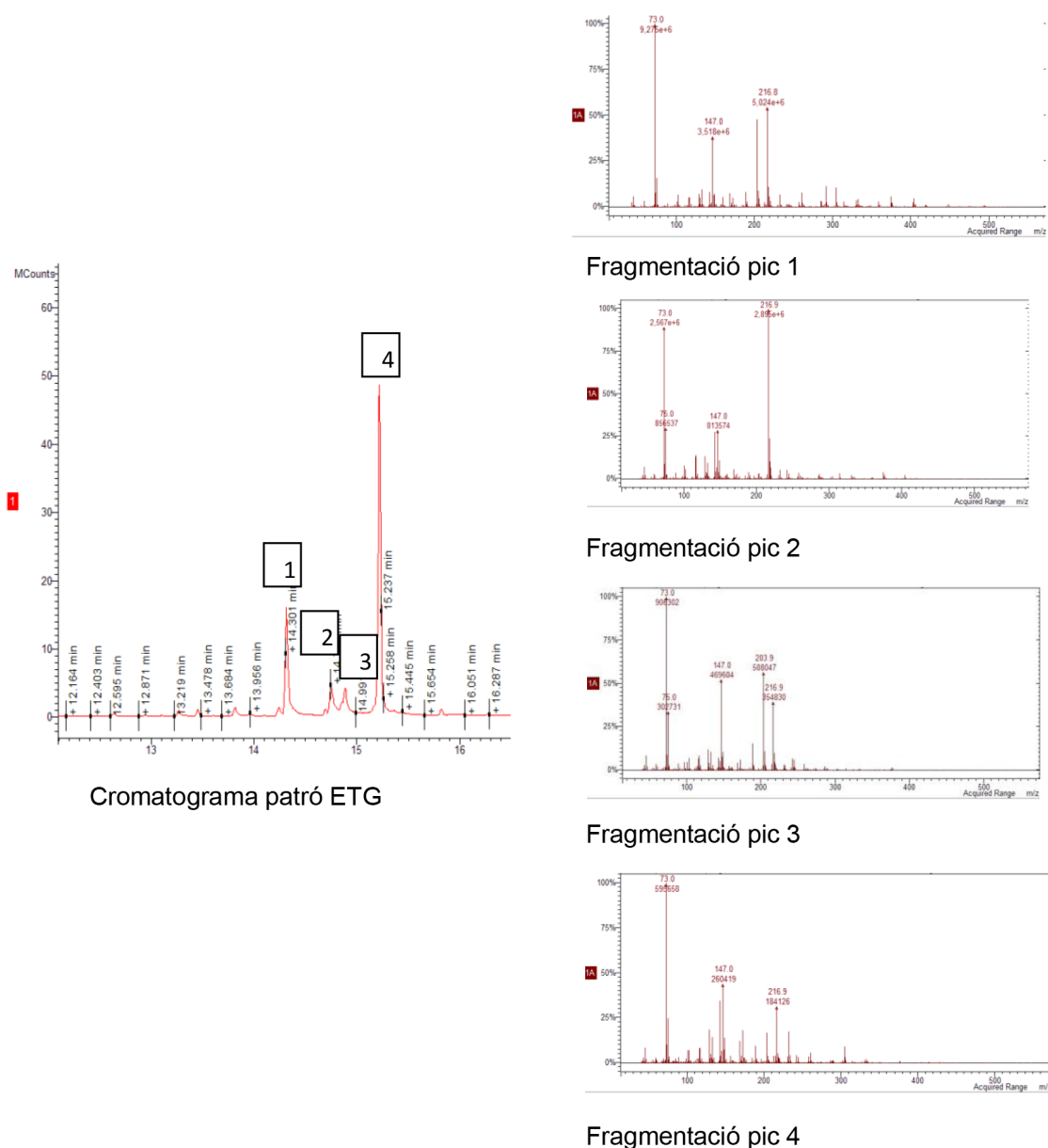
Prova 1	S'han observat 4 pics en el cromatograma que tenen un espectre de masses amb la majoria de fragments de l'EtG-TMS. Cap d'ells es correspon de manera clara, i només un d'ells té el fragment-ió molecular (imatge 22). Aquesta prova s'ha repetit 3 vegades.
Prova 2	S'han observat 4 pics en el cromatograma que tenen un espectre de masses amb la majoria de fragments de l'EtG-TMS. Cap d'ells es correspon de manera clara, i només un d'ells té el fragment-ió molecular. No hi ha cap pic que hagi augmentat el seu senyal de manera diferenciada als altres respecte als de la Prova 1, tot i l'augment de la concentració.
Prova 3	En el cromatograma s'han observat 4 pics que tenen un espectre de masses amb la majoria de fragments de l'EtG-TMS. Cap d'ells es correspon de manera clara, i només un d'ells té el fragment-ió molecular. No hi ha cap pic que hagi augmentat el seu senyal de manera diferenciada als altres respecte als de la Prova 1 i Prova 2, tot i l'augment de la concentració.
Prova 4	En el cromatograma es veu només un pic significatiu que conté tots els fragments en el seu espectre de masses, excepte el molecular, però la intensitat del senyal és baixa i no es pot garantir que es correspongui a l'EtG.

Prova 5	En el cromatograma es veu només un pic significatiu que conté tots els fragments en el seu espectre de masses, excepte el molecular, però la intensitat del senyal és baixa i no es pot garantir que es correspongui a l'EtG.
Prova 6	En tots els casos, en els cromatogrames s'han observat 4 pics que tenen un espectre de masses amb la majoria de fragments de l'EtG-TMS, però no n'hi ha cap que es correspongui de manera clara. Tot i injectar dues vegades el patró, amb 2 volums diferents, no es veu una diferència clara en l'augment de senyal de cap pic concret respecte als altres.
Prova 7	No s'observa cap pic significatiu que pugui ser l'EtG.
Prova 8	No s'observa cap pic significatiu que pugui ser l'EtG.
Prova 9	No s'observa cap pic significatiu que pugui ser l'EtG-TMS, segons els fragments considerats.
Prova 10	No s'observa cap pic significatiu que pugui ser l'EtG-TMS, segons els fragments considerats.
Prova 11	No s'observa cap pic significatiu que pugui ser l'EtG-TMS, segons els fragments considerats.
Prova 12	En el cromatograma s'han observat 4 pics que contenen els fragments característics del EtG-TMS, excepte el molecular. Però no es pot determinar amb els espectres de masses quin és el corresponent a l'EtG de manera inequívoca.
Prova 13	En el cromatograma s'han observat 4 pics que contenen els fragments característics del EtG-TMS, excepte el molecular. Però no es pot determinar amb els espectres de masses quin és el corresponent a l'EtG de manera inequívoca.

Prova 14	En el cromatograma s'han observat 4 pics que contenen els fragments característics del EtG-TMS, excepte un d'ells (292). Però no es pot determinar amb els espectres de masses quin és el corresponent a l'EtG de manera inequívoca.
Prova 15	En el cromatograma s'observen 4 pics que contenen els fragments característics del EtG-TMS, excepte un d'ells (292). Tot i ser de concentració major a la Prova 14, no es veu l'augment d'intensitat d'un sol pic. No es pot determinar amb els espectres de masses quin és el corresponent a l'EtG de manera inequívoca.
Prova 16	No s'observa cap pic significatiu que pugui ser l'EtG-TMS, segons els fragments considerats.
Prova 17	No s'observa cap pic significatiu que pugui ser l'EtG-TMS, segons els fragments considerats.
Prova 18	En el cromatograma s'observa 1 pic significatiu, però no es pot determinar si pertany a l'EtG.
Prova 19	En el cromatograma s'observa 1 pic significatiu, però no es pot determinar si pertany a l'EtG.
Prova 20	En el cromatograma s'observa 1 pic significatiu, però no es pot determinar si pertany a l'EtG.
Prova 21	En el cromatograma s'observa 1 pic significatiu, però no es pot determinar si pertany a l'EtG.
Prova 22	No s'observa cap pic significatiu que pugui ser l'EtG.
Prova 23	En el cromatograma del vial C, on s'hauria de veure etanol, no s'observa cap pic en el temps corresponent.

Taula 13: Resultats de les diferents proves cromatogràfiques

S'ha observat a la bibliografia que els mètodes de confirmació més utilitzats en els últims anys per aquest anàlit són les tècniques de cromatografia líquida (HPLC-MS/MS) (Favaretto D *et al*, 2010; Weinmann W *et al*, 2004; Rocabado, G, de la Fuente, F, Nieto J.P., 2012; Janda I, 2002; Stephanson N, 2002; Hegstad S, 2017a). Aquests mètodes per a l'anàlisi de l'EtG requereixen configurar la ionització de l'espectròmetre de masses en mode negatiu i actualment l'equip disponible al nostre laboratori no es pot configurar en aquestes condicions, ja que ha entrat en obsolescència tècnica durant l'execució d'aquest projecte.



Imatge 22: Cromatograma i espectres de masses de la Prova 1.

Comprovació de l'estabilitat de l'EtG en el temps.

Els resultats de les anàlisis realitzades amb l'autoanalitzador d'immunoassaig Indiko® Plus abans (resultat 1) i després (resultat 2) de diferents temps de congelació a -20°C estan descrits a la taula 14.

L'estudi estadístic de comparativa de mitjanes en confirma l'estabilitat ($p < 0,05$).

Mostra	Resultat 1 (ng/mL)	Resultat 2 (ng/mL)	Diferència valor	% variació	Diferència dies
1	2.000	2.000	0	0,0	778
2	2.000	2.000	0	0,0	778
3	456	1.322	866	189,9	778
4	2.000	2.000	0	0,0	771
5	0	15	15	0,0	726
6	0	8	8	0,0	775
7	943	669	-274	-29,1	743
8	1.030	1.320	290	28,2	715
9	2.000	2.000	0	0,0	714
10	185	148	-37	-20,0	686
11	0	0	0	0,0	709
12	2.000	2.000	0	0,0	686
13	2.000	2.000	0	0,0	669
14	2.000	2.000	0	0,0	669
15	700	708	8	1,1	659
16	61	89	28	45,9	593
17	0	29	29	0,0	656
18	62	99	37	59,7	649
19	2.000	2.000	0	0,0	649
20	58	33	-25	-43,1	610
21	1.225	1.307	82	6,7	610
22	2.000	2.000	0	0,0	610
23	2.000	2.000	0	0,0	610
24	0	17	17	0,0	610
25	0	21	21	0,0	525
26	2.000	2.000	0	0,0	530
27	124	104	-20	-16,1	530
28	0	38	38	0,0	530
29	31	59	28	90,3	530
30	1.008	1.039	31	3,1	508
31	1.035	938	-97	-9,4	484

32	0	0	0	0,0	484
33	137	164	27	19,7	484
34	1.363	1.446	83	6,1	446
35	600	723	123	20,5	440
36	2.000	2.000	0	0,0	426
37	585	326	-259	-44,3	426
38	2.000	2.000	0	0,0	426
39	2.000	2.000	0	0,0	426
40	259	289	30	11,6	426
41	0	11	11	0,0	426

Taula 14: Resultats d'EtG en orines reals pre post-congelació

Discussió dels resultats

A l'històric del registre de consum de substàncies psicoactives, l'etanol ha estat sempre el de major prevalença, de forma que més del 90% de la població entre 15 i 65 anys l'ha consumit algun cop a la vida. Aquesta major taxa de consum es dona preferentment en homes entre els 55 i 64 anys. En concordança amb la nostra població d'estudi, on predomina el consum manifestat per homes (93,70%). Pel que fa a l'edat mitjana de la mostra analitzada, 35,8 anys, aquesta estaria més a prop de la població que manifesta consum en l'últim any (Observatorio Español de las Drogas y las Adicciones, 2021).

Pel tipus de delictes o situacions judicials que puguin derivar-se del consum de l'alcohol i altres drogues d'abús, la major part de les mostres van obtenir-se en jutjats de tipus penal, que inclouen els jutjats d'instrucció o de violència sobre la dona en funcions de guàrdia, en els casos en què la jurisdicció està separada. És en aquests jutjats on es fa la primera investigació del delicte, i per tant la primera valoració de la toxicomania del detingut. Quan aquesta fase d'instrucció s'ha conclòs, i el procediment ja no recau sobre un detingut, les mostres procedeixen de jutjats penals o altres, com les audiències provincials, que també reclamen estudis toxicològics per comprovar abstinències/ tractaments de deshabitació en interns o condemnats (Ruiz-Flores Bistuer *et*

al, 2014). Poques mostres arriben al SLF per altres tribunals o motius, de forma que només una mostra ha sigut derivada per un jutjat civil en un cas de guarda, custòdia o aliments de fills menors.

Associat al consum d'alcohol existeix problemàtica social derivada, i destaquen les situacions de discussions o conflicte greu sense agressió física, però poden donar-se detencions i agressions físiques. Aquestes són més freqüents en homes amb episodis de intoxicació etílica aguda o *binge-drinking* (Pulido J *et al*, 2014). Sota els efectes aguts de l'alcohol són freqüents les conductes agressives, però també es descriuen aquestes en situacions de consum crònic, per exemple en dependents, en el marc d'un estat al·lucinatori o delirant propi de la síndrome d'abstinència. Igualment és més probable la reincidència en bevedors excessius (Rodríguez Martos, A, 2002). Així doncs, la valoració medicoforensa del detingut o investigat no ha de limitar-se exclusivament al consum recent, si no que ha d'estudiar un possible consum crònic – i valorar l'abstinència – o la deshabitació a l'alcohol.

En tot cas, per a l'aplicació d'una atenuant per intoxicació etílica, no és suficient amb l'acreditació del consum d'alcohol, i s'ha d'acreditar l'afectació d'aquesta en el subjecte (Vázquez López, J.E., 2014). Aquests dos extrems en ocasions són relativament fàcils de valorar a la pràctica forense, però quan no ho són, almenys el primer, es pot beneficiar d'un estudi toxicològic.

La detecció de l'EtG als laboratoris forenses és una prova d'elevat interès medicolegal com a prova per a determinar consum d'etanol. L'immunoassaig, en general, és una tècnica de detecció de tòxics àmpliament utilitzada com a tècnica de cribatge en hospitals (Martínez-Sánchez, L, Velasco-Rodríguez, J., 2010) i en toxicologia forense. Malgrat això, en aquests casos d'especial rellevància en medicina forense pot ésser útil i inclús necessària la determinació dels tòxics mitjançant una tècnica de confirmació (Marrón T *et al*, 2020).

Existeixen múltiples tècniques d'extracció d'anàlits, concretament de l'EtG, unes específiques per a aquesta substància (Zheng Y, Helander A, 2008;

Zhang X *et al*, 2017) i altres genèriques, com les que es disposen habitualment al SLF. Una d'aquestes últimes extreu GHB i EtG conjuntament, aquesta tècnica d'extracció és la que ha demostrat una millor eficàcia respecte a les altres (taula 9). Aquestes dues substàncies es cerquen habitualment en situacions de submissió i/o vulnerabilitat química al SLF, motiu pel qual aquesta extracció port ser útil en aquests casos (Hegstad S *et al*, 2017b; Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (UNODC), 2013).

En casos medicolegals, la mostra biològica és sovint limitada, i es poden sol·licitar multitud d'anàlisis que requereixen una certa quantitat de mostra cada un d'ells. No obstant, s'ha comprovat que amb una petita quantitat de volum (<0,5 mL d'orina) s'aconsegueixen resultats positius en l'extracció d'EtG amb la tècnica d'immunoassaig utilitzada al SLF, i queda un remanent suficient per a la determinació d'etanol i altres tòxics que puguin ser necessaris per al cas (Meier U, 2018).

La valoració completa del detingut que manifesta toxicomania, implica generalment la valoració d'un quadre de policonsum, és a dir, el consum de diverses substàncies psicoactives en un mateix període de temps (Observatorio Español de las Drogas y las Adicciones, 2020). L'alcohol és presenta en més d'un 90% de persones que han consumit dues o més substàncies en l'últim any. Les següents substàncies més prevalents són el cànnabis, els hipnosedants (que inclouen les benzodiazepines) i la cocaïna (Observatorio Español de las Drogas y las Adicciones, 2021). Aquesta distribució es manté a la mostra estudiada.

Un altre aspecte rellevant és la comprovació de l'estabilitat de l'anàlit (Schloegl H *et al*, 2006) en mostres congelades, de manera que l'anàlisi es podria sol·licitar per part del metge forense o els tribunals temps després de la remissió de la mostra.

La tècnica idònia per a l'estudi de l'EtG és l'HPLC-MS/MS amb metodologia d'ionització dels fragments en mode negatiu (Rocabado G *et al*, 2012; Nguyen VL *et al*, 2018; Stephanson N *et al*, 2002; Helander A *et al*, 2009; Eroshchenko

NN *et al*, 2018). Aquests tipus d'anàlisi són cars i no estan disponibles a tots els laboratoris (Hernández-Domínguez D, 2011). Actualment, en el nostre laboratori no es pot realitzar per problemes tècnics.

No obstant, estan desenvolupats mètodes amb tècniques de cromatografia de gasos per a la detecció de l'EtG (Hernández Domínguez D, 2011; Freire IA, 2008; Paul R, 2009; Capelle D, 2015;). Els resultats obtinguts en les proves amb aquests mètodes no han estat satisfactoris, ja que no s'ha pogut detectar de manera clara l'EtG. Aquest fet pot ser a causa de factors o condicions, com ara la inestabilitat tèrmica de l'EtG, la generació d'isòmers (molècules similars, però d'estructura tridimensional diferent) de l'EtG i altres substàncies derivades durant el procés cromatogràfic. També s'ha de considerar el soroll de fons, que és la presència d'artefactes al sistema cromatogràfic per l'ús continu dels equips amb mostres biològiques analitzades de manera rutinària. Tot i això s'han analitzat les proves en aquest equip perquè és l'habitual d'anàlisi de les mostres al SLF.

La valoració medicolegal i toxicològica del resultat d'EtG en orina ha de tenir en compte els aspectes toxicocinètics de la molècula. La seva detecció, fins a 5 dies després del consum d'etanol (Marrón T *et al*, 2020; Høiseth G *et al*, 2007), i l'absència de correlació entre la quantitat d'alcohol consumida i la d'EtG format, planteja dues situacions possibles. Un resultat positiu podria interpretar-se un consum d'alcohol previ als fets amb implicacions a la imputabilitat del subjecte, però també es podria interpretar com un consum bastant més anterior temporalment. Per altra banda, un resultat negatiu descartaria el consum d'alcohol en el moment dels fets i, per tant, l'afectació de les facultats del subjecte per intoxicació alcohòlica. Igualment, es podria considerar que per tal de tenir un resultat positiu a EtG (per sobre del límit de detecció), la quantitat d'etanol consumida hauria de ser no menyspreable.

Limitacions

Per a l'estudi epidemiològic no s'ha pogut contar amb la totalitat de la documentació referent als casos. D'aquesta forma s'han perdut dades com ara la situació de l'explorat (detingut o no), o el tipus de consum d'etanol (recent, crònic...).

Igualment s'han perdut casos en què les mostres s'han hagut de remetre a laboratoris externs. En aquests, encara que es comptava amb l'informe de resultats toxicològics, no constava la determinació d'EtG. Per aquest motiu, els 20 casos que no s'han analitzat al SLF no s'han tingut en compte per a la valoració de les variables toxicològiques.

El SLF actualment té un aparell d'HPLC (cromatografia de líquids) en estat d'obsolescència que no permet l'anàlisi de substàncies amb mètode d'ionització negativa. Aquesta situació sobrevinguda després de l'acceptació d'aquest projecte ha impedit la realització de les proves en aquest aparell, que és el que gran part de la bibliografia recomana.

Conclusions

1. La determinació de tòxics en orina de pacients vius, en investigats per algun tipus de delictes, és una pràctica actualment poc freqüent entre els metges forenses.
2. Les dades epidemiològiques i toxicològiques de la població de detinguts valorada són similars amb la població general en quant al consum d'alcohol i altres drogues d'abús.
3. L'estudi de l'EtG és una anàlisi útil en diferents situacions medicolegals; la valoració de toxicomanies i corroboració de deshabitació són les més habituals en el nostre àmbit judicial.
4. Quan es demana una pericial medicoforense per tal de considerar o no una atenuant per intoxicació alcohòlica, el resultat de l'EtG pot corroborar o descartar el relat del subjecte, si es refereix un consum recent d'alcohol.
5. Per a l'estudi de consum d'etanol en detinguts, quan temporalment ja no es pot determinar la presència d'etanol en orina, és possible valorar la detecció del l'EtG.
6. El desenvolupament d'un mètode analític requereix d'un estudi de la molècula i múltiples proves, i s'ha de dur a terme per professionals especialitzats.
7. Davant l'interès de detectar EtG en una mostra d'orina s'ha pogut desenvolupar un procediment d'extracció específic.
8. Amb els equips de cromatografia de gasos disponibles actualment al SLF no és possible identificar el compost EtG.

9. La cromatografia de líquids és la tècnica confirmatòria més adient per a la determinació d'aquest metabòlit; aquesta tècnica no ha pogut ser avaluada en aquest projecte.

Propostes

1. Fer arribar, mitjançant els canals adients, formació a metges forenses i organismes judicials sobre la utilitat de la determinació d'EtG en orina.
2. Ampliar els estudis del procediment d'extracció de l'EtG, per saber si és una tècnica amb aplicabilitat per extreure altres substàncies d'interès.
3. Estudiar la identificació de l'EtG per cromatografia líquida quan la tècnica estigui disponible al SLF.

Referències bibliogràfiques (bibliografia)

- American Psychiatric Association. (2013). *Guía de consulta de los criterios diagnósticos del DSM-5*. Chicago: Burg Translations, Inc. (Versión original en inglés: *Desk reference to the diagnostic criteria from DSM-5*. Arlington, VA: American Psychiatric Association, 2013)
- Barrio P, Wurst FM, Gual A. (2018). New Alcohol Biomarkers. New challenges. *Alcohol and Alcoholism*. 1–2.
- Cappelle D, Neels H, Yegles M, Paulus J, van Nuijs AL, Covaci A, Crunelle CL. (2015). Gas chromatographic determination of ethyl glucuronide in hair: comparison between tandem mass spectrometry and single quadrupole mass spectrometry. *Forensic Sci Int*. 249:20-4.
- Colom, J, Segura-García, L. (2020). La actualización de los límites de bajo riesgo del alcohol. Una oportunidad para mejorar la implementación de las estrategias de identificación precoz e intervención breve en España. *Rev Esp Salud Pública*, 94.
- Côte L. (2014). *Determination of urinary ethyl glucuronide and ethyl sulfate by LC/M for clinical research*. Agilent Technologies, Inc, Montréal, QC. AACC. Póster A-386.
- Eroshchenko NN, Barsegyan SS, Kiryushin AN, Tuaeava NO, Nosyrev AE, Salomatin VE. (2018). The development and validation of the method for the identification of ethyl glucuronide and ethyl sulfate as the markers of the consumption of ethyl alcohol during one's lifetime. *Sud Med Ekspert*. 61(4):42-47.
- Favretto D, Nalesso A, Frison G, Viel G, Traldi P, Ferrara SD. (2010). A novel and an effective analytical approach for the LC-MS determination of ethyl glucuronide and ethyl sulfate in urine. *Int J Legal Med*. 124(2):161-4.
- Freire IA, Barrera AM, Silva PC, Duque MJ, Gómez PF, Eijo PL. (2008). Microwave assisted extraction for the determination of ethyl glucuronide in urine by gas chromatography-mass spectrometry. *J Appl Toxicol*. 28(6):773-8.

- Hegstad S, Helland A, Hagemann C, Spigset O. (2017b). EtG/EtS in Serum by UHPLC-MS-MS in Suspected Sexual Assault Cases. *J Anal Toxicol.* 1;41(7):618-622.
- Hegstad S, Kristoffersen L, Liane VH, Spigset O. (2017a). EtG and EtS in Autopsy Blood Samples With and Without Putrefaction Using UPLC-MS-MS. *J Anal Toxicol.* 1;41(2):107-113..
- Helander A, Böttcher M, Fehr C, Dahmen N, Beck O. (2009). Detection times for urinary ethyl glucuronide and ethyl sulfate in heavy drinkers during alcohol detoxification. *Alcohol Alcohol.* 44(1):55-61.
- Hernández-Domínguez D, Correa-Vidal MT, de Oca-Porto RM, Granda-Fraga M. (2011). Validación de un método para determinar etilglucurónido en muestras de orina. *Rev. Cub. Med. Dep. & Cul. Fís.* Vol 6, Num 3.
- Høiseth, G., Bernard, J. P., Karinen, R., Johnsen, L., Helander, A., Christophersen, A. S., & Mørland, J. (2007). A pharmacokinetic study of ethyl glucuronide in blood and urine: Applications to forensic toxicology. *Forensic Science International*, 172(2–3), 119–124.
- https://www.researchgate.net/figure/Figura-1-Cromatograma-de-HPLC-de-los-estandares-de-acidos-organicos-separados-en-menos_fig1_318007139 [23 April, 2021]
- Institut de Medicina Legal i Ciències Forenses de Catalunya. (2019). *Memòria d'activitat 2019*. Barcelona: Generalitat de Catalunya, Departament de Justícia.
- Janda I, Weinmann W, Kuehnle T, Lahode M, Alt A. (2002) Determination of ethyl glucuronide in human hair by SPE and LC-MS/MS. *Forensic Sci Int.* 14;128(1-2):59-65.
- López Matayoshi, C.Y. (2015) *Relación entre alcoholemia, etilglucurónido y hepatopatía en cadáveres del Instituto Anatómico Forense de Madrid y su utilidad forense en la valoración del consumo de alcohol*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid: Madrid.

- Marrón, T, Gallego, G, Defez, F.J., Barbal, M. (2020). *Drogues d'abús en toxicologia forense: recomanacions i interpretació d'utilitat medicolegal*. Barcelona: Centre d'Estudis Jurídics i Formació Especialitzada.
- Martínez-Sánchez, L, Velasco-Rodríguez, J. (2010). Valor del cribado toxicológico en orina en las sospechas de intoxicación en urgencias. *An Pediatr Contin*, 8(3), 139-43.
- Meier U, Briellmann T, Scheurer E, Dussy F. (2018). Sample preparation method for the combined extraction of ethyl glucuronide and drugs of abuse in hair. *Drug Test Anal*. 10(4):701-710.
- Ministerio de Justicia e Interior (1996). *Real Decreto 296/1996, de 23 de febrero, por el que se aprueba el Reglamento Orgánico del Cuerpo de Médicos Forenses*. Madrid: BOE-A-1996-4718.
- Ministerio de Sanidad (2020). *Límites de consumo de bajo riesgo de alcohol. Actualización del riesgo relacionado con los niveles de consumo de alcohol, el patrón de consumo y el tipo de bebida*. Madrid: Ministerio de Sanidad.
- Nguyen VL, Paull P, Haber PS, Chitty K, Seth D. (2018). Evaluation of a novel method for the analysis of alcohol biomarkers: Ethyl glucuronide, ethyl sulfate and phosphatidylethanol. *Alcohol*. 67:7-13.
- Observatorio contra la violencia doméstica y de género (2020). *Análisis de las sentencias dictadas en el año 2018 relativas a homicidios o asesinatos por violencia de género y doméstica*. Madrid: Consejo General del Poder Judicial.
- Observatorio Español de las Drogas y las Adicciones, Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas, Ministerio de Sanidad. (2021). *Encuesta sobre alcohol y otras drogas en España (EDADES), 1995-2019/2020*. Madrid: Ministerio de Sanidad.
- Observatorio Español de las Drogas y las Adicciones, Delegación del Gobierno para el Plan Nacional sobre Drogas, Ministerio de Sanidad. (2020). *Informe 2020 Alcohol, tabaco y drogas ilegales en España*. Madrid: Ministerio de Sanidad.
- Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (UNODC). (2013). *Directrices para el análisis forense de sustancias que facilitan la agresión*

sexual y otros actos delictivos. Viena: Sección de Servicios en Inglés, Publicaciones y Biblioteca, Oficina de las Naciones Unidas.

Organización Mundial de la Salud (2006a). *Violencia juvenil y alcohol*. Nota Descriptiva.

Organización Mundial de la Salud (2006b). *Violencia inflingida por la pareja y el alcohol*. Nota descriptiva.

Organización Mundial de la Salud. (2018). *Alcohol*. Nota descriptiva.

Paul R, Tsanaclis L, Kingston R, Berry A, Guwy A. (2011). Simultaneous determination of GHB and EtG in hair using GCMS/MS. *Drug Test Anal.* 3(4):201-5.

Pulido, J, Indave-Ruiz, B.I., Colell-Ortega, E, Ruiz-García, M, Bartroli, M, Barrio, G,. (2014). Estudios poblacionales en España sobre daños relacionados con el consumo de alcohol. *Rev Esp Salud Pública*, 88, 493-513.

Rocabado Calizaya G, de la Fuente Vásquez F, Nieto Martínez JP. (2012) Determinación de etilglucoronido por lc-ms/ms, posible indicador en análisis forense. *Rev. Méd. La Paz*. 18(1):5-8.

Rodriguez Martos, A. (2002). Prevención de lesiones atribuibles al alcohol en el marco de una política de reducción de daños. *Trastornos Adictivos*, 4(2), 95-108.

Ruiz-Flores Bistuer, M, Vicente Herrero, M.T., Torres Alberich, J.I., López González, A.A. (2014). Consumo de alcohol y comportamientos violentos. Aspectos médico-legales: una revisión desde la jurisprudencia espanyola. *Revista CES Derecho*, 5(2),220-236.

Schloegl H, Dresen S, Spaczynski K, Stoertzel M, Wurst FM, Weinmann W. (2006). Stability of ethyl glucuronide in urine, post-mortem tissue and blood samples. *Int J Legal Med*. 120(2):83-8.

Sharma P, Bharat V, Murthy P. (2015). Quantitation of ethyl glucuronide in serum & urine by gas chromatography - mass spectrometry. *Indian J Med Res*. 141(1), 75-80.

- Stephanson N, Dahl H, Helander A, Beck O. (2002) Direct quantification of ethyl glucuronide in clinical urine samples by liquid chromatography-mass spectrometry. *Ther Drug Monit.* 24(5):645-51.
- Vázquez Lopez, J.E., (2014). La atenuante de intoxicación etílica en el proceso penal. Prueba pericial en relación a la misma, y acreditación que exige el Tribunal Supremo. Análisis de una reciente sentencia (T.S. 12/12/2014, Sala Segunda). *Cuad Med Forense*, 20(4), 206-211.
- Vázquez-Portomeñe Seijas, F. (2016). La atenuante de grave adicción: un análisis jurisprudencial. *La ley digital*, 421/2016.
- Villalbí J.R., Bosque-Prous, M. (2020). Políticas para prevenir los daños causados por el alcohol: prioridades para España. *Rev Esp Salud Pública*, 94.
- Weinmann W, Schaefer P, Thierauf A, Schreiber A, Wurst FM. (2004). Confirmatory analysis of ethylglucuronide in urine by liquid-chromatography/electrospray ionization/tandem mass spectrometry according to forensic guidelines. *J Am Soc Mass Spectrom.* 15(2):188-93.
- Zhang X, Zheng F, Lin Z, Johansen SS, Yu T, Liu Y, Huang Z, Li J, Yan J, Rao Y. (2017). Simultaneous determination of ethanol's four types of non-oxidative metabolites in human whole blood by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta*.
- Zheng Y, Helander A. (2008). Solid-phase extraction procedure for ethyl glucuronide in urine. *J Anal Toxicol.* 32(9):778-81.

Annexos

Annex 1: Llistat d'abreviatures i símbols

°C – Graus centígrads

6-MAM – 6-monoacetilmorfina

Ac - Anticòs

ADH – Alcohol deshidrogenasa

Ag - Antigen

ALDH – Aldehid deshidrogenasa

AP – Audiència Provincial

BCN Ciutat i H – Divisió de Barcelona Ciutat i l'Hospitalet

BCN Comarq – Divisió de Barcelona Comarques

BSFTA - *N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide amb trimethylchlorosilane*

CG – Cromatografia de gasos

CG-HS-FID – Cromatografia de gasos amb espai de cap i detector d'ionització de flama

CG-MS – Cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses

DPREV – Diligències prèvies

DURG – Diligències urgents

DSM V – *Diagnostic an Statistical Manual of Mental Disorders fifth version*

E - Enzim

EDDP – Metabòlit de la metadona

EI – Ionització electrònica

EIA – Enzimoimmunoassaig

EJCAT – Programa informàtic del Departament de Justícia

EtG – Etilglucurònid

EXEC - Executòria

FAEEs – Ésters etílics dels àcids grassos

FID – Detector d'ionització de flama

G6P – Enzim glucosa-6-fosfat deshidrogenasa

GHB – Àcid gammahidroxibutíric

h – Hores

HPLC – Cromatografia líquida d'alta afinitat

HS – Espai de cap

IMLCFC – Institut de Medicina Legal i Ciències Forenses de Catalunya

LC – Cromatografia de líquids

L-L – Extracció en fase líquida

M - Mètode

MEOS – Sistema microsomal oxidatiu de l'etanol

min - Minut

mL – Mil·lilitres

µL - Microlitre

ng - Nanogram

OMS – Organització Mundial de la Salut

PABREV – Procediment abreujat

ppm – Parts per milió

S. VIU – Subjecte viu

SLF – Servei de Laboratori Forense

SPE – Extracció en fase sòlida

T Ebre – Divisió de Terres de l'Ebre

THC - Tetrahidrocannabinol

TMS - Trimetilsilil

UGTs – Uridinadifosfat glucuroniltransferasa

Annex 2: Taula resum de les extraccions valorades amb el resultat

	Extracció 1	Extracció 2	Extracció 3	Extracció 4	Extracció 5
TIPUS	SPE	SPE	SPE	SPE	SPE
Preparació mostra	2 ml d'orina 100 µL buffer NH ₄ /NH ₃ pH 9.2	200 µL d'orina 1800 µL CH ₃ CN	50 µL d'orina 450 µL buffer 0.5% HCOOH en H ₂ O	500 µL d'orina	2 ml d'orina 4ml buffer (PO ₄ ⁻) 0.1 M ph 6.1
	1.Acond. 2 ml MeOH 2 ml H ₂ O 2. Addició mostra: 2 ml orina 3. Neteja: 2 ml H ₂ O 4. Elució: 2 ml MeOH	1.Acond. 3 ml MeOH 3 ml H ₂ O 3 ml CH ₃ CN 2. Addició mostra: 200 µL d'orina 3. Neteja: 3 ml CH ₃ CN 3 ml MeOH 4. Elució: 3 ml d'HCl 2% en CH ₃ CN	1.Acond. 2 ml MeOH 2 ml H ₂ O 2. Addició mostra: 50 µL d'orina 3. Neteja: 1 ml CH ₃ CN 4. Elució: 2 ml HCOOH 5% en MeOH 2 ml d'HCl 2% en CH ₃ CN %	1.Acond. 1 ml MeOH 1 ml H ₂ O 2. Addició mostra: 500 µL d'orina 3. Neteja: 1 ml NH ₃ 5% en H ₂ O 1 ml H ₂ O 1 ml MeOH 4. Elució: 1 ml CH ₃ COOH 5% en MeOH.	1. Acond. 2 ml MeOH 2 ml buffer fosfat 0.1M. 2. Addició mostra: 2ml d'orina 3. Neteja: 3 ml H ₂ O 3 ml CH ₃ COOH 1M 4. Elució: 3 ml barreja CH ₂ Cl ₂ NH ₄ OH CH ₃ CH(OH) CH ₃ (4ml/20µl/1ml)
Resultats ETG (ng/ml)	197	0	0	220	62

	Extracció 7	Extracció 8	Extracció 9
TIPUS	L-L	L-L	L-L
Preparació mostra	2 ml d'orina 2ml buffer (PO ₄ ⁻) 0.1 M pH 6.1	2 ml d'orina 2ml buffer (PO ₄ ⁻) 0.1 M pH 6.1	100 µL d'orina
	1. Addició mostra : 2ml d'orina + 2ml Buffer. 2.Addició dissolvent: tub comercial ToxitubeA 3. Barreja de les dues fases i centrifugació a 14000rpm 10 min. 4.Separació fase orgànica.	1.Addició mostra : 2ml d'orina + 2ml Buffer. 2.Addició dissolvent: tub comercial ToxitubeB 3. Barreja de les dues fases i centrifugació a 14000rpm 10 min. 4.Separació fase orgànica.	1.Adicció mostra : 100 µL d'orina 2.Adicció de 200 µL CH ₃ CN 3. Barreja de les dues fases i centrifugació a 14000rpm 10 min. 4.Separació agafant 150 µL de la fase orgànica.
Resultats ETG (ng/ml)	21	31	480