



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE
COCAÍNA EN DIVERSAS MATRICES BIOLÓGICAS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

DANIEL BAUTISTA ZAMORA



CIUDAD DE MÉXICO

2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: ALEJANDRA QUIJANO MATEOS
VOCAL: PAULINA DEL VALLE PÉREZ
SECRETARIO: LUZ ALEJANDRA CASTILLO ALANÍS
1er. SUPLENTE: GUSTAVO ADOLFO ZELADA GUILLEN
2° SUPLENTE: ANTONIO ELIAS KURI PINEDA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

FACULTAD DE MEDICINA. LICENCIATURA EN CIENCIA FORENSE

ASESOR DEL TEMA:

LUZ ALEJANDRA CASTILLO ALANIS

SUSTENTANTE (S):

DANIEL BAUTISTA ZAMORA

Índice	
Introducción	3
Objetivo General	5
Objetivo particular	5
Metodología	5
1. Protocolo de validación.....	6
2. Cocaína.....	8
2.1 Propiedades físicas y químicas	8
2.2 Farmacocinética	10
2.2.1 Absorción y distribución.....	10
2.2.2 Metabolismo	11
2.3 Farmacodinamia.....	13
2.4 Toxicidad	14
3. Matrices Biológicas.....	16
3.1 Sangre y orina.....	17
3.2 Cabello.....	18
3.3 Saliva	19
3.4 Otras alternativas	20
4. Métodos analíticos	21
4.1 Métodos de extracción	22
4.1.1 Extracción líquido-líquido.....	22
4.1.2 Extracción en fase sólida	23
4.2 Cromatografía de Gases	24
4.3 Cromatografía de Líquidos	28
5. Metodología de investigación	31
6. Discusión	72
7. Conclusiones.....	75
Anexo 1. Lista de artículos consultados ordenados según el esquema del capítulo 5	76
Anexo 2. Método analítico propuesto para la detección de cocaína y sus metabolitos en orina mediante HPLC-MS/MS.....	112
Bibliografía	116
Bibliografía Complementaria	132
Glosario	135
Lista de Abreviaturas.....	137

Introducción

La cocaína es uno de los estimulantes más utilizados alrededor del mundo. Fue purificada por primera vez en 1860 por un científico alemán llamado Albert Niemann de la planta *Erythroxylum coca*, basado en sus estudios de los indígenas locales que la mascaban para trabajar más y durante periodos más largos de tiempo. Después de su purificación comenzó a utilizarse como ingrediente para diferentes bebidas como *Vin Marian* (un vino que contenía 6 mg/oz de cocaína) y la coca-cola (que contenía una mezcla de cocaína y cafeína). En los años 80, también comenzó a utilizarse en la medicina terapéutica gracias a los estudios de farmacocinética publicados años antes, al mismo tiempo que comenzaba a ser utilizada como droga de abuso. (Bortolotti et al. 2012)

Durante el año 2012, se estimó que 324 millones de personas en el mundo, de una edad entre 15 y 64 años usan o han usado drogas, lo que corresponde aproximadamente al 7% de la población total. (D'Avila, Limberger, et al. 2016). Uno de cada diez usuarios de drogas es un consumidor que sufre trastornos graves, lo que supone un trabajo pesado para los sistemas de salud pública en lo que respecta a la prevención, el tratamiento y la atención de estos. Únicamente uno de cada seis consumidores en el mundo tiene acceso a tratamiento, dado que en muchos países hay un déficit considerable en la prestación de los servicios de salubridad.(UNODC 2012)

El desarrollo y validación de métodos analíticos que permitan evidenciar las drogas de abuso en matrices biológicas es muy importante en toxicología forense y clínica, permitiendo el monitoreo y la dirección de las acciones que deben ser tomadas por las políticas públicas contra el uso de drogas y el tratamiento más apropiado para pacientes y usuarios. La detección de estas drogas por el análisis de muestras de plasma, orina, cabello, meconio, leche materna y otros, pueden ser usadas para detectar y cuantificar sustancias específicas y/o sus productos de biotransformación. (D'Avila, Limberger, et al. 2016)

Hoy en día existen diversas técnicas analíticas aplicadas al control de abuso de drogas en muestras biológicas; hay reportes que indican que la cocaína puede

ser detectada individual o simultáneamente con otras drogas en un amplio rango de matrices. Para identificar y cuantificar estas drogas, los análisis requieren metodologías caracterizadas por su amplia aplicación y alta especificidad. Existen muchas situaciones legales (violaciones, robos, accidentes de trabajo, tráfico de drogas, etc.) en donde los resultados de los análisis toxicológicos son determinantes, por lo que su detección debe ser objetiva y confiable. (Janicka et al. 2010)

Aquellos métodos que utilizan espectrometría de masas como sistema de detección son los que se usan principalmente en laboratorios para análisis de rutina desde hace varios años, pero existen nuevas tecnologías emergentes que mejoran su eficacia y otras que tienen una mayor selectividad y especificidad hacia las drogas y sus nuevos usos. Estos métodos permiten diferentes enfoques que pueden servir de ayuda a los encargados de llevar a cabo los análisis para elegir el más adecuado de acuerdo a la muestra que se tenga disponible y proporcionar datos específicos para los objetivos que se persiguen, dejando margen también para la adaptación al nivel de complejidad de los laboratorios. (UNODC 2012)

Objetivo General

Realizar una revisión bibliográfica de los procedimientos para la identificación y cualificación de cocaína en los métodos analíticos que han sido utilizados y desarrollados durante los últimos siete años (2011-2018)

Objetivo particular

Plantear un protocolo de validación adecuado a las necesidades del laboratorio de la Licenciatura en Ciencia Forense, de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México; para la determinación de cocaína en matrices biológicas

Metodología

Se obtuvieron 174 artículos en total de los últimos 7 años (enero 2011-abril 2018) partiendo de la búsqueda en bases de datos como PubMed, Science Research, Springer Link y Elsevier. Se organizaron los datos en una base de datos que permite comparar los métodos reportados por los autores en sus respectivas publicaciones; la base concentra datos como: método de preparación de las muestras, método analítico utilizado, límites de detección y cuantificación obtenido, así como las modificaciones realizadas a los métodos tradicionales para mejorar la detección de la droga en diversas matrices biológicas.

1. Protocolo de validación

Para poder estandarizar los procesos analíticos básicos que se tienen que realizar en cada laboratorio, se publicaron “Los lineamientos del Laboratorio de Toxicología Forense” (*The Forensic Toxicology Laboratory Guidelines*) en 1991 y cuya última actualización, data del 2006. En dicho documento se establecen los lineamientos específicos para la práctica de la toxicología forense que sirven como una guía para la autoevaluación del laboratorio. Incluye las definiciones del personal que trabaja, desde el director hasta los investigadores y los técnicos, las especificaciones en el etiquetado de muestras y su manejo, la cadena de custodia de las muestras y los procedimientos analíticos, que es lo que nos ocupa en este trabajo.

Cuando un laboratorio es requerido para determinar la presencia de drogas en muestra biológicas, se emplean pruebas screening como las inmunológicas, aunque siempre se debe especificar en el reporte que la prueba solo tiene una sensibilidad aproximada, esto es, que solo son cualitativas y no cuantitativas. Por ello, sirven como base para otras pruebas confirmativas, en donde se recomienda el uso de la espectrometría de masas.

El laboratorio debe contar con un manual de procedimientos estándar (SOP, Standard Operating Procedures por sus siglas en inglés), que debe estar disponible para todo el personal e incluir descripciones detalladas de los procedimientos para la recepción de muestras, cadena de custodia, análisis, aseguramiento de la calidad, control de calidad, revisión de datos y la forma de reportar estos datos. . De igual manera, debe incluir procedimientos administrativos así como los métodos analíticos que deben ser revisados y aprobados por el director y el personal responsable.

Cada procedimiento analítico debe incluir

- a) Teoría o principio del método a realizar
- b) instrucciones de preparación para los reactivos
- c) detalles del procedimiento analítico
- d) instrucciones para la preparación de los calibradores y controles

- e) información especial para el manejo y seguridad de reactivos que lo requieran
- f) parámetros de validación
- g) criterios para la aceptación o rechazo de los controles de calidad, y
- h) referencias

Este manual debe ser constantemente revisado y actualizado cada vez que se implementen nuevos cambios o se añadan reactivos diferentes al procedimiento. (SOFT / AAFS 2006)

2. Cocaína

La cocaína es un estimulante altamente adictivo presente en la naturaleza como un alcaloide de la planta de coca (*Erythroxylon coca* o *Erythroxylon novogranatense*). Tradicionalmente, las hojas de coca se mastican o se toman como infusión a modo de té. Debido a su alto potencial para el abuso y dependencia, la hoja de coca y la cocaína se sometieron a fiscalización internacional; no obstante, en algunos países como Reino Unido sigue teniendo usos médicos legítimos, por ejemplo, como anestésico local empleado en cirugía ocular, del oído y de garganta. (UNODC 2012)

Las dos formas principales en que se presenta la cocaína son la sal soluble en agua (clorhidrato) que puede aspirarse o inyectarse, y la base insoluble en agua, también conocida como crack, que se consume principalmente fumada. La mayoría de las veces se presenta como un polvo cristalino blanco o blanco apagado, a menudo fino y raramente húmedo. La adulteración no es desconocida, en el caso del material de tráfico internacional, la pureza llega a ser a menudo del 80 al 90% (como clorhidrato de cocaína). Sin embargo, en el caso de tráfico dentro de un país, la pureza es de aproximadamente 30% usando adulterantes como el levamisol, lidocaína, cafeína o azúcares como manitol, lactosa o glucosa. (UNODC 2012)

2.1 Propiedades físicas y químicas

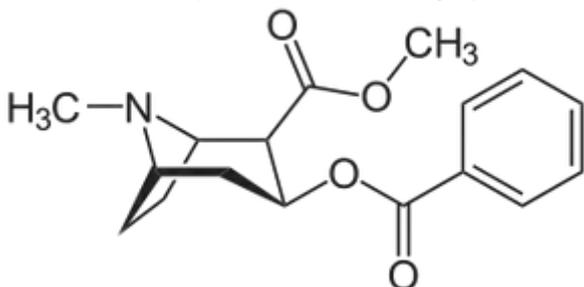


Fig.1. Estructura de la molécula de cocaína

Fórmula	C ₁₇ H ₂₁ NO ₄
Nombres	[1R-(exo,exo)]-3-(benzoiloxi)-8-metil-8-azabicyclo[3,2,1]octano-2-éster metílico del ácido carboxílico
	3β-hidroxi-1αH,5αH-tropano-2β-benzoato del éster metílico del ácido carboxílico
	<i>l</i> -cocaína
	β-cocaína
	Benzoilmetilecgonina
Peso Molecular	303,4 g/mol (base), 339,8 (clorhidrato)
Punto de fusión	98 °C (base), 195 °C (clorhidrato)
pKb	5.59
pKa	8.61
logKow	2.30

Tabla 1. Propiedades físicas y químicas de la cocaína. (National Library of Medicine 2018)

Se caracteriza por ser una cadena alifática de tipo abierta ramificada, con dos cadenas cerradas y una de tipo heterocíclico y la otra aromática, con dos grupos éster y un grupo amina de tipo terciaria que forma parte del heterociclo, como se aprecia en la figura 1.

La estructura presenta isomería cis y trans. El isómero trans se distingue por el símbolo + (dextrógira) *d*-cocaína y el isómero cis por el símbolo – (levógira) *l*-cocaína.

La amina terciaria actúa como base, por poseer pares de electrones libres lo que les permite reaccionar con ácidos para formar sales. Es poco soluble en agua, pero al reaccionar con ácido clorhídrico (HCl) para formar el clorhidrato de cocaína, se vuelve soluble. La tabla 2 muestra las diferencias de solubilidad en algunos solventes en su forma base y en su forma de sal.

Solubilidades	Base (g/mL)	Clorhidrato (g/mL)
Agua	Ligeramente soluble (1 en 600)	Soluble (1 en 0.4)
Etanol	Soluble (1 en 6.5)	Soluble (1 en 3.2)
Eter dietílico	Soluble (1 en 3.5)	Insoluble
Cloroformo	Soluble (1 en 0.7)	Soluble (1 en 12.5)

Tabla 2. Solubilidad de cocaína en diversos solventes (UNODC 2012)

2.2 Farmacocinética

2.2.1 Absorción y distribución

La cocaína es una base débil de pKa 8.6. En su forma básica, tanto en sangre como en la forma en que llega a los pulmones por la nariz, atraviesa las membranas celulares de forma rápida y eficaz. Entra al sistema circulatorio y con ello al cerebro, posterior a una administración intravenosa o pulmonar. También puede pasar a la leche materna y atravesar la barrera placentaria para intoxicar al feto. (Benowitz 1993)

La cantidad relativa de la droga que se absorbe a nivel sistémico depende fundamentalmente de la vía de administración. Por la mucosa nasal después de esnifar y la absorción a través del tracto digestivo después de su administración oral es similar y mucho más lenta que después de fumar o de la administración intravenosa. El pico plasmático se produce normalmente a los 60 minutos después de la administración nasal u oral, aunque como en otros parámetros cinéticos, la variabilidad es muy grande con intervalos de 30 a 120 minutos. La biodisponibilidad es de un 30-40%. (Lizasoain et al. 2002) Esto depende de las barreras que la cocaína debe atravesar para llegar al sistema; por ejemplo, para fumar se debe tener en cuenta que una parte de la cocaína puede ser destruida por pirólisis, mientras que por vía intranasal, se debe difundir por la mucosa antes de absorberse. Esta barrera, combinada con las propiedades vasoconstrictivas de la cocaína resulta en una tasa de absorción baja en comparación con la vía pulmonar. La tabla 2 muestra un comparativo del tiempo de vida media y el tiempo de eliminación entre las

distintas vías de administración. La tabla 3 muestra el tiempo de vida media y la concentración alcanzada por diferentes vías de administración.

Vía de administración	Concentración alcanzada (ng/mL)	Tiempo vida media	Tiempo eliminación (min)
Intravenosa	98-349	5 min	244
Pulmonar (fumada)	154-345	50 min	272
Intranasal	40-88	50 min	299
Oral (masticada)	11-149	0.4 a 2 horas	

Tabla 3. Comparación entre vías de administración de cocaína (extraído de Bortolotti, et al. 1998)

La distribución en órganos después de su administración es rápida. El volumen de distribución varía entre 1.5 a 2 L/Kg (Bortolotti et al. 2012)

La DL₅₀ (dosis letal media) por vía endovenosa para adulto es de entre 0.5 y 1 g por toxicidad directa sobre el miocardio. La dosis de abuso promedio por vía inhalatoria o vía oral se estima entre 8 y 14 mg pero puede llegar a los 200 mg.

2.2.2 Metabolismo

La cocaína empieza a biotransformarse en el propio plasma a través de la enzima pseudocolinesterasa por hidrólisis de los dos enlaces éster produciendo ecgonina metil ester (EME), mientras que la Benzoilecgonina (BZE), el segundo metabolito mayor de la cocaína es formado espontáneamente a pH fisiológico. Ambos, EME y BZE son biotransformados a ecgonina, un proceso que ocurre espontáneamente y es dependiente de pH. Entre 1-5% se excreta por orina sin cambios. Ninguno de los dos metabolitos posee actividad biológica significativa en humanos. La mayor parte de la droga es biotransformada en hígado, dando lugar a norcocaína (NCOC) que es un anestésico local más potente y un mejor inhibidor de la norepinefrina por N-demetilación. Una segunda y tercer hidrólisis producen metabolitos menores como meta y para-hidroxi- cocaína (Bortolotti et

al. 2012) La figura 2 muestra las estructuras químicas de los metabolitos más importantes y la vía de formación.

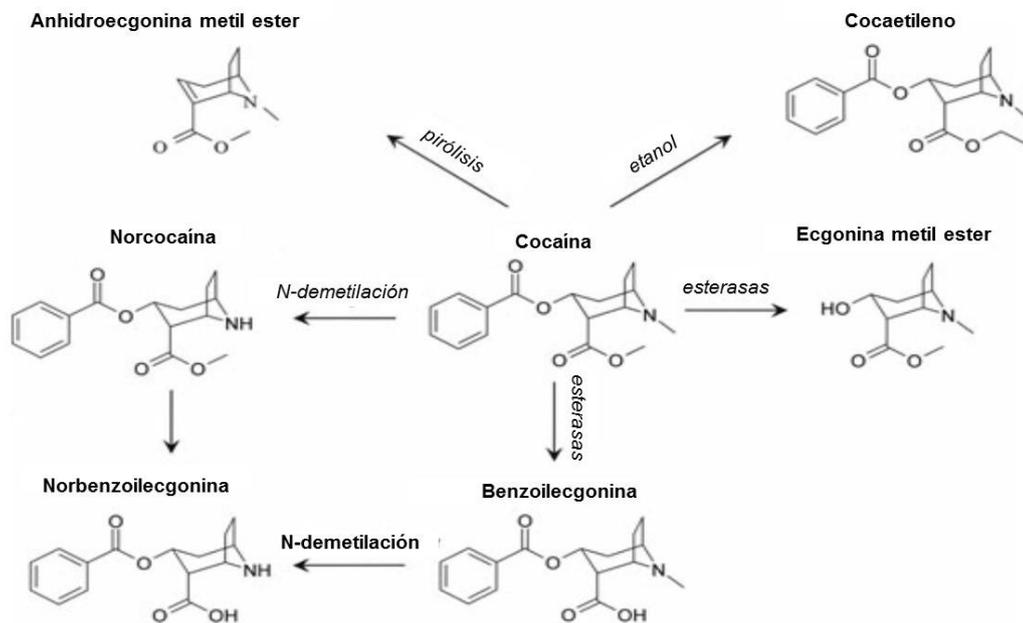


Fig. 2 Representación esquemática de los principales metabolitos de la cocaína en el cuerpo humano. (Hezinova et al. 2012)

La BZE es el metabolito que se detecta en orina. Puede ser encontrada hasta 3-4 días después del último consumo y por supuesto dependerá de la cantidad consumida y de la sensibilidad de la prueba.

Cuando la cocaína se fuma, la droga se piroliza a una serie de compuestos químicos dependiendo de la temperatura. El principal metabolito es la anhidroecgonina metil ester (AEME) que es farmacológicamente activo en animales, sin embargo, en humanos existen muy pocos trabajos y no se conoce con exactitud su perfil farmacológico, sin embargo, lo que sí se sabe es que no aparece cuando la cocaína se esnifa o se administra por vía intravenosa, por lo que su interés radica fundamentalmente en el control urinario de consumo de cocaína.

La potenciación de la euforia por la ingesta de etanol puede ser la base del consumo con bebidas alcohólicas, aunque también se ha señalado la disminución de efectos indeseados como los cuadros de migraña inducidos por la cocaína. En estudios *in vitro* se ha visto que el etanol inhibe la actividad de la metilesterasa, disminuyendo la hidrólisis a benzoilecgonina. Es modificada por

esterasas hepáticas a cocaetileno y se incrementa la N-demetilación a norcocaína. Este metabolito posee actividad farmacológica y tóxica fundamentalmente a nivel cardíaco e incluso hepático. (Lizasoain et al. 2002)

2.3 Farmacodinamia

La cocaína es un estimulante que conduce a la rápida acumulación de catecolaminas y serotonina en el cerebro mediante el bloqueo de la recaptación de dopamina y noradrenalina principalmente en el sistema mesocorticolímbico, por lo que la disponibilidad de estas monoaminas aumenta significativamente como se muestra en la figura 3. El aumento de la dopamina se asocia con los efectos placenteros provocados por la droga. (Volkow et al. 1999a)

Durante las primeras fases de consumo, la dopamina secretada facilita el aprendizaje relacionado con el consumo. Dosis repetidas provocan cambios neuronales que modifican la estructura de los circuitos de recompensa que almacenan la información relacionada con el consumo. Los estímulos, las situaciones, los lugares y las emociones vinculadas a la droga quedan grabados. (Volkow et al. 1999b)

Un primer efecto es la cardiotoxicidad, por la sostenida estimulación de las células post-sinápticas alfa y beta adrenérgicas, además de la generación de radicales libres de oxígeno por la autooxidación de la noradrenalina.

Un segundo efecto de la cocaína es que disminuye o interrumpe la transmisión de neurotransmisores bloqueando el canal de sodio, como otros anestésicos locales. En altas concentraciones (como una sobredosis) también puede afectar el potencial de acción cardíaco, disminuyendo la conducción y perjudicando la contractibilidad del corazón, lo que lleva a una arritmia y muerte repentina. (Benowitz 1993)

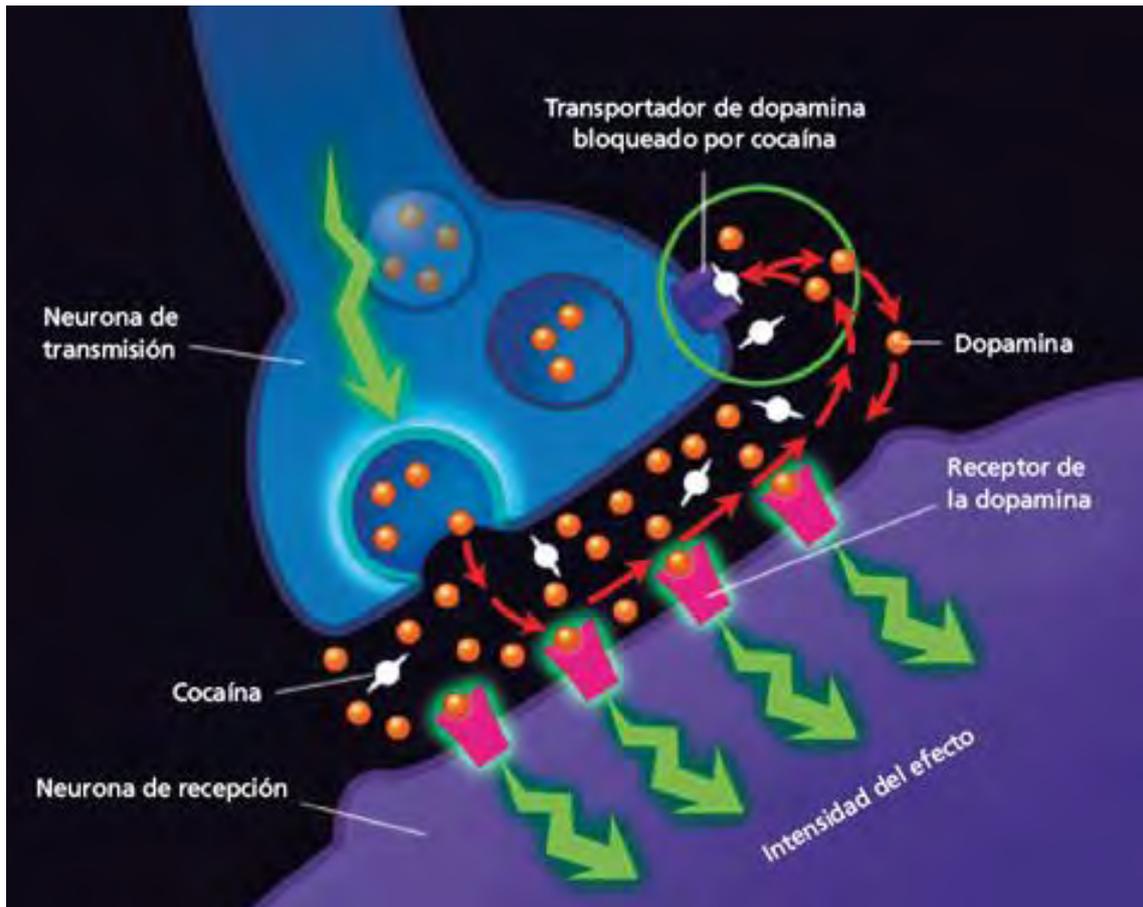


Fig.3. mecanismo de acción de la cocaína. La cocaína bloquea el sitio de recaptura, imposibilitando el reciclaje y provocando una acumulación de neurotransmisores en la sinapsis. Tomada del National Institute of Drug Abuse (NIDA), E.U.

2.4 Toxicidad

En general, las alteraciones clínicas producidas por la cocaína se presentan en tres fases:

Fase 1. Estimulación inicial: las acciones primarias son como anestésicos locales, estimulación del sistema nervioso central y recaptación neuronal de catecolaminas. Esta primera fase se presenta rápidamente (en absorción nasal se inicia 1-3 minutos después del contacto) y se caracteriza clínicamente por aumento del pulso, taquicardia, aumento de presión arterial, cefalea, inestabilidad emocional y movimientos involuntarios (“tics”) de pequeños músculos de la cara, y midriasis.

Fase 2. Estimulación avanzada. Esta fase se presenta 30-60 minutos después del contacto con la cocaína, aumenta la taquicardia, aumenta la hipertensión, aparece dificultad respiratoria e incluso la respiración se puede hacer irregular. En el sistema nervioso central hay hiperquinesia, y convulsiones tónico clónicas. Las convulsiones son un fenómeno frecuente y usualmente son cortas y autolimitadas. También puede presentarse un coma causado por un estado posticial, hipertermia o una hemorragia intracraneal causada por la hipertensión.

Fase 3. Depresión. Es la fase más severa de la intoxicación aguda y de acuerdo a la dosis ingerida, se puede presentar 1-2 horas después del consumo. Esta fase se caracteriza por cianosis en el perímetro de la boca, gran dificultad respiratoria que puede llegar a falla respiratoria, pulso filiforme o no palpable, hiporreflexia generalizada, disminución de funciones vitales parálisis muscular, inconsciencia y muerte. En esta fase se presentan con frecuencia los intentos de suicidio o suicidios francos. (Telles Mosquera & Cote Menendez 2005)

La dosis mortal de cocaína es de 1 g en inyección intravenosa única. No existe tratamiento farmacológico específico para la intoxicación aguda, ya que los signos y síntomas conductuales pueden ser totalmente diferentes a los fisiológicos. Debido a que las complicaciones generalmente ocurren en las primeras horas posteriores al consumo, es importante ingresar y monitorizar al paciente en los servicios de urgencia. Afortunadamente la vida media plasmática es muy corta (50 minutos) y la mayoría de los efectos adversos graves disminuyen en las primeras horas posteriores a su uso. (Pascual et al. 2001)

3. Detección de cocaína en diferentes matrices biológicas

Generalmente cuando se trata de establecer la identidad de una droga sometida a fiscalización contenida en un material sospechoso, el enfoque analítico ha de ir dirigido a la determinación de al menos dos parámetros no correlacionados, uno de los cuales debe proporcionar información sobre la estructura de la sustancia química analizada (IR, MS o métodos en tándem como GC-MS).

Hoy en día existen diversas técnicas analíticas aplicadas al control de abuso de drogas en muestras biológicas; la cocaína puede ser detectada individual o simultáneamente con otras drogas en un amplio rango de matrices. Para identificar y cuantificar estas drogas, los análisis en ciencia forense requieren metodologías caracterizadas por su amplia aplicación y alta especificidad. Debido a las dificultades para describir la exposición (pasada o actual) a la cocaína, diversas matrices han sido objeto de estudio, las más comunes son sangre, orina, cabello, sudor, meconio, saliva, uñas, dientes, líquido amniótico, y órganos internos. Existen muchas situaciones legales (violaciones, robos, accidentes de tránsito, etc.) en donde los resultados de los análisis toxicológicos son determinantes, por lo que su detección debe ser objetiva y confiable. (Janicka et al. 2010)

Por lo general, los análisis de sangre se utilizan para determinar el consumo de drogas en un corto plazo, mientras que los de orina pueden proveer información de un tiempo más prolongado, en el que las drogas ya han sido metabolizadas y ya no están presentes en la sangre, además de que usarla es menos invasivo que realizar estudios de sangre y se tiene disponible un mayor volumen para realizar los estudios correspondientes. De igual manera, no se necesita una preparación previa de la muestra tan compleja como en sangre, razón por la cuál es la matriz biológica más utilizada para realizar exámenes rápidos. Sin embargo, las concentraciones encontradas en orina pueden no corresponder con los síntomas observados ni ser relacionados con el tiempo de consumo. (Barroso & Gallardo 2015)

El cabello es la matriz alternativa más utilizada debido a sus ventajas sobre la orina y la sangre: su recolección no es invasiva, es posible recolectar una

muestra idéntica aun cuando haya pasado tiempo de la primer recolección y la ventana de detección es mucho más grande (desde semanas hasta meses) desde el primer consumo. Sin embargo, la principal desventaja es que los análisis tienen una mayor incidencia de ser reportados como falsos positivos debido a la facilidad con la que se puede contaminar por la exposición al medio ambiente. (Barroso & Gallardo 2015)

Por otro lado, las pruebas para detección de drogas en saliva se han convertido en tendencia mundial por dos razones: la toma de muestra es un método no invasivo y se pueden llevar a cabo bajo estricta supervisión para evitar su adulteración o sustitución, y las concentraciones observadas en esta matriz pueden ser correlacionadas a los niveles en sangre y plasma, y con ello a los síntomas observados fisiológicamente.(Barroso & Gallardo 2015) Actualmente en el mercado se pueden encontrar almohadillas o pads absorbentes que pueden proteger la muestra de degradación o contaminación.

3.1 Sangre y orina

Las concentraciones máximas venosas y arteriales de la cocaína dependen no sólo de la vía de administración, sino también de la frecuencia de estas. La tabla 4 muestra la biodisponibilidad y el tiempo que tarda en alcanzar la máxima concentración plasmática de acuerdo a la presentación de la droga y su vía de administración

Presentación	Vía de administración	Concentración de cocaína	Porcentaje en plasma	Conc. Máx. en plasma (min)
Hoja de coca	Mascado, Té	0.5-1.5%	20-30	60
Clorhidrato	Intranasal	12-75%	20-30	5-10
Clorhidrato	Intramuscular	12-75%	100	30-45 seg
Pasta	Fumada (sulfato)	40-85%	70-80	8-10 seg
Cocaína base	Inhalada-fumada (alcaloide)	30-80%	70-80	8-10 seg

Tabla 4. Biodisponibilidad de cocaína de acuerdo a la vía de administración (Benowitz 1993)

La cocaína es biotransformada por las colinesterasas plasmáticas y hepáticas a metabolitos solubles en agua (benzoilecgonina y metilecgonina), los cuales son eliminados en orina. La norcocaína es el único metabolito activo conocido que está presente en una concentración significativa en la sangre y puede ser responsable de los efectos tardíos de la droga, ya que realiza recirculación a través del ciclo entero-hepático. (Jenkins & Cone 1998)

La cocaína puede ser detectada en sangre u orina solo algunas horas después de su uso, pero sus metabolitos permanecen hasta 72 horas después de la administración, lo que permite realizar un análisis retrospectivo de la droga.

3.2 Cabello

El mecanismo general propuesto para la incorporación de cocaína en el cabello es el de difusión pasiva, en el que los medicamentos o drogas van de la sangre a las células del folículo capilar. Conforme las células mueren y dan paso a las hebras de cabello, la droga queda atrapada en esta estructura que es muy estable. De esta manera, la incorporación es dependiente de la cantidad de droga presente en el torrente sanguíneo, que a su vez es directamente proporcional a la cantidad de droga que se haya ingerido. (Henderson 1993). La figura 4 representa en un esquema simplificado el método de difusión propuesto para el paso de cocaína al cabello.

Este modelo sienta las bases para el análisis segmental, que consiste en tomar fragmentos sucesivos de cabello para determinar el tiempo de uso de las drogas. Dado que el cabello crece a un ritmo constante, la posición en la que se encuentre la droga en el cabello puede ser relacionado con el tiempo de consumo. (Henderson 1993)

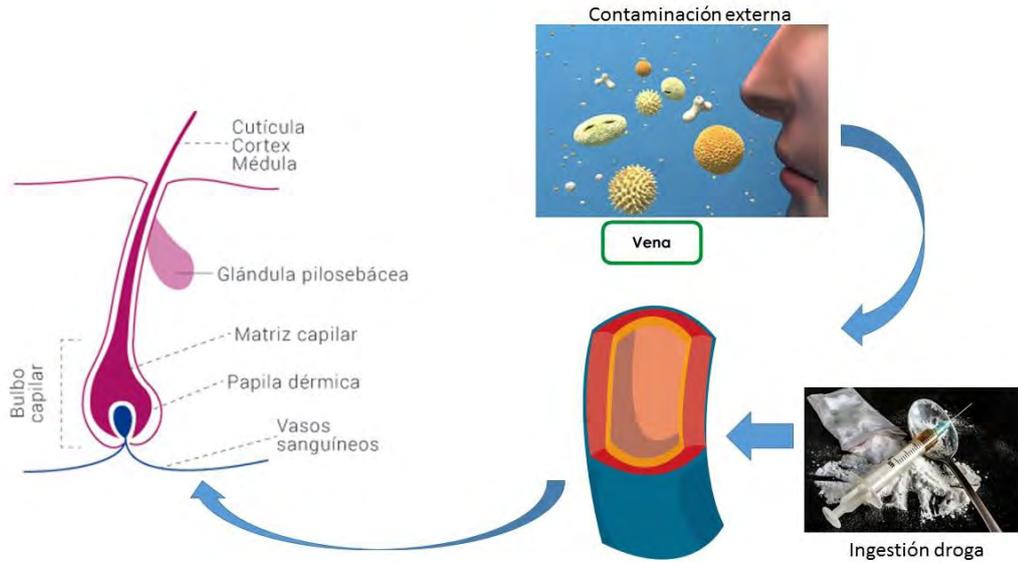


Fig. 4 Diagrama para la incorporación de droga al cabello durante las tres fases de crecimiento (durante la formación, después de la formación y después de salir de la piel) y a partir de diferentes fuentes (sangre, secreciones glandulares, piel y contaminación externa). Adaptado de Henderson 1993

3.3 Saliva

Las bases débiles, como la cocaína, pueden ser detectadas en altas concentraciones y por periodos prolongados de tiempo en saliva debido a una trampa de iones. Dependiendo del pKa de la droga y su lipofilia, la trampa de iones ocurre debido a la diferencia de pH entre la sangre (7.4) y la saliva (de 4 a 6). La droga libre permanece en equilibrio entre las membranas de la sangre y la saliva. A un pH más bajo de la saliva, las bases débiles se ionizan, incrementando su concentración.

Sin embargo, existen poco estudios con esta matriz debido a que, aunque los estudios con grupos controlados (dosis controladas de cocaína) existen buenos reportes de su detección, en la vida diaria las dosis usadas son mucho más altas y por periodos prolongados de tiempo. Debido a los efectos de la cocaína, la boca se reseca y se concentra principalmente en plasma antes que en saliva, por lo que se vuelve muy deficiente su detección en usuarios crónicos. (Bosker & Huestis 2009)

3.4 Otras alternativas

Cuando se habla de la exposición humana a las drogas, también se habla de las mejoras tecnológicas que permiten su detección a niveles que hace años eran impensables. Mientras el cabello y la orina siguen siendo análisis de rutina en casi todos los laboratorios del mundo, varias otras matrices han sido probadas para detectar la cocaína y sus metabolitos en la búsqueda de disminuir o simplificar riesgos y/o adulteración o sustitución de las muestras.

Bailey (Bailey et al. 2015) y Van der Heide (van der Heide et al. 2015) realizan un estudio en huellas de manos, la primera lo hace directamente usando espectrometría de masas de superficie, mientras que la segunda lo utiliza para comprobar la contaminación sobre documentos bancarios. Beck (Beck et al. 2012) y Ellefsen (Ellefsen et al. 2014) detectan drogas en el aliento soplando sobre una boquilla; D'Avila (D'Avila, Ferreira, et al. 2016) y Joya (Joya et al. 2015) utilizan el meconio para observar el metabolismo de la cocaína y el paso a través de la barrera placentaria al sistema del feto. Koster (Koster et al. 2014) realiza su investigación en el sudor con la ayuda de parches absorbentes. También la leche materna ha sido probada como matriz, en el estudio de Silveira (Silveira et al. 2016) y las uñas, como lo comprobó Sykutera (Sykutera et al. 2014).

4. Métodos analíticos

Un método analítico es la descripción de la secuencia de actividades, recursos materiales y parámetros que se deben cumplir para llevar a cabo el análisis de un componente específico (analito) de una muestra. Cualquier método analítico puede estar constituido por técnicas de separación, extracción, etc. Y por técnicas de medición como espectrofotometría, volumetría, colorimetría, potenciometría, etc. que permiten medir la respuesta del analito en la muestra. A esta técnica se le denomina sistema de medición. (García et al. 2002)

Se pueden clasificar de acuerdo a diferentes criterios, como por ejemplo, por su regulación (Farmacopeicos o no farmacopeicos), por su aplicación (para producto a granel, producto terminado, muestra primaria e indicadores de estabilidad), por la naturaleza de la respuesta analítica (físico-químicos o biológicos) o por su propósito analítico (cuantificación, identificación o para establecer la presencia del analito). (García et al. 2002)

Para garantizar la calidad y fiabilidad de los resultados analíticos obtenidos en los laboratorios, estos deben contar con metodologías analíticas escritas, validadas y aprobadas por el responsable del laboratorio. La validación de las metodologías junto a otras actividades englobadas en el control del aseguramiento de la calidad, permite demostrar a los laboratorios, en general, que sus métodos analíticos proporcionan resultados fiables.

Validar un método consiste en verificar y documentar su validez, es decir, su adecuación a unos determinados requisitos, previamente establecidos por el laboratorio para poder resolver un problema analítico particular. Todos los métodos analíticos deben ser validados utilizando la misma matriz en la que de manera rutinaria se van a realizar los análisis por ejemplo; sangre, suero, tejidos etc. Los parámetros analíticos que deben ser validados son; precisión del sistema y del método, linealidad del sistema y del método, especificidad, exactitud, estabilidad analítica de la muestra, límite de detección, límite de cuantificación, robustez y tolerancia.

Existen normas nacionales e internacionales que detallan los lineamientos que se deben seguir para la validación de un método. A nivel nacional, la NMX-EC-

17025-IMNC-2006 establece los requisitos generales para la competencia en la realización de ensayos y calibraciones, incluido el muestreo. Se aplica a todos los laboratorios que realicen inspección y certificación de productos, o que desarrollen nuevos métodos de investigación.

A nivel internacional, la ISO 8402 clarifica y normaliza los términos relativos a la calidad que sean aplicables al campo de gestión de la calidad, que es definida como “el conjunto de características de una entidad que le confieren la aptitud para satisfacer las necesidades establecidas e implícitas” (Comité Técnico de Normalización Nacional de Sistemas de Gestión de la Calidad y Evaluación de la Conformidad 2006)

4.1 Métodos de extracción

Actualmente existen tres métodos que son ampliamente usados en el bioanálisis para la preparación de muestras: precipitación de proteínas (PPT por sus siglas en inglés), extracción en fase sólida (SPE por sus siglas en inglés) y extracción líquido-líquido (LLE por sus siglas en inglés).

PPT es la técnica más popular debido a su simplicidad y es usada ampliamente en la preparación de biofluidos como plasma, suero y sangre. En esta técnica, un solvente orgánico como acetonitrilo (ACN) o metanol es añadido a la muestra. Posterior a la agitación mediante vortex o centrifuga, el sobrenadante puede ser inyectado directamente al análisis cromatográfico o evaporado y reconstituido con un solvente compatible con la cromatografía que ayude a incrementar la sensibilidad.

4.1.1 Extracción líquido-líquido

La extracción líquido-líquido (LLE) puede ser utilizada para incrementar la selectividad al aislar el analito de las interferencias de la matriz biológica en que se encuentre, o para mejorar la selectividad al concentrar el analito de una muestra muy grande. Existen diferentes modalidades como la extracción simple, que consiste en añadir un solvente orgánico a la muestra, o la extracción múltiple que puede usar el mismo solvente varias veces o diferentes

solventes para extraer el analito de matrices muy complejas. Sin embargo, como cualquier otra técnica manual, involucra mucho trabajo y tiempo invertido, además de que muchos de los químicos utilizados pueden ser dañinos para el operador o para el medio ambiente, además de caros. (Silvestre et al. 2009)

El metanol simple o combinado con otros solventes como el acetonitrilo es el más usado para el tratamiento de drogas básicas como la cocaína. También se utiliza la extracción ácida usando ácido clorhídrico o buffer de fosfatos. Las extracciones metanólicas han probado tener una alta cantidad de compuestos que interfieren con el análisis cromatográfico, mientras que las extracciones acuosas son más limpias; sin embargo, algunas drogas como la heroína y algunos de sus metabolitos son fáciles de hidrolizar. La principal desventaja de las extracciones líquido-líquido es el largo tiempo que deben permanecer en contacto la muestra con el solvente para obtener una buena recuperación. Este tiempo puede ser reducido ampliamente si se utiliza la sonicación o se somete a altas temperaturas. (Sergi et al. 2013)

4.1.2 Extracción en fase sólida

Típicamente, un procedimiento de Extracción en Fase Sólida (SPE por sus siglas en inglés) involucra un número de pasos (acondicionamiento, carga de la muestra y lavado – en el cual, los analitos son retenidos en el cartucho y las interferencias son desechadas y los analitos posteriormente son eluidos). Las condiciones de cada paso deben ser cuidadosamente optimizadas para las interacciones entre matriz, sorbente y analito. Los factores a optimizar incluyen tipo de sorbente, fuerza del solvente, pH, fuerza iónica, volumen del solvente, y el flujo. (Janicka et al. 2010)

La SPE permite aplicar un amplio espectro de cartuchos que pueden separar los analitos de diferentes propiedades, de ácidos a básicos. En la mayoría de los casos, cartuchos de SPE de modo mezclado son usados para el análisis de cocaína y sus metabolitos. El modo mezclado (por ejemplo C4, C8 o C18 con silica de intercambio catiónico) reduce el efecto matriz. A comparación de los cartuchos fase reversa, el modo mezclado es estable a un intervalo más amplio

de pH y genera extractos de mayor pureza y un mejor radio de señal. (Janicka et al. 2010)

En general, todos los estudios involucran los pasos de acondicionamiento del cartucho, añadido de la muestra, elución y lavado. Finalmente, evaporan el residuo y lo redisuelven en la fase móvil a utilizar (en el caso de la cromatografía de líquidos) o se derivatiza (en el caso de la cromatografía de gases). Cabe mencionar que para extraer la cocaína de las matrices se necesitan solventes hidrofílicos polares como el metanol y acetonitrilo principalmente, en donde la cocaína se disolverá con mayor facilidad para ser extraída y posteriormente analizada, materiales que se encuentran muchas veces en todos los artículos estudiados.

4.2 Cromatografía de Gases

La cromatografía de gases (GC por sus siglas en inglés) es una técnica de separación en donde los analitos deben estar presentes en forma gaseosa. La separación de los componentes ocurre cuando la mezcla pasa a través de una fase estacionaria líquida, en donde las drogas presentes se retendrán en forma individual a diferentes extensiones en la fase estacionaria. Se basa en la volatilidad y polaridad de las moléculas y por lo tanto, la capacidad de diferenciación reside en esta fase. El tiempo de retención de un componente está relacionado con el tiempo que tarda en alcanzar el detector desde que fue inyectado. (Barroso & Gallardo 2015)

La GC ha sido por años la técnica de oro para el análisis de drogas en matrices biológicas por su versatilidad y bajo costo, además de su rapidez y sensibilidad al analizar varias clases de compuestos usando la misma fase estacionaria y fase móvil. Sin embargo, una de sus desventajas es la imposibilidad de analizar compuestos termolábiles o la necesidad de derivatización química de fracciones funcionales que involucra mucho tiempo y trabajo en el laboratorio. (Barroso & Gallardo 2015)

Para realizar el análisis, la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica, esto implica que la muestra debe ser volátil y

térmicamente estable. La elución se produce por el flujo de un gas inerte como He, N₂, H₂, aunque de acuerdo con el tipo de detector es necesario emplear otro tipo de gas.

Existen dos tipos: Cromatografía de gas sólido (CGS) y Cromatografía de gas líquido (CGL). La CGL es la más común, se utiliza como fase estacionaria un líquido inmovilizado sobre un soporte sólido inerte, esta fase debe ser estable y no volátil a las temperaturas empleadas en el análisis y de naturaleza similar a las muestras que se desea separar en ella. La aplicación de CGS es limitada a moléculas polares, la fase estacionaria es un sólido sobre el que se retienen los analitos por adsorción.

Los componentes principales de un cromatógrafo de gases son:

- ✓ Gas portador
- ✓ Reguladores de presión
- ✓ Filtros de oxígeno y humedad
- ✓ Inyector, con un sistema de control de temperatura
- ✓ Columna cromatográfica dentro de un horno
- ✓ Detector
- ✓ Sistema receptor, procesador y de almacenamiento de la información

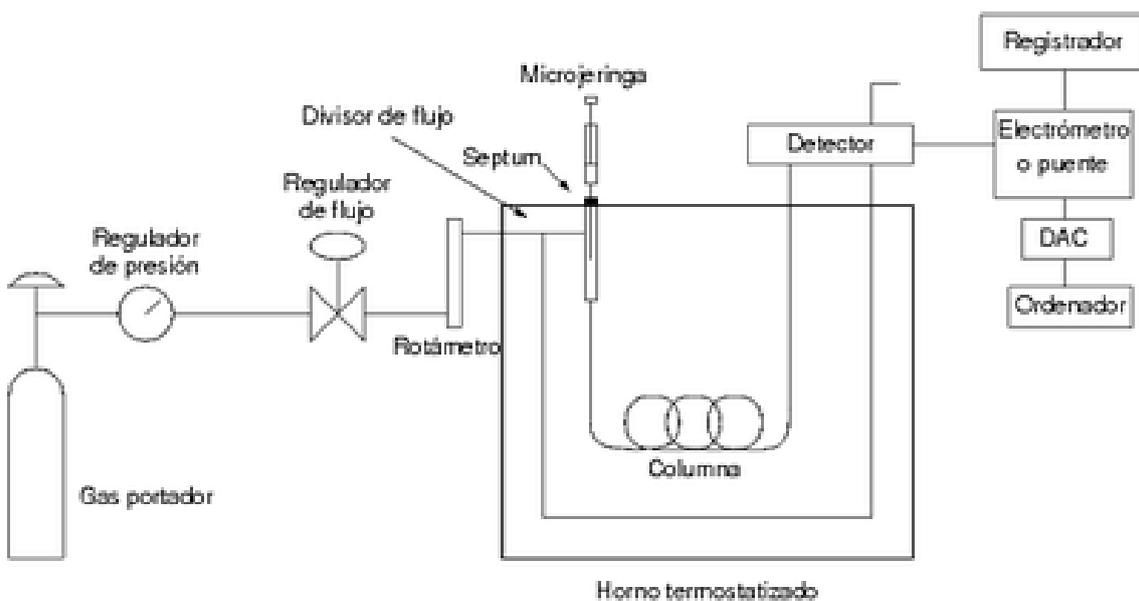


Fig. 5 Esquema básico de los componentes de un cromatógrafo de gases. (Barquero Quirós 2006)

El espectrómetro de masas (MS) es un detector usado con GC y LC. La versatilidad de un GC-MS se debe no solo a la enorme variedad de columnas y técnicas disponibles para la cromatografía de gases, sino también por el gran número de analizadores y métodos de ionización. Además, es un detector universal capaz de reconocer la mayor parte de compuestos orgánicos presentes en la naturaleza y detectar cantidades tan bajas como 10^{-14} g.

Todos los espectrómetros de masas se componen básicamente de tres unidades. Los compuestos son separados por el cromatógrafo y entran a la cámara de ionización donde todas las moléculas son cargadas positiva o negativamente y partidas en fragmentos pequeños. La sección de filtrado de masas separa los iones por tamaño de acuerdo a su radio masa/carga (m/z). Los iones pasan a través de este filtro y son detectados por un multiplicador de electrones, un dispositivo que convierte los iones atrapados en señales eléctricas. Existen diferentes diseños para los filtros de masa. El filtro cuadrupolo consiste en cuatro rodillos cilíndricos cargados alternamente con corriente directa y alterna. Los iones que pasan a través de estos cilindros forman trayectorias, aquellos que son estables logran alcanzar el detector, mientras que los inestables se pierden en la bomba de vacío del instrumento. Variando el voltaje entre los rodillos, las trayectorias de los iones de diferente tamaño son estabilizados. (Wu et al. 2012)

El analizador de masas en cuadrupolo es preferido por las siguientes razones:

- ✓ El diseño simple del instrumento permite realizar los escaneados a velocidades muy altas (menos de 1 segundo por decena)
- ✓ La habilidad de cambiar entre modos de escaneo permite un análisis secuencial de iones positivos y negativos
- ✓ Los analizadores cuadrupolo son relativamente baratos y compactos y requieren menos experiencia para ser operados y mantenidos en buen estado

Algunas desventajas son.

- ✓ Muestran discriminación de masas y son menos sensibles que los instrumentos magnéticos, especialmente a radios m/z de 500 o más

- ✓ El límite de masa que puede manejar la mayoría de ellos es de 2000 m/z, aunque esta última no supone un problema tan grande, pues la mayoría de los compuestos orgánicos no tienen un peso molecular tan elevado

La fragmentación de masas es necesaria para esta técnica para poder confirmar la identidad del componente. Un análisis completo o full-scan se refiere a la creación de un espectro completo que contiene el ion molecular y todos los fragmentos menores. La identidad de la sustancia es determinada mediante la comparación con una base de datos previamente establecida. (Wu et al. 2012)

Existen dos variaciones utilizadas en MS. El modo SIM (Selected Ion Monitoring, monitoreo selectivo de ion por sus siglas en inglés) es el más usado para GC-MS, en donde solo los tres iones más prominentes de un espectro son medidos por el aparato. La abundancia relativa de estos tres iones debe ser igual a los radios previamente establecidos en una base de datos. Si existe un componente que contamine la muestra y tiene el mismo peso molecular que uno de los tres iones objetivos, alterará la relación de los iones e invalidará los resultados de identidad y cuantificación del analito. (Wu et al. 2012)

El modo SRM (Selected Reactive Monitoring, monitoreo selectivo de reacción por sus siglas en inglés) por otro lado, es una variación del modo SIM. Se usa principalmente en cromatografía de líquidos y hablaremos de él más adelante.

La derivatización también es un paso importante en las metodologías analíticas que utilizan GC. Es una técnica empleada para mejorar las propiedades cromatográficas (para mejorar la forma del pico en el cromatograma), mejorar la estabilidad química de compuestos termolábiles, mejorar la volatilidad, reducir tiempos de retención, y para mejorar la sensibilidad de los analitos en ciertos detectores.

Al analizar muestras orgánicas, las columnas GC son requeridas para resolver mezclas complejas de compuestos que varían en peso molecular, composición elemental y polaridad. En adición, estos compuestos pueden variar en concentraciones. Los compuestos polares tienden a arrojar grandes picos acentuados por "colas". En casos extremos, el pico se mezclará con la línea

base o el componente será completamente retenido por la fase estacionaria. Los derivados de los analitos generalmente son menos polares que sus compuestos de origen y de esa manera, su cromatograma mejora. De igual manera, algunos compuestos se pueden rearrreglar o descomponer a altas temperaturas, por lo que la derivatización se usa para brindar estabilidad térmica.

4.3 Cromatografía de Líquidos

La cromatografía de líquidos (LC) es una técnica analítica en donde los componentes separados son distribuidos selectivamente entre dos fases inmiscibles: una fase móvil líquida que fluye a través de una fase estacionaria. La separación es dada por las diferencias de los coeficientes de distribución de los diferentes analitos de la muestra.

La muestra es inyectada en un puerto directo a un flujo de fase móvil empujado por una bomba de alta presión y transportado a través de la columna donde la separación tiene lugar. La eficiencia en la separación está relacionada al tamaño de partícula del material de la fase estacionaria. Se requiere una mayor presión si el tamaño de la partícula disminuye.

La eficiencia en la separación está relacionada con el tamaño de partícula de la fase estacionaria. Una presión mayor es necesaria cuando se reduce el tamaño de la partícula.

Los diferentes tipos de cromatografía líquida se pueden clasificar de diferentes maneras, pero la forma más habitual de clasificación es realizada con base a la naturaleza de la fase estacionaria, ya que ésta es la que impone fundamentalmente el mecanismo de separación; de este modo, se pueden enumerar cuatro tipos de técnicas:

- a) Cromatografía de adsorción (líquido-sólido): la fase estacionaria es un adsorbente y la separación se basa en repetidas etapas de adsorción-desorción

- b) Cromatografía de reparto/adsorción (fases ligadas químicamente): la separación en este caso, se basa en un reparto del soluto entre la fase móvil y la fase estacionaria)
- c) Cromatografía de intercambio iónico: Este tipo de cromatografía se da cuando la fase estacionaria presenta en su superficie grupos ionizados capaces de retener selectivamente a iones de signo contrario que circulan en la fase móvil.
- d) Cromatografía de exclusión molecular: La fase estacionaria es un material poroso de tamaño controlado que permite la entrada de ciertas moléculas de manera selectiva, dejando fuera otras de mayor tamaño.

El mecanismo de retención en los dos primeros casos es similar, variando únicamente el tipo de interacciones que se producen y cual de ellas es la predominante; por esta razón, en la práctica se realiza otra división de los dos primeros tipos de cromatografía atendiendo a la polaridad de la fase estacionaria:

- a) Cromatografía de fase normal: La fase estacionaria presenta puntos activos de polaridad y las interacciones que se producen con el soluto son específicas del grupo activo. La fase estacionaria puede ser un sólido adsorbente (sílice o aluminio) o bien, un soporte al que se unen químicamente moléculas orgánicas que presentan grupos funcionales de alta polaridad
- b) Cromatografía de fase reversa (inversa): La fase estacionaria tiene una base apolar (cadenas hidrocarbonadas, grupos fenilo) y las interacciones que se producen son inespecíficas. (Hernández 2007)

Los componentes básicos de un cromatógrafo de líquidos que se muestran en la figura 6 son:

- Dispositivo de suministro de eluyentes (bomba y dispositivo de mezclado de eluyentes)
- Dispositivo de inyección
- Conducciones y conexiones
- Detector y registrador
- Columna

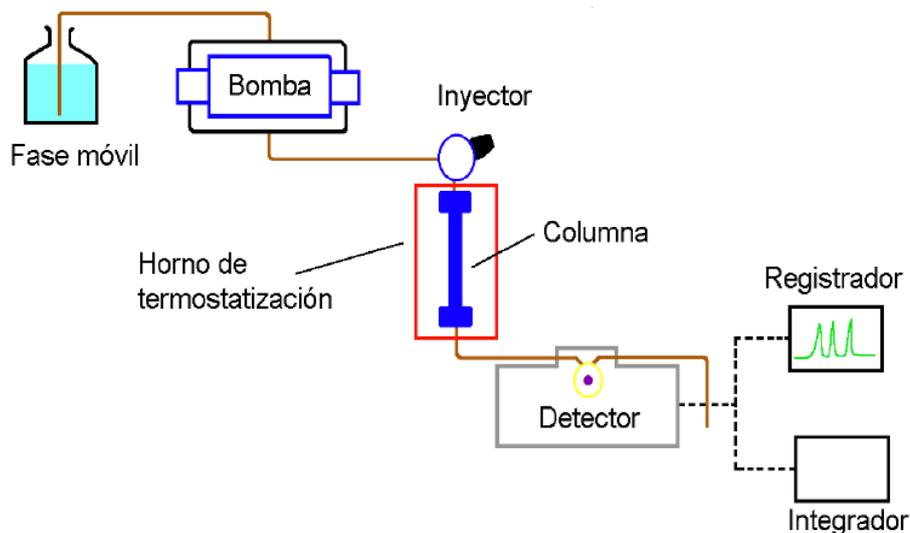


Figura 6. Componentes de un cromatógrafo de líquidos (Hernández 2007)

La LC permite analizar la mayoría de los compuestos sin derivatización y acortar el tiempo de análisis. Además, esta característica sumada a la selectividad y sensibilidad en el bioanálisis han convertido a la LC en la técnica de oro de múltiples sustancias en muestras biológicas. Sin embargo, en lo que concierne a las desventajas, la LC es mucho más susceptible a verse afectada por el efecto matriz que puede causar supresión de ion o fenómeno de mejora, que son capaces de perjudicar la interpretación del espectro de masas y la precisión y exactitud del método. Por lo tanto, estudiar y documentar el matriz es obligatorio en la validación del método.

El principal método de análisis en LC-MS/MS es el modo SRM, una variante del SIM. El primer MS produce iones progenitores que pueden ser individualmente seleccionados para ingresar al segundo MS, donde son fragmentados y ordenados de acuerdo a su radio masa carga (m/z). Los iones “hijos” son seleccionados y relacionados a los iones progenitores. Por lo tanto, los iones detectados en el segundo MS necesariamente deben tener un origen en el primer MS. De esta manera, la especificidad de la LC es mayor que en la GC.

5. Metodología de investigación

En el anexo 1 se encuentran los artículos analizados en este trabajo, ordenados según la figura 6:

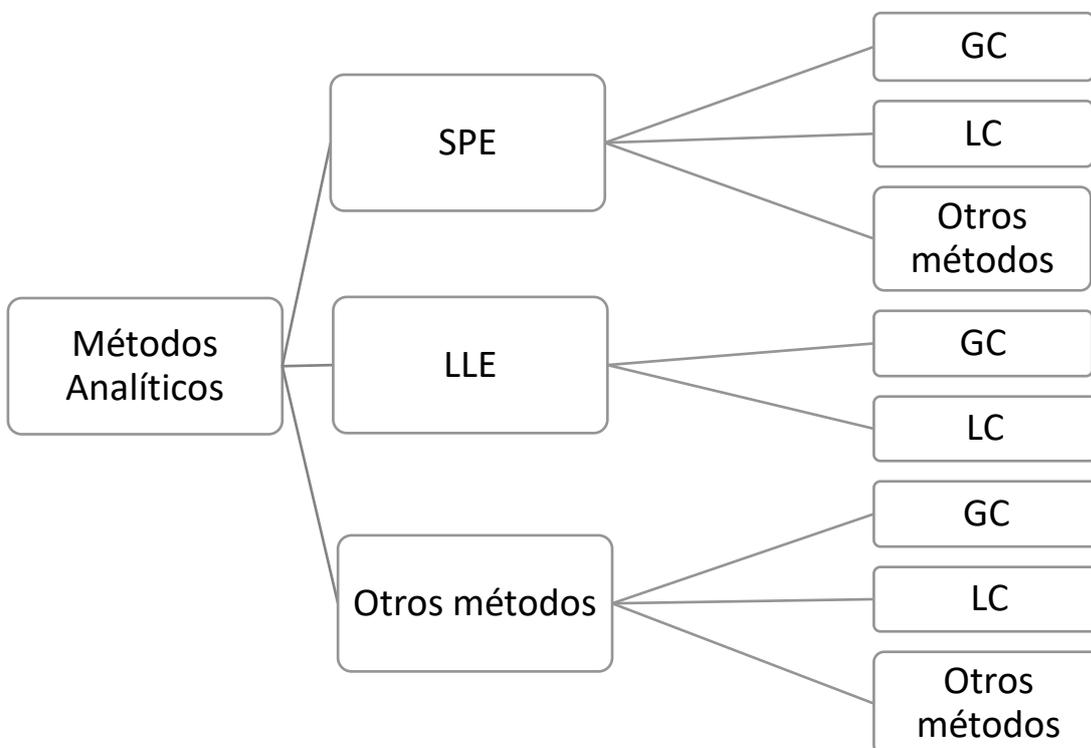


Fig. 7 Esquema de orden de los artículos revisados en el presente Tema Monográfico de actualización

Cada artículo presente va en el mismo orden en el que aparecen las tablas. Se analiza si modificó algún procedimiento con respecto al método de trabajo tradicional o si propone algún nuevo método que mejore los parámetros de detección de las drogas. De igual manera se comparan los límites de detección y cuantificación para cada matriz para determinar si un método es mejor que otro.

Agius (Agius 2014) utilizó una técnica ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas por sus siglas en inglés) para determinar la presencia de drogas en las muestras de cabello previamente tratadas y confirma con cromatografía de gases, usando una columna capilar ZB-5 recomendada para detectar cantidades muy pequeñas de muestra. Su estudio se enfoca principalmente en determinar si existe o no una diferencia

significativa en la cuantificación de cocaína en el cabello natural y el cabello tratado con algún tipo de colorante artificial o tinte, llegando a la conclusión de que la diferencia no es significativa sin importar el color de tinte que se use.

En el segundo estudio (Agius & Nadulski 2014) utiliza el mismo procedimiento de GC para confirmar los resultados de la ELISA practicada a muestras de orina y cabello. En ambos casos, lo que propone es el uso de una prueba ELISA modificada para monitorear pacientes en terapia de prevención de consumo de drogas como una técnica más sencilla, barata, rápida e in situ, para evitar todo el procedimiento que implica una cromatografía. Su límite de detección es de 4 picogramos, siendo el estudio con LOD (Límite de detección) más bajo.

Aleksa (Aleksa et al. 2012) propone como alternativa para analizar muestras pediátricas la SPME (microextracción en fase sólida por sus siglas en inglés). Consiste en disminuir los volúmenes de solventes utilizados al orden de microlitros, ya sea por la poca muestra disponible o como forma de ahorrar materiales y no contaminar el ambiente. Esto permite encontrar límites de detección hasta de 0.4 nanogramos.

Fucci (Fucci et al. 2014) también usa la SPME para detectar levamisol como contaminante en muestras de cabello. El levamisol tiene propiedades inmunoestimulantes e inmunomoduladoras, por lo que se usa como agente para tratar desórdenes inmunológicos. Sin embargo, su uso como adulterante en drogas no está completamente claro. Utilizar la técnica de SPME permite detectar la contaminación a nivel de trazas por los límites de detección tan bajos que se pueden encontrar con esta técnica.

Gouveia (Gouveia et al. 2012) se encarga de detectar cocaína y morfina en cabello mediante una GC con ionización por impacto de electrones como método alternativo en Portugal, debido a que en ese país es obligatorio realizar un test antidroga mensual si se es participante de programas de desintoxicación para poder demostrar que ya se está completamente limpio y poder ser dado de alta. La fuente de ionización usada permite encontrar áreas más pequeñas y picos más precisos. Los límites de detección y cuantificación son del orden de 10 y 30 picogramos respectivamente.

López-Guarnido (López-Guarnido et al. 2013) propone modificar los criterios por los cuales se acepta como positiva una prueba de cocaína en cabello para disminuir la incidencia de falsos positivos provocados por la contaminación de las muestras de cabello. Dicho criterio consiste en tomar en cuenta no solo el LOD o el LOQ sino en determinar una relación entre cocaetileno y cocaína y que este valor sea mayor a 0.02, que puede ser considerado como un marcador metabólico y no como una simple contaminación.

Míguez-Framil (Míguez-Framil et al. 2011) trabaja con una técnica denominada ionización por electrospray (ESI Electrospray Ionization por sus siglas en inglés) en donde el analito se disuelve en un solvente más volátil dentro de un capilar. El líquido sale de este capilar debido a la repulsión de cargas eléctricas y forma un aerosol, hasta que la repulsión de dichas cargas logra vencer la tensión superficial y entonces las gotas estallan, de modo que los iones formados están libres de solvente y se mueven hacia el detector. Este método ofrece alta sensibilidad, especialmente en componentes como la cocaína y sus metabolitos que son solubles en disolventes no polares. El tiempo de análisis también se reduce significativamente (90 segundos) lo que permite incrementar el número de muestras analizadas. Sus LOD y LOQ son muy bajos, de 2.1 ng/g y 3.5 ng/g, o lo que es lo mismo, 2.1 pg/mg y 3.5 pg/mg, respectivamente, lo que muestra un método muy sensible.

Pritchett (Pritchett & Phinney 2015) investiga si existe diferencia en la detección de drogas en el cabello de mujeres que usan productos para fortalecerlo. Su estudio *in vitro* sugiere que la naturaleza muy alcalina del tratamiento afecta la estabilidad de la droga en el cabello, mediante una descomposición e hidrólisis, por lo que las cantidades medidas se ven reducidas drásticamente. Sin embargo, no reporta ninguna validación sobre su método.

Tassoni (Tassoni et al. 2014) reporta los resultados de años de trabajo de analizar muestras de cabello de conductores en Italia que fueron despojados de su licencia de manejo tras ser sorprendidos manejando bajo el efecto de drogas.

Ottaviani (Ottaviani et al. 2017) prueba una matriz diferente como los dientes, en una muestra post-mortem como alternativa a la ausencia de orina o sangre.

Utiliza la misma técnica de lavado de cabello pero aplicada a esta matriz y obtiene buenos valores de LOD y LOQ en su validación.

Agius (Agius & Nadulski 2014) trabaja con su ELISA como se mencionó anteriormente, ahora en orina, en donde trabaja con LOD y LOQ del orden de 0.3 y 2.5 ng/mL.

Rosado (Rosado et al. 2017) propuso una variación en la extracción denominada MEPS: Microextraction by Packed Sorbent (Microextracción por sorbente empacado por sus siglas en inglés). La principal diferencia con la SPE tradicional es la preparación de la muestra (en miniatura) y la posibilidad de una mayor variedad de fases estacionarias, además de no poder reutilizar los solventes como si lo permite una micro SPE tradicional. Sin embargo, la principal ventaja de este método es que permite acortar el tiempo de trabajo a 15 minutos y la derivatización a 120 segundos.

Alvear (Alvear et al. 2014) propone trabajar con muestras post-mortem que sean diferentes a las tradicionales. Toma muestras de un hombre de 22 años que presumiblemente murió por suicidio después de consumir drogas, por lo que usa orina, sangre femoral, sangre arterial, fluido cerebro-espinal, núcleo accumbens, área tegmental ventral del cerebro e hígado. Esto abre una ventana de oportunidades para la ciencia forense en la posibilidad de utilizar diferentes matrices para la detección de drogas aun cuando el sujeto de estudio haya fallecido. Su estudio es validado y obtiene límites de detección y cuantificación del orden de nanogramos.

Pelição (Pelição et al. 2014) busca simplificar la extracción de cocaína de la sangre usando una extracción ácida y otra básica de un solo paso. Sin embargo, los LOD y LOQ obtenidos son muy elevados en comparación con otros estudios: 5 y 10 ng respectivamente.

Gentili (Gentili et al. 2016) propuso el uso de sudor como matriz biológica. Expuso a varios pacientes a correr mientras absorbía el sudor generado para el análisis por medio de unos pads absorbentes. Sin embargo, esta matriz solo permite resultados cualitativos, no cuantitativos, toda vez que no se puede determinar la cantidad de sudor emitido por el sujeto de prueba. De igual manera, el tratamiento preanalítico de la muestra resultó difícil y largo.

Lerch (Lerch et al. 2014) busca automatizar el proceso de SPE para ahorrar tiempo y trabajo. Compara con una GC hecha tradicionalmente y determina que entre un método y otro existe una SD menor al 10%

Ellefsen (Ellefsen et al. 2014) utiliza como matriz el aliento para detectar BZE y EME. Sin embargo, solo se usa para detectar un consumo reciente y no crónico y no propone ninguna manera de discernir entre consumo y contaminación de la muestra. Su validación arroja LOD de 0.015 ng y LOQ de 0.025 ng, siendo límites muy bajos en comparación con otras matrices.

Domínguez-Romero (Domínguez-Romero et al. 2011) prueba tres diferentes tipos de extracción de la droga en cabello antes del análisis en LC: metanólica directa con sonicación, ácida y alcalina. La extracción ácida la realiza con ácido clorhídrico y un paso de SPE. La alcalina la realiza con NaOH que deshace completamente la matriz y deja muy sucio el extracto, por lo que también realiza un paso adicional de SPE. Por otro lado, la extracción metanólica, como su nombre lo indica, utiliza metanol para la digestión de la muestra y es la que obtiene un extracto más limpio y mejor porcentaje de recuperación, por lo que se elige como el método preferido para el análisis cromatográfico. Posterior a la validación, se aplica en muestras reales. Sus LOD y LOQ son del orden de 5 y 15 picogramos.

Favretto (Favretto et al. 2011) cuantifica diversas drogas como anfetaminas, opioides y benzodiazepinas en cabello pulverizado. El tiempo de detección es ligeramente largo, 40 minutos, y sus límites de cuantificación y detección son similares a otros estudios. La ventaja que ella propone es eliminar la hidrólisis del cabello previo a la SPE para ahorrar materiales. Además, utiliza HRMS, que es una variación de la MS común. La HRMS permite la detección de masas de hasta 0.001 unidades atómicas de masa.

Fernández (M. D. M. R. Fernández et al. 2014) analiza simultáneamente 33 drogas diferentes usando HPLC de una manera tradicional, pero tratando de automatizar la extracción para agilizar el proceso de detección de sustancias ilícitas.

Imbert (Imbert et al. 2014) trabaja con anfetaminas, opioides y cocaína. Especifica un par de casos donde la droga fue encontrada en diferentes

segmentos del cabello, lo que prueba la teoría del análisis segmental, y que permite estimar el tiempo del consumo. Tiene buenos límites de detección que van de los 5 a los 30 picogramos.

Ropero-Miller (Ropero-Miller et al. 2012) evalúa las concentraciones de cocaína en diversos tipos de cabello usuarios adictos, usuarios bajo tratamiento y cabello contaminado con diversos métodos. Establece que las concentraciones de cocaína no permiten establecer diferencias entre una y otra fuente, pero los metabolitos encontrados sí. Establece relaciones entre tres metabolitos: norcocaína, benzoilecgonina y cocaetileno, encontrando que cada tipo de cabello presenta una relación específica, lo que permite diferenciar entre una fuente y otra.

Schaffer (Schaffer et al. 2016) realiza un trabajo similar, al buscar metabolitos orto, meta y para-hidroxi-cocaína para disminuir la incidencia de falsos positivos, ya que al ser polares, se eliminan fácilmente con el lavado previo y por lo tanto, sólo se encuentran en usuarios de la droga. Su método, sin embargo, no está validado.

Sergi (Sergi et al. 2013) propone una extracción líquida bajo presiones y temperaturas altas (PLE: Pressurized Liquid Extraction), para poder reemplazar los solventes orgánicos por agua. Este método se utiliza generalmente para extraer metales del cabello, pero se adaptó para el análisis de varias clases de drogas. Una vez realizada la extracción bajo presión, se limpia el residuo con una SPE y se valida el método, obteniendo límites de detección y cuantificación del orden de picogramos. Un doble procedimiento de extracción puede explicar que se haya detectado una cantidad tan baja de la droga, toda vez que su estudio fue validado.

Mella (Mella et al. 2017) utilizó hueso como matriz para análisis. Debido al tipo de muestra, son pocos los estudios reportados. Es útil cuando el cuerpo lleva tiempo en descomposición que no permitan usar otra matriz como cabello. Sin embargo, este artículo no presenta validación, solo presenta diversos casos en donde el método fue utilizado con éxito.

Bujak (Bujak et al. 2016) propone el uso de polímeros impresos sintetizados molecularmente para la extracción selectiva de cocaína y su metabolito

principal, la benzoilecgonina (BZE) de muestras de orina de voluntarios sanos. La atropina y la escopolamina son similares estructuralmente a los analitos, además de ser baratos, por lo que son elegidos para la experimentación. Se unen a un solvente y a un monómero para crear una columna apta para la extracción, por lo que se considera una SPE. Sin embargo, el método no fue validado en este artículo, por lo que no se tiene información apropiada de límites de detección y cuantificación para este método. Solo se considera el porcentaje de recuperación de los analitos puros que fueron añadidos a la matriz biológica, que varían del 60 al 80%.

Daems (Daems et al. 2015) busca una alternativa a la UPLC clásica, al sustituir la MS en tándem mediante el uso de un detector potenciométrico Posterior a una validación, confirma que es posible predecir la sensibilidad y el radio de respuesta de los sensores potenciométricos mediante la determinación de los valores de K_d .

Fernández (M. del M. R. Fernández et al. 2014) busca automatizar el proceso de SPE, al analizar hasta 23 drogas diferentes en muestras de orina. La importancia de este trabajo radica en que los módulos del sistema automático son seleccionados para seguir el orden correcto de adición de sustancias que permitan la correcta extracción de las drogas de la matriz biológica.

Li (Li et al. 2013) también usa HPLC combinado con HRMS para identificar isómeros, fragmentos, interferencias, y hasta identificar moléculas que no existan en la base de datos. Debido a esto, puede ser usada como prueba screening y confirmatoria al mismo tiempo. Su preparación es rápida, pero tiene un costo elevado por el tipo de equipos que utiliza.

Sánchez-González propone una extracción en fase sólida a través de una membrana porosa usando un polímero molecular impreso para aumentar la selectividad en un volumen pequeño de muestra. Primero se encarga de optimizar el método en orina (Sánchez-González et al. 2015), y además, mejora aún más su eficiencia agregando nanopartículas encapsuladas de magnetita, Fe_3O_4 , cuyas propiedades magnéticas separan más fácilmente las partículas del polímero de la muestra posterior a su elución y eliminando pasos de filtración y centrifugación. (Juan Sánchez-González et al. 2016) Aunque éste

último método disminuye tiempo de experimentación, también arroja límites de detección y cuantificación ligeramente más altos que los métodos que no utilizan estas partículas magnéticas, y aunque no lo mencione, probablemente aumente el costo del análisis.

Snozek (Snozek et al. 2012) presenta un artículo sencillo, sin nada nuevo para innovar. Tampoco reporta validación.

Sundstrom (Sundström et al. 2013) utiliza HPLC con un detector TOF (Tiempo de vuelo, Time of flight por sus siglas en inglés). En un analizador de este tipo, un grupo de iones son acelerados por un potencial hacia un campo linear dentro de un tubo. El tiempo de vuelo necesario para que un ion con un radio m/z específico alcance el detector es medido. Para evitar la llegada simultánea de iones al analizador, es requerido introducir los iones mediante pulsos. Esta frecuencia puede ser mucho más alta si se trabaja con una trampa de iones. Algunas de sus características son.

- ✓ Alta transmisión de iones
- ✓ Capacidad rápida de adquisición de espectro: a diferencia del cuadrupolo, el espectro no se adquiere mediante escaneo. Los espectros de los diferentes iones son acumulados como eventos, el espectro resultante integra de 4 a 10 diferentes espectros como un promedio.
- ✓ Rango de masa ilimitado.

El estudio propone buscar drogas sintéticas que no han sido evaluadas antes, junto con las drogas de abuso tradicionales en una sola corrida del experimento. Este método, debido a su alta sensibilidad, permite detectar cantidades muy bajas de las sustancias a un tiempo muy bajo (menos de un minuto de análisis) para actualizar la base de datos.

Xiong (Xiong et al. 2013), al igual que Sundstrom, utiliza HPLC con TOF combinándolo también con SPME. En principio, esperaríamos que sus límites de detección y validación fueran muy bajos al combinar métodos tan sensibles, pero al revisar sus datos de validación, encontramos que estos valores son similares al resto de trabajos revisados, 0.5 ng/mL y 2.5 ng/mL respectivamente.

Yang (Yang et al. 2017) utilizó una SPE modificada con partículas de Fe₃O₄ que actúan como partículas magnéticas dispersivas para permitir una mejor separación de la droga. Poseen una alta capacidad de dispersión, bajo consumo de solvente, operación fácil y disminuye el efecto matriz.

Ellefsen (Ellefsen et al. 2016b) identifica las relaciones entre aspectos farmacodinámicos tras la ingesta de cocaína vía intravenosa y la disposición plasmática. Lo relevante de su artículo es que también lo hace en saliva, algo que no se había estudiado hasta entonces.

Mascini (Mascini et al. 2013) utiliza el modelado molecular o docking para crear un compuesto molecular que sea más eficaz que las columnas comerciales de SPE, con la propuesta de que péptidos pequeños pueden ser creados imitando los sitios de unión de moléculas más grandes, para no gastar tiempo, dinero y materiales en la experimentación directa. Utilizando programas computacionales y bases de datos fue posible crear un compuesto que tuviera la mayor afinidad con la cocaína y su metabolito, la benzoilecgonina, logrando obtener 3 complejos de anticuerpos contra la cocaína y una proteína de anclaje acoplada a la droga. Una vez realizados experimentos virtuales para imprimir el polipéptido, se añadieron a una resina para llevar a cabo la SPE de muestras de plasma humano, obteniendo hasta un 80% de recuperación del analito.

Sánchez González (J. Sánchez-González et al. 2016) realiza el mismo estudio descrito anteriormente de usar polímeros moleculares impresos pero ahora en plasma, obteniendo valores de LOQ de 61 pg/mL y LOD de 200 pg/mL, siendo los valores más bajos obtenidos en esta matriz.

Di Rago (Di Rago et al. 2016) busca crear un método basado en LC que permita cubrir un amplio rango de drogas de abuso en saliva, que permita acelerar la carga de trabajo mientras se vigilan otros componentes de interés epidemiológico. Combinando volúmenes de muestra pequeños, un procedimiento de extracción simple y un análisis rápido y automatizado, se pueden detectar hasta 40 diferentes drogas. Aunque presenta datos de validación, no reporta un LOQ ni LOD.

Montesano (Montesano et al. 2015) busca innovar realizando un estudio de drogas en saliva utilizando una técnica denominada Microextraction by packed

sorbent (microextracción por sorbente empacado, MEPS por sus siglas en inglés), que es como una miniaturización de una SPE; el material sorbente es reducido a miligramos y empacado en una jeringa y siguiendo los pasos de una SPE tradicional (acondicionamiento, elución, lavado). Se utiliza como una alternativa para el estudio en saliva debido a su viscosidad y por la limitada cantidad de muestra que se puede obtener. Se optimizó modificando la cantidad de metanol añadida para la elución y modificando el pH que afecta considerablemente el volumen de droga recuperado. Fue posible realizar hasta 100 ciclos de extracción con la misma jeringa, por lo que otra ventaja de esta técnica es el ahorro económico y de solventes. Se validó el método propuesto obteniendo límites de detección y cuantificación comparables a los obtenidos con una SPE tradicional.

Bidny (Bidny et al. 2017) utilizó una UPLC para evaluar la efectividad de diversos cartuchos de SPE del mercado, según la naturaleza química de las drogas (ácidas, básicas o neutras) en la sangre, presentando un comparativo sobre cuál cartucho era mejor para la naturaleza de las drogas.

Birkler (Birkler et al. 2012) busca establecer un método que utilice LC con TOF/MS para detectar un amplio rango de drogas y medicamentos de hasta 46 sustancias, y aplicarlo en 55 muestras toxicológicas y forenses de muestras de conductores detenidos bajo la sospecha de manejar con drogas, y también demostrar la importancia de estos análisis en ataques sexuales registrados en Dinamarca. Su método es validado y solo presenta un LOQ de 0.4 ng/mL.

Bjork (Bjork et al. 2013) presenta un trabajo en donde cuantifica 31 diferentes drogas en sangre mediante un proceso automatizado utilizando un aparato denominado Tecan capaz de manejar todas las unidades de operación en una simple preparación. Se corrieron 96 diferentes muestras en un tiempo menor a 3 horas, lo que arroja un promedio de 6.5 minutos por muestra, lo que demuestra una reducción considerable al tiempo normal de trabajo humano. Su artículo presenta un LOQ de 10 pg/mL, un número bajo a comparación de otros métodos que trabajan con sangre.

Chen (Chen et al. 2017) validó un estudio en ratas previo a la evaluación de cocaína con alcohol (reportado en otro estudio). Simplifica la SPE a un solo paso con el uso de sangre completa para la evaluación de la droga.

Guale (Guale et al. n.d.) presentó un estudio en el que utiliza la LC con TOF/MS como método de screening para detectar otros compuestos en muestras de usuarios de drogas. Una de las ventajas del detector de TOF es que permite identificar molecularmente compuestos desconocidos, por lo que es muy útil cuando se trabaja con muestras bajo sospecha de uso de drogas sintéticas o modificadas. Su estudio no presenta validación pero trabaja con porcentajes de recuperación y efecto matriz.

Pedersen (Pedersen et al. 2013) trabaja también con un detector TOF-MS pero solo alcanza un LOD de 1 ng/mL en sangre. Es el valor más alto de LOD de los trabajos que usan SPE con LC en sangre. A pesar de que utiliza la misma plataforma que otros trabajos, un aparato Tecan, intenta abarcar muchas más sustancias: 256 en total. Es probable que el análisis estadístico no fuera el apropiado para tantas muestras.

Rosano (Rosano et al. 2014) trabaja con 16 analitos diferentes en muestras de sangre postmortem con UPLC-HRMS. Y lo compara contra UPLC-TOF/MS y con UPLC-MS/MS tradicional. Llega a la conclusión de que TOF provee una cuantificación más precisa, pero HR tiene la mejor selectividad y que puede ser la mejor alternativa para ser implementado como método de screening en el análisis forense.

Baciu (Baciu et al. 2015) utiliza una SPE tradicional pero acoplado a una electroforesis capilar, que típicamente se usa en conjunto con una LLE, pero tiene el inconveniente de utilizar un volumen muy grande de solventes. Así, la electroforesis capilar con detector de diodos (Capillary Electrophoresis-Diode Array Detector, CE-DAD por sus siglas en inglés) acoplada a SPE permite reducir el tiempo de trabajo global. La SPE fue optimizada probando diferentes polímeros hidrofílicos, el volumen de elución con diferentes gradientes de metanol y ácido acético. Después de su validación, se probó en muestras de cabello de pacientes en tratamiento de adicciones.

Bynum (Bynum et al. 2014) utiliza una técnica llamada Desorción térmica de láser de diodo (LDTD, Laser diode Thermal Desorption, por sus siglas en inglés). En esta técnica, una pequeña cantidad de muestra, típicamente 2 μL , en un plato de 96 hasta 384 pozos. Después de que se evapora el solvente, un diodo láser infrarrojo calienta la base de acero del plato, transfiriendo el calor a la muestra seca. El analito es evaporado a moléculas en fase gaseosa que son transportadas junto con moléculas de agua del gas acarreador hacia un tubo de transferencia y hacia una corona de descarga para ser sometido a una ionización química bajo presión atmosférica (APCI atmospheric pressure chemical ionization por sus siglas en inglés) como se muestra en la figura 8. Esta tecnología de punta tiene la capacidad de disminuir significativamente el tiempo de análisis, así como el costo de los análisis en los laboratorios forenses. Dado que es un instrumento suplementario de una técnica existente como lo es la MS, es más eficiente su implementación que modernizar con una nueva plataforma de MS.

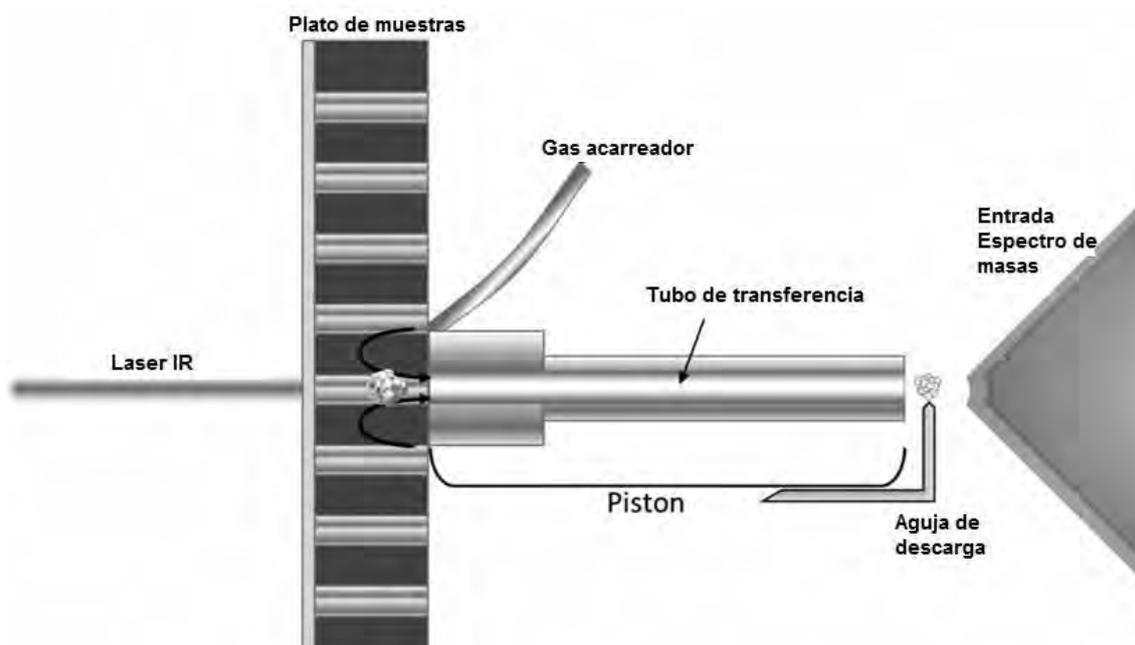


Fig. 8. Esquema de un sistema de LDTD (Bynum et al. 2014)

Sus ventajas incluyen:

- ✓ Instalación rápida
- ✓ Poco entrenamiento en el uso
- ✓ No se requiere software adicional

- ✓ Mantenimiento mínimo
- ✓ No necesita solventes o consumibles especiales

Por otro lado, algunas de sus desventajas son.

- ✓ Destrucción de la muestra
- ✓ Inconsistencias asociadas a manejo manual
- ✓ Picos erróneos debido a interferencias de la matriz y al proceso de desorción
- ✓ Dificultad de analizar isómeros por la ausencia de cromatografía

Posterior a la validación del método, reporta un LOD de 0.5 ng/mL en sangre y orina, un valor no tan bajo como otros reportados en la misma matriz, aunque el método sea innovador.

Chantada-Vázquez (Chantada-Vázquez et al. 2016) propone el uso de un receptor fluorescente modificando una superficie de polietilenglicol con el uso de polímeros moleculares impresos (MIP por sus siglas en inglés) modificando puntos cuánticos con Mn y ZnS para aumentar la afinidad por la droga. Su estudio logra eliminar el efecto matriz de la muestra y tiene una buena sensibilidad, llevando sus LOD y LOQ a 76 µg y 14 µg respectivamente.

Hezinova (Hezinova et al. 2012) utiliza electroforesis capilar acoplada a ionización por electrospray (CE-ESI-MS) para analizar cocaína y sus metabolitos en orina. Su alta eficiencia en la separación y la resolución, el tiempo de análisis, el bajo consumo de reactivos así como su selectividad y sensibilidad hacen de la electroforesis capilar una técnica en auge en el análisis forense. Se investigan diferentes parámetros como el pH del buffer, presión, tipo de capilar y composición del spray líquido. El método se valida reportando un LOD de 5 ng/mL, un valor cercano a los otros reportados en la misma matriz.

Rodríguez-Lafuente (Rodríguez-Lafuente et al. 2013) combina SPME con análisis directo en tiempo real (DART, Direct Analysis in Real Time por sus siglas en inglés), Se basa en las interacciones que ocurren a presión atmosférica entre electrones de átomos excitados por los gases atmosféricos. Un gas (típicamente Nitrógeno o Helio) fluye a través de una cámara donde

una descarga eléctrica produce iones, electrones y átomos y moléculas en un estado excitado. La mayoría de estas partículas son removidas mientras el gas corre a través de lentes perforados o rejillas y solo las moléculas neutrales permanecen. El grado de fragmentación puede ser influenciado por el tipo de gas, la temperatura y los orificios establecidos en las rejillas. Se usa como alternativa para evitar solventes o presiones elevadas en los análisis tradicionales. La muestra no es expuesta a voltajes altos, láser o radiación de ningún tipo. Sin embargo, al ser un método de recién descubrimiento, los materiales pueden ser caros y no estar disponible. Su artículo sólo se enfoca en aplicar el SPME para mejorar la extracción de analitos de orina.

Christodoulides (Christodoulides, De La Garza, Simmons, McRae, Wong, Newton, Smith, et al. 2015) desarrolla un biochip programable (p-BNC programable bio nanochip por sus siglas en inglés), para la detección y cuantificación de hasta 12 drogas de abuso en saliva. Sin embargo, su artículo solo presenta las instrucciones y algunos ejemplos de cómo funciona el chip, pero no muestra ninguna validación ni la comprobación que utiliza.

Dana (Dana et al.) Utilizó espectroscopía Raman de superficie mejorada. Dicha mejora consiste en la amplificación de la luz por la excitación de superficies plasmonicas resonantes localizadas (LSPRs, Localized Surface Plasmon Resonances). Esta concentración de luz ocurre en las brechas o puntas de los materiales plasmonicos, que son tradicionalmente nobles y de metal (plata, oro, etc.). Estas estructuras fuertes y que son capaces de mejorar el campo electromagnético son los mejores para el SERS. Dependiendo de la estructura de estos materiales será la mejora para la espectroscopía. Hay que recordar que la espectroscopía Raman convencional mide la intensidad de la radiación como una función de la frecuencia (o del número de onda). En este artículo, se utiliza la técnica SERS para medir la cocaína en saliva, modificando varios aspectos como probar plata y oro como metal activo, pre-concentración de la muestra y extracción de la matriz. Su método no presenta validación

Antelo (Antelo-Domínguez et al. 2013) hace una comparativa entre la técnica convencional de SPE y la técnica conocida como Dried Blood Spot (Punto de sangre seca, DBS por sus siglas en inglés) que, como se había explicado anteriormente, se utiliza principalmente en las pruebas de screening

metabólicos en neonatos y consiste en obtener una muestra de sangre, y difundirla sobre filtros estandarizados de tamaño pequeño y dejarla secar con la finalidad de retener los componentes mayores de la sangre sobre el filtro y extraer el analito para su análisis. Sus ventajas principales son la baja cantidad de muestra que se necesita (20 μ L), la rapidez y facilidad de la técnica, así como el volumen de disolvente y la automatización. Una vez validado el método, se puede concluir que la técnica de DBS mejora los resultados obtenidos con la SPE tradicional y reduce el costo y el tiempo de los estudios.

Breidi (Breidi et al. 2012) propone un método de GC en donde no se use derivatización, sino enzimas, para disminuir el tiempo de análisis y los costos. Para ello utilizó dos métodos de digestión enzimática sobre la droga, con Proteinasa K y con NaOH. El porcentaje de recuperación con la proteínasa tras la digestión fue del 95%, sin embargo, con NaOH fue del 62%. Una de las probables explicaciones para ello es que la droga es degradada por las condiciones tan básicas del medio. Esta propuesta obtiene límites de detección muy bajos, lo cual prueba ser una buena alternativa para disminuir costos y mejorar la sensibilidad y estabilidad de la prueba.

Gambelunghe (Gambelunghe et al. 2015) busca establecer un patrón de distribución de norcocaína y cocaetileno en los diferentes tipos de coloración de cabello. Establece en sus conclusiones que el cabello castaño o negro tiende a retener más cocaína que otros colores, aun cuando sea por contaminación y no por ingestión, debido a la afinidad de la cocaína por la melanina, proteína presente en el cabello responsable de la coloración. Por ello, es preferible usar los metabolitos como marcadores biológicos y no la molécula de cocaína como tal.

Pego (Pego et al. 2017) utilizó la Liquid Phase Micro Extraction (LPME; Micro extracción en fase líquida por sus siglas en inglés) en donde utiliza una fibra de 9 cm de polipropileno en éter de dihexilo. Con ello propone una alternativa a la SPE con bajo costo y una menor cantidad de muestra usada.

Silveira (Silveira et al. 2016) trabaja con leche materna y utiliza una variación de LLE, denominada Liquid Phase Micro Extraction (Micro Extracción en Fase Líquida, LPME por sus siglas en inglés), que elimina las desventajas de la LLE

tradicional, al usar volúmenes mucho más pequeños de solventes (generalmente menores a los 100 μL), lo que disminuye los tiempos de análisis y el volumen de muestra requerido, además de aumentar la concentración del analito en estudio. De igual manera, permite que su proceso pueda ser automatizado, lo que permite analizar un mayor número de muestras en menor tiempo y disminuye el riesgo para el analista. Este proceso requirió una curva de ajuste de pH óptimo, así como de la concentración de los solventes usados, la proporcionalidad de estos, la agitación e incluso la adición de NaCl que mejore los procesos de extracción, siendo el primer estudio completamente validado que sigue esta metodología.

Chericoni (Chericoni et al. 2015) trabaja una derivatización acuosa con propil-cloroformato añadido directamente a la muestra de orina que sea menos tóxica que los componentes usados tradicionalmente. Con éste método se obtiene LOD de 1.4 ng/mL y LOQ de 4.7 ng/mL.

Otero (Otero-Fernández et al. 2013) utiliza un nuevo método de análisis denominado Dried Urine Spots (punto de orina seca, DUS por sus siglas en inglés) que consiste en recolectar muestras de orina en volúmenes muy pequeños, que se dejan secar al aire libre. Este método tiene su origen en la técnica de Dried Blood Spots (punto de sangre seco, DBS por sus siglas en inglés) que se utiliza principalmente en las pruebas de screening metabólicas para recién nacidos, pero que ha sido adaptado en algunos estudios para la determinación de drogas en sangre debido a las bajas cantidades de muestras y reactivos que se usan. Esta técnica permite utilizar platos de 96 pozos para realizar tantas pruebas como sea posible al mismo tiempo, lo que permite que sea considerada como una nueva técnica de rutina para los laboratorios como los que se encargan de realizar pruebas antidrogas de conductores.

Lendoiro (Lendoiro et al. 2013) busca analizar el cabello en madres embarazadas para determinar su exposición a la droga, pero no especifica ninguna validación ni qué tipo de relación busca entre el análisis y sus consecuencias. Solo se enfoca en entrevistar a las madres y presentar los resultados sobre si mentían en el consumo de drogas o no.

En su segundo artículo, (Lendoiro et al. 2012) utiliza LC tradicional para determinar 35 diferentes drogas en cabello, presentando un valor de LOD promedio de 0.2 ng/mg, es decir, el artículo parece escrito sin cuidado o propósito alguno.

D'Ávila (D'Ávila, Ferreira, et al. 2016) utiliza extracción Líquido-líquido como comparativo contra una SPE para demostrar que no hay diferencia significativa entre ambas técnicas al utilizar meconio como matriz. Con ello demuestra que la cocaína si atraviesa barrera fetal y expone sus efectos biológicos.

Jagerdeo (Jagerdeo & Schaff 2016) utiliza la UPLC combinada con HRMS para determinar simultáneamente 38 analitos diferentes de la orina. La alta resolución de la cromatografía y de la espectrometría permite que los analitos sean detectados en un tiempo de menos de 10 minutos con un volumen de 0.3 mL de muestra. Sin embargo, su método no fue validado, solo presenta los cromatogramas obtenidos para cada una de las drogas analizadas.

Fernández (Fernández et al. 2015) analiza cocaína utilizando microextracción dispersiva líquido-líquido (DLLME, Dispersive Liquid-Liquid MicroExtraction) utiliza un sistema de tres disolventes que incluyen un extractante de alta densidad, un dispersante altamente miscible y una muestra acuosa. El prolongado contacto de la superficie entre el extractante y la muestra acuosa en la mezcla turbia formada facilita un equilibrio rápido. La DLLME es operacionalmente simple, económica, eficiente y ambientalmente segura. Cuando se usa combinada con LC, el solvente usado como extractante debe ser compatible con la fase móvil o debe ser introducido un paso adicional que permita evaporar el solvente y reconstituir el residuo en la fase móvil. SU método fue validado, arrojando LOD y LOQ de hasta 13.9 ng/mL y 46.2 ng/mL respectivamente, valores muy altos con otros de la misma matriz.

Liu (Liu et al. 2014) usa LC combinada con ESI para mejorar la eficiencia de la detección de cocaína en muestras de plasma sanguíneo. Utiliza una columna de cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC, por sus siglas en inglés) compuesta de sílica sin modificar usando una fase móvil acuosa y orgánica. Comparado con una fase reversa, los tiempos de retención son invertidos, es decir, los analitos más polares son retenidos más fuertemente. En el caso de

aplicaciones con ESI-MS los componentes básicos pueden ser eluidos con una fase móvil ácida y detectados en modo ion positivo, mientras los compuestos ácidos son eluidos a pH neutro y detectados en modo ion negativo. Su validación arroja un LOQ de 0.1 ng/mL, un número bajo a comparación de otras técnicas aplicadas en la misma matriz.

Valen (Valen et al. 2017) automatiza la extracción permitiendo evaluar hasta 96 muestras en 1.5 horas, determinando hasta 21 drogas diferentes. Su validación presenta valores de LOD y LOQ buenos y con solventes accesibles.

Zancanaro (Zancanaro et al. 2012) hace una revisión de casos de conductores en Brasil usando una LC en saliva sin proponer ninguna innovación. Su validación arroja un LOD de 0.26 ng/mL y LOQ de 0.52 ng/mL

Feliu (Feliu et al. 2015) utiliza extracción LLE en sangre, algo que no se registra en algún otro artículo revisado. Obviamente esto implica probar diferentes compuestos orgánicos para llevar a cabo una extracción básica. Elige este método por su bajo consumo de muestra y su económico precio sin importar la preparación de las muestras. Su validación presenta valores de LOD de 0.09 µg/L y 2.5 µg/L, valores similares a otros reportados en la misma matriz pero con diferentes métodos.

Dufaux (Dufaux et al. 2012) utiliza un inmunoensayo similar al usado por Agius, que se revisó previamente. Su estudio se encarga de comparar los radios de detección de droga en cabello y orina para concluir qué matriz es mejor para el análisis de sustancias prohibidas. Concluye que el cabello es un procedimiento de mayor eficiencia en lo que se refiere a detectar cocaína, heroína y alcohol, pero las benzodiazepinas son más fáciles de detectar en orina, por lo que se debe tomar en cuenta las bases farmacológicas y fisiológicas de cada droga para un mejor análisis.

Gryczynski (Gryczynski et al. 2014) usa GC-MS para analizar drogas en cabello, sin embargo, hace énfasis en lo importante que es no usar sólo una matriz como prueba de confirmación, pues además de que es susceptible de contaminación y puede arrojar falsos positivos, también puede haber falsos negativos si se consumen varias drogas al mismo tiempo que puedan

enmascarar los metabolitos de la cocaína, una práctica que es muy común en usuarios adictos.

Joya (Joya et al. 2012) busca encontrar una relación entre el consumo de cocaína por parte de mujeres durante el embarazo y el número de abortos espontáneos. Usa GC-MS como método de confirmación, con un LOD de 5 ng/mg.

Orfanidis (Orfanidis et al. 2017) simplifica el método de pretratamiento a 2-3 horas con una derivatización simple comparada con otros métodos. El enjuague del cabello es modificado para permitir, desde el lavado, optimizar el proceso de extracción.

Poon (Poon et al. 2014) propone el uso de un metabolito poco común, la Norcocaina (NCOC), producido por enzimas del citocromo P450 por la vía de la N-demetilación en microsomas hepáticos. Es un metabolito que tiene propiedades hepatotóxicas. Debido a que la cocaína y su principal metabolito, la benzoilecgonina, pueden ser encontrados en sudor o grasa de la piel debido a contaminación externa que se difunde al cabello. Por ello siempre es importante llevar a cabo un procedimiento de lavado y descontaminación cuando se trabaja con muestras capilares. El uso de la NCOC como objetivo permite disminuir los falsos positivos. El método reporta límites de detección buenos a comparación de otros métodos que usan la cocaína como objetivo. Su LOD es de 0.13 ng/mg

Arroyo (Arroyo et al. 2013) presenta un estudio sobre muestras de saliva en conductores consumidores de drogas. Presenta un LOD de 2.5 ng/mL y LOQ de 10 ng/mL, muy superior a otros estudios presentados en la misma matriz con diferente método.

Ellefsen (Ellefsen et al. 2016a) propone el uso de saliva como matriz para detectar cocaína. Utiliza diversos kits de recolección de muestra para comparar su efectividad en pruebas rápidas. La validación la realiza en otro estudio mediante GC-MS en donde arroja límites de cuantificación del orden de microgramos, lo cual demostraría que los kits que utiliza en su estudio son muy efectivos para la detección de la droga.

López-Ávila (Lopez-Avila et al. 2012) propone diversos cambios para mejorar la GC. El primero de ellos, es usar una ionización suave: tradicionalmente, un aparato de GC-MS utiliza una ionización de electrón (EI) que implica una energía de 70 eV, en el caso de la ionización suave, solo se ocupa una energía de 10-20 eV usando gases como Xe o Kr en lugar del He tradicional. La fuente de ionización de este estudio incorpora una descarga de microplasma como fuente de radiación de luces ultravioleta de vacío (Vacuum UltraViolet, VUV por sus siglas en inglés). La emisión específica emitida por la descarga corresponde a longitudes de onda entre 104 y 150 nm, que produce energía entre 8 y 12 eV. Esto permite una fragmentación menor que la EI y en el caso de mezclas complejas, incrementa la selectividad.

El segundo cambio propuesto es utilizar un prototipo de fotoionización de microplasma (prototype microplasma photoionization, MPPI por sus siglas en inglés) equipado a un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo (Time of flight mass spectrometer, TOFMS) mostrado en la figura 9. La luz VUV es producida por dispositivos de microondas resonantes diseñados para encender y sostener una descarga de plasma a presiones reducidas. Dicho plasma resulta emite una longitud de onda específica determinada por la composición y la presión del gas acarreador utilizado. El analito (en forma de gas) viaja a través de un canal en el pleno y es expuesto a la luz VUV por un orificio. Los iones generados son arrastrados hacia el detector de tiempo de vuelo.

En un analizador de tiempo de vuelo (TOF), un grupo de iones son acelerados por un potencial hacia un tubo lineal de vuelo libre. El tiempo requerido para que un ion con m/z definida alcance el detector dispuesto a una cierta distancia es medido. La introducción de pulsos de iones al analizador es requerida para evitar la llegada simultánea de iones con diferentes relaciones de m/z . Algunas de sus ventajas son:

- Elevada transmisión de iones
- Capacidad de adquisición de espectros rápida: a diferencia de los instrumentos con filtro cuadrupolo, la adquisición de los espectros no se basa en escaneos. Los espectros de los diferentes eventos son

acumulados, resultando un espectro de masas promedio de un conjunto de 4-10 eventos.

- Rango de masas ilimitado.

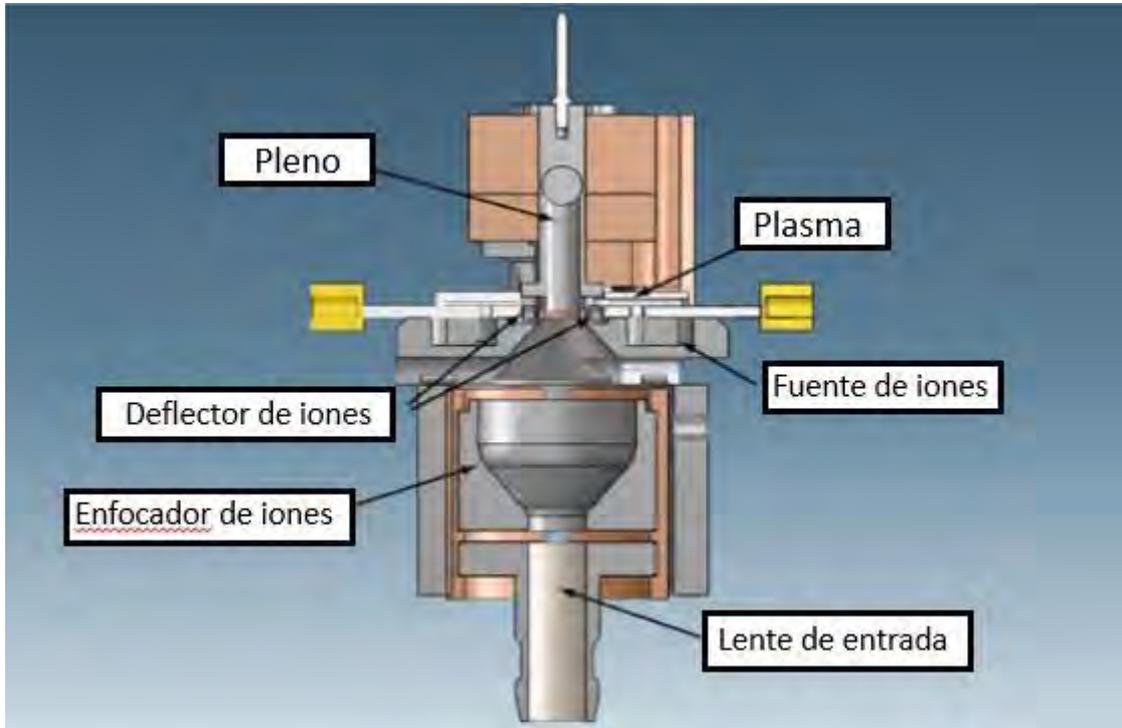


Fig. 9 Esquema de los componentes del equipo de MPPI acoplado a un GC-TOF/MS (Lopez-Avila et al. 2012) Adaptado al español

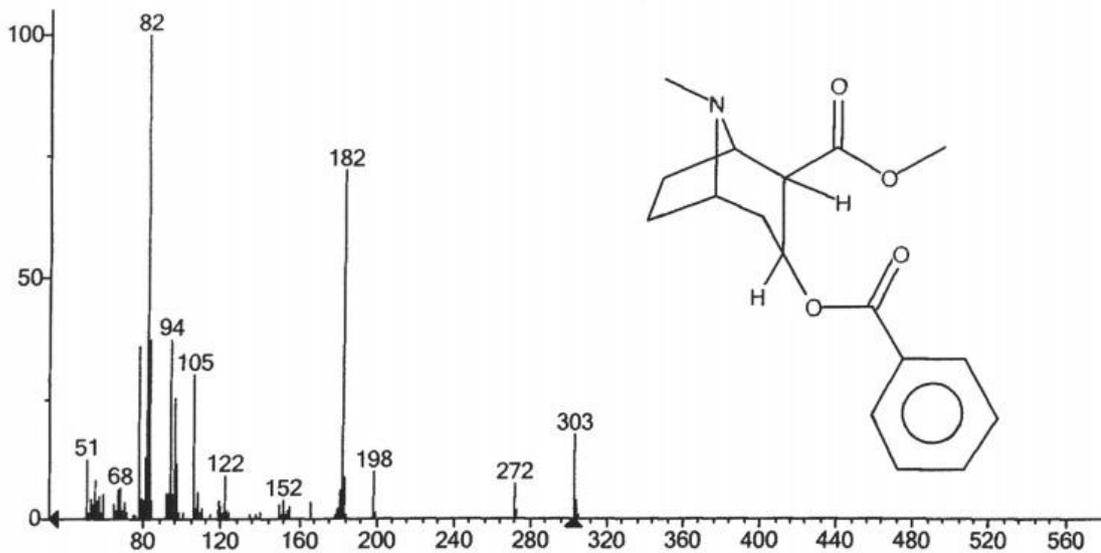


Fig. 10 Espectro de GC-MS de la cocaína de acuerdo a bases de datos

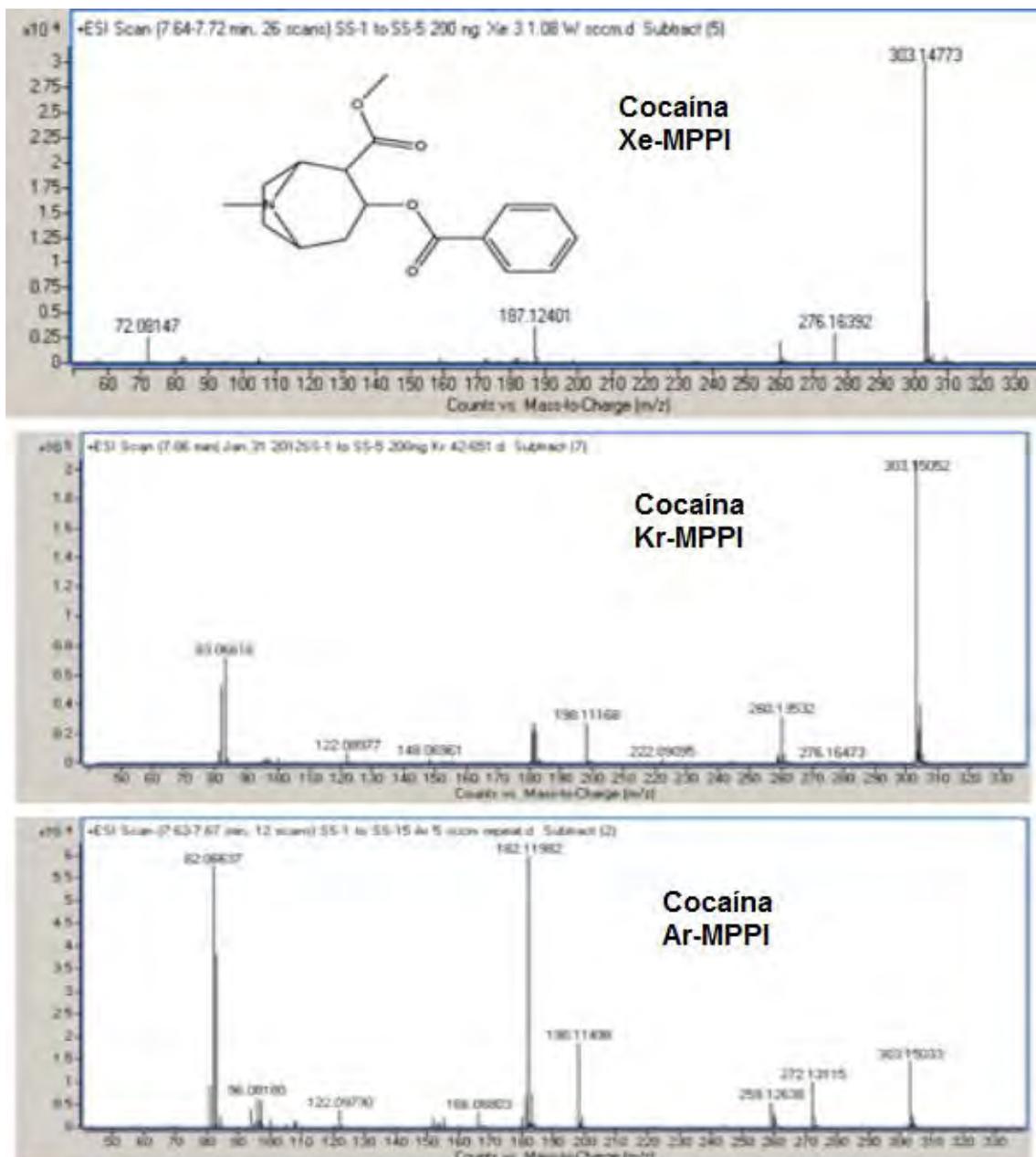


Fig 11. Espectros de cocaína obtenidos con la técnica GC-MPPI-TOF/MS con diferentes gases acarreadores de baja ionización

La figura 10 y la figura 11 comparan los espectros de cocaína obtenidos con un aparato de GC-MS tradicional, y el reportado por el autor en su artículo con las modificaciones propuestas. Se puede observar una menor fragmentación en la técnica MPPI que es lo que ellos buscan para facilitar el estudio de los compuestos orgánicos. Bajo condiciones de EI, forma un ion molecular a m/z de 303, que pierde un radical benzoato para obtener un fragmento abundante de 182. En adición, la radiación “pesada” elimina el anillo para generar los

iones de 82 y 83. Los fragmentos en 272 y 198 son formados por la eliminación de radicales metoxi y benzoilo del ion molecular. Al disminuir la energía de la radiación se observa menor fragmentación, lo que se traduce en una menor abundancia y una mayor selectividad al no ionizar otros componentes que pueden interferir con los objetivos. El método solo fue validado para linealidad y no reporta límites de detección o cuantificación.

Beck (Beck et al. 2012) propone usar el aliento como matriz biológica para detectar el consumo de drogas, mediante el uso de una boquilla con un filtro de polímero en donde los usuarios soplen y las partículas se queden atrapadas en el filtro. Se somete a una extracción metanólica y posteriormente a una UPLC. Su validación presenta LOD de 0.2 pg y 0.6 pg. Verificando estos valores, nos podemos dar cuenta de inmediato la gran falla que presenta este método: no presenta una unidad de medida de la matriz. Esto porque la cantidad de partículas sopladas no puede ser cuantificada de un modo preciso, por lo que este método sólo es cualitativo.

Henkel (Henkel et al. 2018) propuso el uso del biofilm dental como matriz de estudio, siendo el único de todos los revisados. Las muestras usadas en su estudio fueron tomadas postmortem sobre la película amarillenta generada sobre los dientes. El tratamiento previo no es difícil ni tardado y usa una LC simple. El estudio es validado, obteniendo valores de LOD y LOQ del orden de pg, muy bajos a comparación de otras matrices. Entre los inconvenientes de la muestra, se presenta la dificultad de obtener la muestra y la poca cantidad que se obtiene de esta, además de la facilidad de contaminación.

Alves (Alves et al. 2013) propone una técnica de columnas acopladas en donde una precolumna se acopla a la columna analítica usando una válvula de 6 o 10 puertos. Esto permite incrementar la sensibilidad del método al prevenir la introducción de grandes cantidades de iones que interfieran con el análisis. También reduce el tamaño de la muestra y el tiempo de estudio. Posterior a su validación, se observa que su límite de cuantificación es de 0.04 ng/mL, mucho menor al de la GC convencional.

Baumgartner (Baumgartner et al. 2012) usa una prueba inmunométrica con un kit denominado VMA-T diseñado específicamente para matrices queratinizadas. Este sistema es útil como prueba de screening, discrimina con buena sensibilidad entre un análisis negativo y uno presuntamente positivo. Evalúa su desempeño con una LC tradicional pero no presenta validación.

Broecker (Broecker et al. 2012) propone un método de screening general para sustancias desconocidas usando LC con una hibridación de cuadrupolo y TOF (LC-QTOF-MS). En este modo, el cuadrupolo provee una selección de iones precursores que es fragmentado en una celda de colisión, y los iones productos son analizados a una aceleración ortogonal en el aparato de TOF. Esto permite un análisis completo molécula por molécula de compuestos de los que no se conoce su identidad. Valida su método presentando LOD de 1 pg/mg y 3 pg/mg en cabello, siendo los valores más bajos de estudios en la misma matriz con LC.

Di Corcia (Di Corcia et al. 2012) realizó un estudio tradicional de UHPLC con equipo Nuevo sobre cocaína en cabello. Obviamente, al ser el equipo más novedoso del mercado, reduce el tiempo de análisis sin sacrificar resolución, precisión, etc.

Koster (Koster, Alffenaar, Greijdanus, VanDernagel, et al. 2014) utiliza una extracción con pequeñas bolas de acero, que permiten que los solventes se mezclen al mismo tiempo que se pulveriza la muestra, haciendo más eficiente y rápido este paso. Su validación presenta un LOQ de 30 pg/mg. Su comparación con otros métodos evidencia que este tratamiento de la muestra es más eficiente que la digestión que usualmente se acostumbra a hacer.

Kronstrand (Kronstrand et al. 2013) utiliza un LC-TOF para análisis de 30 diferentes drogas en cabello. Hace un comparativo con una LC tradicional para evidenciar que la TOF es más sensible y tiene mayor resolución, sin embargo, su costo es elevado para ser implementado en análisis de rutina en laboratorios toxicológicos y forenses.

Leung (Leung et al. 2017) realizó un estudio sobre la incidencia de drogas en Hong Kong. Es más un estudio estadístico que presenta un protocolo tradicional de LC

Miyaguchi (Miyaguchi & Inoue 2011) utiliza LC con trampa de iones lineales (Linear ion trap) con cuadrupolo. La trampa de ion linear es menos propensa a efectos de carga espacial, permitiendo que se acumulen un mayor número de iones lo que resulta en una sensibilidad aumentada. En un instrumento comercial, la trampa linear de iones es el tercer cuadrupolo en un arreglo de triple cuadrupolo. En esa configuración, puede ser usado para acumular iones producto generados por disociación inducida por colisión (CID, Collision induced dissociation, por sus siglas en inglés) en una celda específica, lo que permite mejorar la sensibilidad y la ausencia de un límite bajo de masas. La desventaja de este equipo es que al ser nuevo, es excesivamente caro, aunque sus resultados sean muy buenos. Su estudio arroja un LOQ de 0.10 ng/mg.

Morris-Kukowski (Morris-Kukowski et al. 2014) experimentó con diversas muestras, post-mortem y de usuarios activos, para determinar nuevos criterios de aceptación de una muestra, en donde recomienda rechazar todos los resultados que arrojen una concentración por debajo de los 500 pg/mg, además de la presencia de al menos dos metabolitos con un sustituyente hidroxilo en el anillo de tropano.

O'Byrne (O'Byrne et al. 2013) utiliza LC-MS/MS para la identificación y confirmación semi-cuantitativa de diferentes estimulantes en cabello y orina. Valida su método y lo utiliza para confirmar la presencia de drogas en muestras de pacientes que asisten a centros de tratamiento. Solo reporta un LOQ de 5 ng/mL.

Pragst (Pragst et al. 2013) elabora un análisis con LC-QTOF-MS en cabello de niños que viven con padres adictos o bajo tratamiento. Su propuesta es detectar a través de la contaminación de los infantes si los padres consumen drogas o no, como una alternativa en caso de que los consumidores se nieguen a dar alguna muestra para su análisis. Expone que principalmente se detecta cocaína, pero también ciertos metabolitos que se detectan en fumadores, pues los niños están expuestos al humo de la cocaína fumada. Su método no presenta validación.

Rubio (Rubio et al. 2014) busca diferenciar si la ingesta de cocaína fue masticada o inhalada, en el caso de que sea legal masticar las hojas de coca.

Utiliza HPLC-MS/MS y propone dos métodos para diferenciar el modo de ingestión. Detectar alcaloides que están presentes en la coca masticada pero no en la inhalada y cambios en los radios de los metabolitos. Presenta validación de su método con LOD de 0.02 pg/mg y 0.06 pg/mg que son valores muy bajos para la matriz que maneja.

Shah (Shah et al. 2014) utiliza LC-MS/MS pero mejorada con monitoreo dinámico de múltiple reacción (DYN-MRM, dynamic multiple reaction monitoring). Que permite obtener datos de un solo segmento del espectro en lugar de todos los que normalmente se obtienen. Esto es una mejora con respecto al método de detección MRM normal. Valida su método presentando un LOD de 0.25 pg/mg.

Bystrowska (Bystrowska et al. 2012) evalúa el contenido de cocaína en tejidos como cerebro, hígado y plasma, previa entrenamiento a ratas para su autoadministración. Usa una extracción con cloroformo y metanol sobre los tejidos y LC-MS/MS para determinar el mejor órgano para detectar la ingesta de drogas. Es método invasivo para individuos vivos, pero útil en muestras post-mortem.

Joya (Joya et al. 2015) usa el meconio como matriz para detectar cocaína usando UPLC-MS/MS. Su validación reporta datos de LOD de 1.5 ng/g y 5 ng/g, valores muy altos comparados con otras matrices.

Fiorentin (Fiorentin et al. 2017) comparó la cocaína y otros metabolitos encontrados en orina y saliva para determinar cuál es la mejor matriz. Encuentra que para cocaína, es mejor usar orina que saliva pues tiene una mayor concentración de la droga tras su ingestión.

De Jager (De Jager & Bailey 2011) utiliza un método de extracción SPE en línea que consiste en alternar dos columnas de trampa que permiten una limpieza adecuada y un equilibrio entre inyecciones al sistema de LC. Su método incluye 29 drogas de abuso en orina. No presenta validación.

Rosano (Rosano et al. 2016) propuso una técnica de calibración novedosa denominada Treshold Accurate Calibration (Calibración Precisa de Umbral, TAC por sus siglas en inglés) usada para alcanzar la normalización del efecto

matriz. Utiliza un procedimiento donde el analito de interés es salpicado en la muestra hasta alcanzar el 100% del valor de cut-off o concentración de umbral como los estándar añadidos. Cada calibrador, muestra y estándar es analizada dos veces, una sin los estándar añadidos y una con el estándar. Posteriormente se siguen los pasos establecidos para el análisis de UPLC-MS/MS. La relación TAC es calculado de acuerdo a una ecuación. Una muestra positiva es determinada si el radio TAC excede el valor del radio del calibrador La figura 12 muestra los pasos a seguir para el análisis y las fórmulas utilizadas para calcular estas relaciones

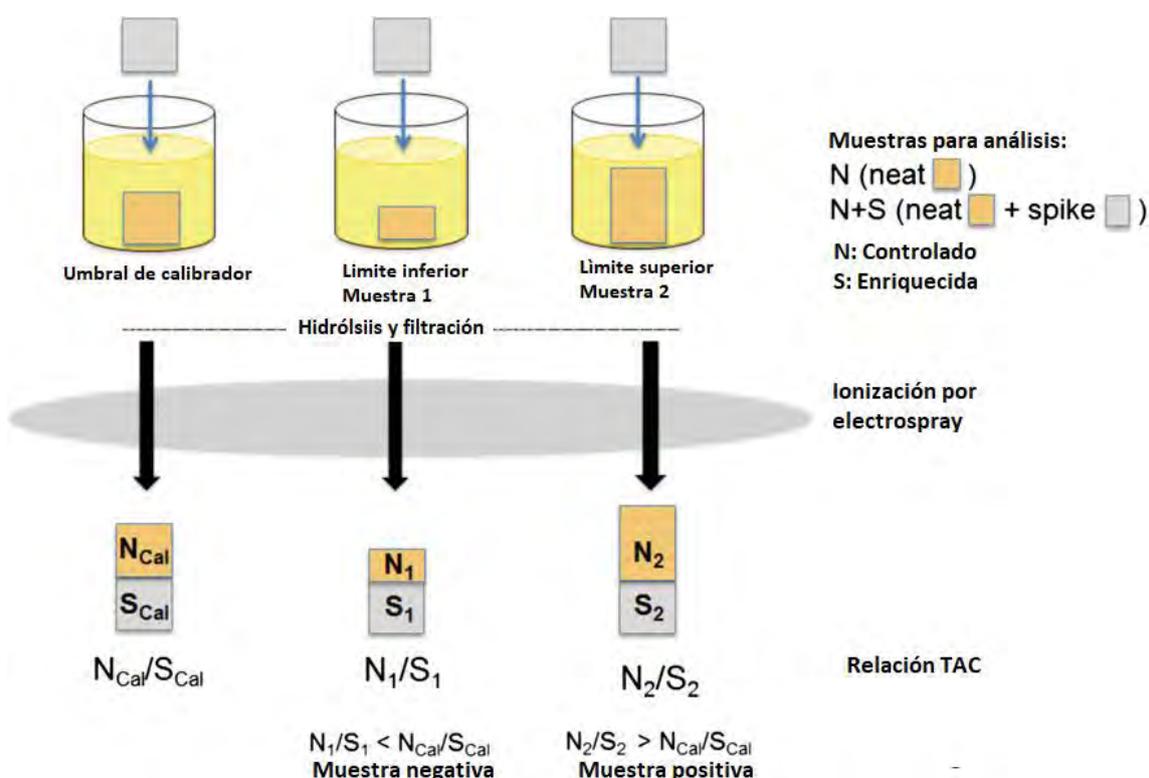


Figura 12. Esquema de la técnica de Calibración Precisa de Umbral (TAC) Extraído y adaptado de Rosano et al. 2016

La implementación de esta técnica permite que los conocidos stable-isotope-labeled internal standards (Estándar internos etiquetados con isótopos estables, SIL-IS por sus siglas en inglés) sean sustituidos, puesto que algunos estudios (no incluidos en este trabajo) han demostrado que pueden variar sus tiempos de retención con respecto a la droga pura o que el uso de un estándar no específico no compense adecuadamente el efecto matriz.

Schaefer (Schaefer et al. 2013) usa la cromatografía de flujo turbulento. Se basa en la inyección directa de la muestra a una columna estrecha empacada

con partículas grandes. Las moléculas pequeñas difunden en los poros de las partículas mientras que las moléculas más grandes son lavadas. La fase móvil fluye a través de la columna y crea líneas de alta velocidad. En combinación con los poros de las partículas grandes, ocurre la turbulencia, que permite una mejor extracción de las sustancias. Propone dos métodos jugando con los disolventes y la fase móvil para la identificación y cuantificación de diferentes drogas incluidas algunas de diseño, para tener tiempos de análisis menores e incrementar el número de muestras posibles a analizar y cuantificar para los valores requeridos para otorgar licencias de manejo en Alemania. Su validación presenta LOD de 4.9 ng/mL y LOQ de 24.4 ng/mL.

Sena (Sena et al. 2016) propone una Microextracción Líquido-Líquido dispersiva (DLLME, Dispersive Liquid Liquid Microextraction). Investiga la influencia de diferentes tipos de solventes para la emulsión. Sin embargo, su método se enfoca más en la detección de adulterantes que están presentes en cantidades mínimas en la droga como cafeína, lidocaína y otros.

Tsai (Tsai et al. 2013) hace un screening de 62 drogas de abuso por UHPLC-QTOF-MS. No utiliza SPE debido a la gran variedad de sustancias que se detectan, y no fueron capaces de encontrar un método unificado para todas. Presenta un LOD para cocaína de 15.7 ng/mL

Strano-Rossi (Strano-Rossi et al. 2011) usa un método de UPLC-ESI-MS/MS para comparar diferentes kits comerciales de recolección de saliva para análisis de drogas para pruebas en conductores. Presenta un LOD de 1 ng/mL y LOQ de 5 ng/mL.

Zheng (Zheng et al. 2017) colectó muestras de saliva para analizar mediante UHPLC en china. Solo presnetó valor de LOQ. Usa su artículo como una forma de publicidad a un nuevo parche lanzado al mercado.

Anzilloti (Anzillotti et al. 2014) utiliza un método denominado Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe dispersive Solid Phase Extraction (Extracción en fase sólida dispersiva rápida, fácil, barata, efectiva áspera y segura, QuEChERS-dSPE por sus siglas en inglés) que es ampliamente utilizado en el análisis de pesticidas en la agricultura en los últimos años y que ahora es aplicado al análisis de drogas en sangre. Consiste en purificar la

muestra utilizando un adsorbente basado en la fase de amina primaria y secundaria (Primary and secondary amine, PSA por su siglas en inglés) como la β -glucuronidasa, que puede remover componentes de la matriz como azúcares, ácidos grasos y pigmentos polares, lo que permite un análisis de LC más limpio y la disminución de la capa orgánica al no utilizar otro tipo de solventes. En este estudio, dicho método fue utilizado para cuantificar hasta 21 drogas y metabolitos con su respectiva validación y posteriormente ocupado para estudiar 30 muestras provenientes de autopsia.

Dulaurent (Dulaurent et al. 2016) Usa LC-MS/MS pero busca un método QuEChERS para que la extracción sea rápida y fácil de llevar a cabo. Estudia diferentes metabolitos en sangre, presentando LOQ de 5 ng/mL

Odoardi (Odoardi et al. 2014) usa punto de sangre seca (Dried Blood Spot, DBS) con UHPLC-MS/MS trabajando en muestras post-mortem. Su validación tiene valores de LOD de 0.5 ng/mL y LOQ de 2 ng/mL.

Ruiz-Colón (Ruiz-Colón et al. 2012) utiliza como método de extracción la precipitación de proteínas en muestras de sangre. Evalúa la presencia de varias drogas, pero se enfoca más en la Xylazina, que es un sedante veterinario, pero no establece relación alguna con su uso en humanos ni con el metabolismo de las otras drogas como la cocaína, morfina o codeína. Su validación presenta valores de LOD de 1 ng/mL y LOQ de 10 ng/mL.

Saussereau (Saussereau et al. 2012) También usa puntos secos de sangre, DBS, con LC-MS/MS para determinar diferentes drogas entre opiáceos, anfetaminas y metabolitos de cocaína. No presenta validación.

Thomas (Thomas et al. 2012) combina DBS con LC-MS/MS y trampa de iones linear. Esto permite que su LOD sea de 0.05 ng/mL y LOQ de 0.25 ng/mL

Zhu (Zhu et al. 2012) trabaja con un nano chip basado en HPLC. El chip fue fabricado por capas de polimida e integrado en una columna de enriquecimiento. Funciona como un HPLC normal pero a nivel nano, lo que permite disminuir la cantidad de muestra, reducir el tratamiento y aumentar la velocidad de análisis. Su validación presenta LOD de 0.1 pg/mg y LOQ de 0.2 pg/mg, lo que habla de la gran sensibilidad del método.

Koster (Koster, et al. 2014) usa el sudor como matriz biológica para la detección de 16 drogas diferentes. Utiliza un parche que se pone en los voluntarios para absorber el sudor de su cuerpo mientras realizan una serie de ejercicios físicos. Aunque presenta validación, reporta un LOQ con valores de 3 ng/parche, lo que implica que no existe uniformidad en el método, pues no está determinado con exactitud la cantidad de sudor excretado.

Bassan (Bassan et al. 2011) usa HPLC-MS/MS para la determinación cuantitativa de 43 drogas de uso común en suero. Presenta LOD de 2.3 ng/mL y LOQ de 8.7 ng/mL

Krumbiegel (Krumbiegel et al. 2016) propone el uso de uñas de las manos como matriz para detección de drogas. Aplica su protocolo a 6 casos postmortem, comparando las concentraciones encontradas en cabello, considerando que son hechas del mismo material biológico, pero no encuentra relación entre los resultados. Lo único en lo que son similares, es que la concentración varía dependiendo del segmento que se analice, existiendo una mayor concentración en la base que en la parte más alejada del dedo.

Sykutera (Sykutera et al. 2014) también utilizó de uñas de las manos como matriz de detección de drogas mediante LC-ESI-MS/MS. Esta matriz es poco usada debido a que es muy susceptible de contaminación, sin embargo, al ser una matriz queratinizada, como el cabello, puede proveer información de consumo de meses atrás de acuerdo a su longitud.

Baciu (Baciu et al. 2016) utilizó un tratamiento que incluye tierra diatomea para la extracción de cocaína en cabello, combinando una extracción en fase sólida con una líquida, y usando electroforesis capilar en línea. Este método permite monitorear pacientes en tratamiento y disminuye el uso de reactivos.

Cuypers (Cuypers et al. 2016) busca determinar directamente si la droga encontrada en el cabello proviene de una exposición sistémica, es decir, si se ingirió la droga, o si se encuentra como contaminante, es decir, proveniente del ambiente. Para ello usa dos técnicas: Espectrometría de masas por desorción/ionización de matriz asistida por láser (Matrix-assisted laser ionization/desorption mass spectrometry, MALDI) y Espectrometría de masas

de ion secundario asistida por metal (Metal assisted secondary ion mass spectrometry, MetA-SIMS).

En MALDI, la muestra es depositada en un objetivo y co-cristalizada con una matriz sólida. Dicho objetivo es transferido al vacío y bombardeado con pulsos de fotones de un láser, en el mayor de los casos, un láser de nitrógeno. La ionización es resultado de una excitación electrónica eficiente de la matriz y la subsecuente transferencia de la energía a las moléculas del analito disuelto, que son desorbidas y analizadas como moléculas protonadas o cationizadas. Sin embargo, el proceso de ionización no está del todo claro. Componentes con masa molecular muy alta (por arriba de los 200 kDa) pueden ser analizados usando esta técnica.

SIMS es una técnica usada para analizar la composición de superficies sólidas y películas delgadas pulverizando la superficie con un rayo de iones primarios enfocado y recolectando y analizando los iones secundarios eyectados. Los radios m/z de estos iones secundarios son medidos con un espectro de masas para determinar la composición molecular, elemental o isotópica desde la superficie hasta una profundidad de 1 o 2 nm. Debido a la gran variación en las probabilidades de ionización entre los diferentes materiales, se considera una técnica cualitativa, aunque la cuantificación es posible usando ciertos estándares.

Mezclando ambas técnicas, es posible identificar si la droga se encuentra sólo en la superficie, lo cual se debe a una contaminación externa, o si se encuentra en la composición estructural del cabello, lo que indicaría que viene del organismo.

En su segundo estudio (Cuypers et al. 2014) busca determinar el efecto del blanqueamiento de cabello sobre la detección de cocaína en cabello. Utiliza MALDI para descartar la contaminación externa y enfocarse en la droga atrapada en la estructura del cabello.

Duvivier (Duvivier et al. 2016) usa Análisis directo en tiempo real con espectrometría de masas de alta resolución (Direct Analysis in real Time, High resolutions mass spectrometry DART-HRMS). Es una técnica de ionización que utiliza calor, con especies de gas metaestables (como helio) para desorber

iones de una superficie bajo condiciones ambientales. Esta técnica tiene la posibilidad de hacer un screening rápido con una preparación mínima de diversas matrices. Sin embargo, se requiere mucho análisis estadístico para comprobar su validez,

Flinders (Flinders et al. 2015) utiliza varias técnicas como MALDI y SIMS combinado con TOF-MS para comparar imágenes por microscopía para detectar la presencia de drogas a partir de la comparación con un estándar. Se usa un aparato de cortado de muestras automático que permite la reproducibilidad en el experimento para medir los mismos segmentos. SIMS también ayuda a determinar otras cualidades como el tiempo de ingestión, o la distribución en la matriz de hasta un mes.

En un segundo estudio (Flinders et al. 2017), optimiza la precisión y los cortes del cabello para realizar la prueba screening en menor tiempo (3 h) contra el tiempo original (18 h)

Poetzsch (Poetzsch et al. 2014) usa MALDI como alternativa a las técnicas tradicionales de análisis de cabello, ya que tiene poca preparación de la muestra y no influye si el cabello ha sido decolorado o tratado con algún agente químico. Investiga la influencia del proceso de ionización y la influencia de la melanina en el proceso de detección de moléculas de drogas.

Bailey (Bailey et al. 2015) aplica la técnica de MALDI y DESI/SIMS (desorption Electrospray Ionization) pero a huellas de los dedos sobre vidrio previamente congelada, como una alternativa a las matrices tradicionales. Puede ser tomada en un instante, sin invadir el cuerpo del sujeto, y sin posibilidades de falsificación o suplantación. Sin embargo, el significado de encontrar metabolitos de la cocaína en las huellas es desconocido, pues no se conoce si el residuo de la cocaína dejado al contacto puede ser metabolizado por la piel. Además, la dificultad de la cuantificación de una sustancia con esta matriz es que no existe un método actual por el que se determine cuánto material biológico fue depositado en la huella, a diferencia de la orina o la sangre que es fácil determinar el volumen de la sustancia.

Costa (Costa et al. 2017) investigó un método consistente en previsualizar la huella con UV y nitrato de plata, denominada Paper Spray- Mass Spectrometry.

Las huellas son tomadas sobre un papel cromatográfico y posteriormente llevadas a MS. Se reporta solo un 2% de falsos positivos y un 98% de detección de muestras.

Skriba (Skriba & Havlicek 2018) modificó el procedimiento de la técnica MALDI y lo miniaturizó a nivel nanométrico, por lo que es denominada como NALDI: Nanostructure-Assisted Laser Desorption Ionization (Ionización por desorción de láser asistida por nanoestructuras, por sus siglas en inglés), y hace una comparación con MALDI para comprobar sus mejoras. Su trabajo reporta mayor sensibilidad, sin embargo, no presenta validación de la técnica. Solo presenta imágenes comparativas en donde se aprecia una mejor resolución de NALDI.

Van der Heide (van der Heide et al. 2015) propone el uso de una técnica de inmunoensayo competitivo (cEIA, competitive enzyme immunoassay) sobre huellas de manos en documentos bancarios. Un anticuerpo policlonal específico contra cocaína es purificado de suero y colocado en microplatos. Se evalúa la cantidad de anticuerpo absorbida en los platos y la dilución de la enzima para optimizar la prueba. Se compara directamente contra LC-MS convencional en el análisis de documentos bancarios de reino unido. El resultado de ambas técnicas es estadísticamente similar sugiriendo que el inmunoensayo no es afectado por reactividad cruzada con algún componente que pudiera interferir. Una vez obtenidos los resultados, el ensayo fue utilizado también para evaluar otras matrices como saliva del mismo individuo para comprobar que efectivamente se ingirió droga. El ensayo es una alternativa simple y barata para el análisis forense de cocaína. Su validación presenta un LOD de 0.162 ng/mg.

Dos Santos (dos Santos et al. 2017) propuso el uso de nanotubos de carbón (CNT Carbon nano tubes por sus siglas en inglés) que consiste en realizar la separación de la droga de la matriz, en este caso leche materna, con el uso de magnetos que separan las partículas adheridas al tubo. El método resulta útil para monitorear la leche materna que es administrada a los neonatos y evitar la exposición a la droga. Es realizado en pequeño y es fácil de preparar, por lo que el uso de materiales y solventes es mínimo. Presenta validación del orden de nanogramos.

D'Ávila (D'Avila, Ferreira, et al. 2016) utiliza meconio y establece una extracción Líquido-Líquido para saber si hay diferencia significativa entre este método y el tradicional que usa SPE. Demuestra también los efectos biológicos del paso de la cocaína de la madre al feto y su detección en sus primeros desechos. No presenta validación alguna.

Armenta (Armenta et al. 2013) propone un sistema de doble confirmación: Espectroscopía infrarroja (IR) y Espectrometría de movilidad de iones (IMS). La IMS es una técnica basada en la separación en fase gaseosa de analitos ionizados bajo un campo eléctrico débil a presión ambiental. Su potencial analítico se deriva de su alta sensibilidad, su velocidad operacional y su simplicidad.

La IR, por otro lado, es una prueba estándar en el análisis forense. Para un trabajo de identificación, una punta de diamante es usada para un análisis rápido de muestras sólidas. Sin embargo, en el caso de muestras biológicas, la sensibilidad se considera el talón de Aquiles de la técnica y se han propuesto diferentes metodologías para resolver este problema. El uso de medidas de transmisión con células con longitud óptica incrementada, combinadas con volumen interno reducido ha demostrado proveer límites de detección a partes por millón, un nivel apropiado para analizar casos de conductores bajo la influencia de drogas.

El objetivo principal de este trabajo es usar dos tecnologías analíticas basadas en diferentes principios químicos, secuencialmente o en combinación, para lograr una detección rápida y precisa de drogas en muestras de fluido nasal.

Taylor (Taylor et al. 2017) trabaja con sensores electroquímicos in-vivo basados en aptámeros para medir directamente la actividad cerebral provocada por la ingesta de cocaína. El estudio especifica la creación del sensor y su calibración, realizando estudios en ratas que ingirieron cocaína, pero no presenta ningún tipo de validación.

Carreiro (Carreiro et al. 2015) usa un biosensor con actividad electrodermal (Electrodermal Activity, EDA), que mide cambios de temperatura en la piel (vasoconstricción), estimulación eléctrica, actividad, etc. Presenta este chip como alternativa de uso, pero está sujeto a interacciones con el ambiente,

aceptación del sujeto a portarlo sin removerlo en un periodo mínimo de 48 h. Además, requiere confirmación con otro tipo de pruebas, pues solo se enfoca a medir respuestas fisiológicas que pueden o no ser provocadas por la droga.

Galano (Galano et al. 2012) se enfoca en un método de screening para identificar mezclas de drogas, incluyendo sedantes, en suero y orina de caballo usando MALDI-TOF/TOF-MS automatizado.

Kim (Kim et al. 2017) investiga kits de pruebas multidrogas cualitativos. El estudio evalúa su efectividad a la hora de hacer las pruebas con orina, pero no presenta ningún tipo de validación.

Kohler (Kohler et al. 2013) combina electroforesis capilar (CE) con TOF-MS con ESI como fuente de ionización y DLLME como método de extracción para analizar volúmenes reducidos de orina y realizar un screening toxicológico. Para compensar la baja sensibilidad de la técnica de CE, se añade el TOF-MS que además aporta adquisición de datos rápida. Su validación sólo presenta LOD de 5 ng/mL.

Meng (Meng et al. 2017) utilizó espectroscopía Raman para analizar la superficie de muestras de orina, en donde utilizó Gold Nano Particles (Nano partículas de oro, GNP por sus siglas en inglés) para formar una película y se puedan usar de sustrato. Se usa HPLC como confirmación. El hexano utilizado sirve para separar moléculas orgánicas en medio alcalino. Por su poco uso de recursos, facilidad y rapidez de la prueba, se convierte en una prueba de rutina en puestos de control.

Moslah (Moslah et al. 2018) realizó estudios de rutina en la población de Túnez. Según su artículo, desde la revolución en su país, en 2011, se registró un incremento en el consumo de sustancias ilegales. Este estudio es puramente estadístico, toda vez que utiliza kits inmunológicos para la detección rápida en orina de cocaína.

Yamini (Yamini et al. 2014) utiliza un método de extracción denominado Microextracción en Fase Líquida en Fibra Hueca (Hollow Fiber- Micro Extraction Liquid Phase, HF- LPME) en donde, como su nombre lo indica, se usa una fibra hueca que se impregna con un agente orgánico que sirva para

extraer el analito de la muestra. El artículo busca las mejores condiciones como el solvente más adecuado, tiempo y ritmo de agitación y el efecto de añadir sal a la mezcla. Presenta un LOD de 0.05 µg.

Yu (Yu et al. 2014) utiliza HPLC-FLD (detección fluorescente) para evaluar el contenido de cocaína y L-THP (L-Tetrahidropalmatina), que es un antagonista no selectivo de la dopamina y es utilizado en años recientes como un agente para combatir la adicción a la cocaína. Se utiliza principalmente en China ya que es extraído de la planta *Corydalis yabusuo*, nativa de ese país, principalmente como analgésico. También interacciona con otros receptores de neurotransmisores como el de serotonina, 5-HT y GABA. Su efecto analgésico se debe a su interacción como antagonista de dopamina. Su estructura se muestra en la figura 13.

El FLD es un detector específico y sensible a la concentración del analito. Se basa en la emisión de fotones por moléculas electrónicamente excitadas. La fluorescencia es usada especialmente para analitos con sistemas de anillos largamente conjugados como hidrocarburos aromáticos polinucleares y sus derivados.

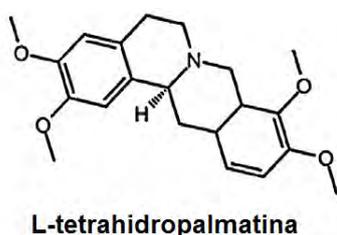


Fig. 13. Estructura de la L-THP. Se observa una estructura aromática polinuclear, por lo que el uso de un detector fluorescente es ideal para su análisis.

Su artículo presenta el primer estudio clínico de farmacocinética de combinación de cocaína y L-THP como soporte a los estudios de fase 1. No presenta validación.

Christodoulides (Christodoulides, et al. 2015) el chip programable que usa en su estudio fue desarrollado por su equipo de trabajo, que sirve como biomarcador con diferentes aplicaciones como la detección de enfermedades del corazón, cáncer oral y de ovarios, y muchas otras condiciones. Utilizando el

principio de microfluidos, el chipo puede servir para realizar ensayos para monitorear diferentes condiciones al mismo tiempo y reducir drásticamente los volúmenes de agentes químicos y reducir el tiempo del diagnóstico. Con la nueva generación de estos chips, se espera que sea posible realizar detecciones de drogas y sus metabolitos en un cartucho en tiempo real y facilitar los tratamientos de los pacientes. La figura 14 muestra un panel del prototipo de laboratorio en tamaño más grande que el que utiliza el chip.

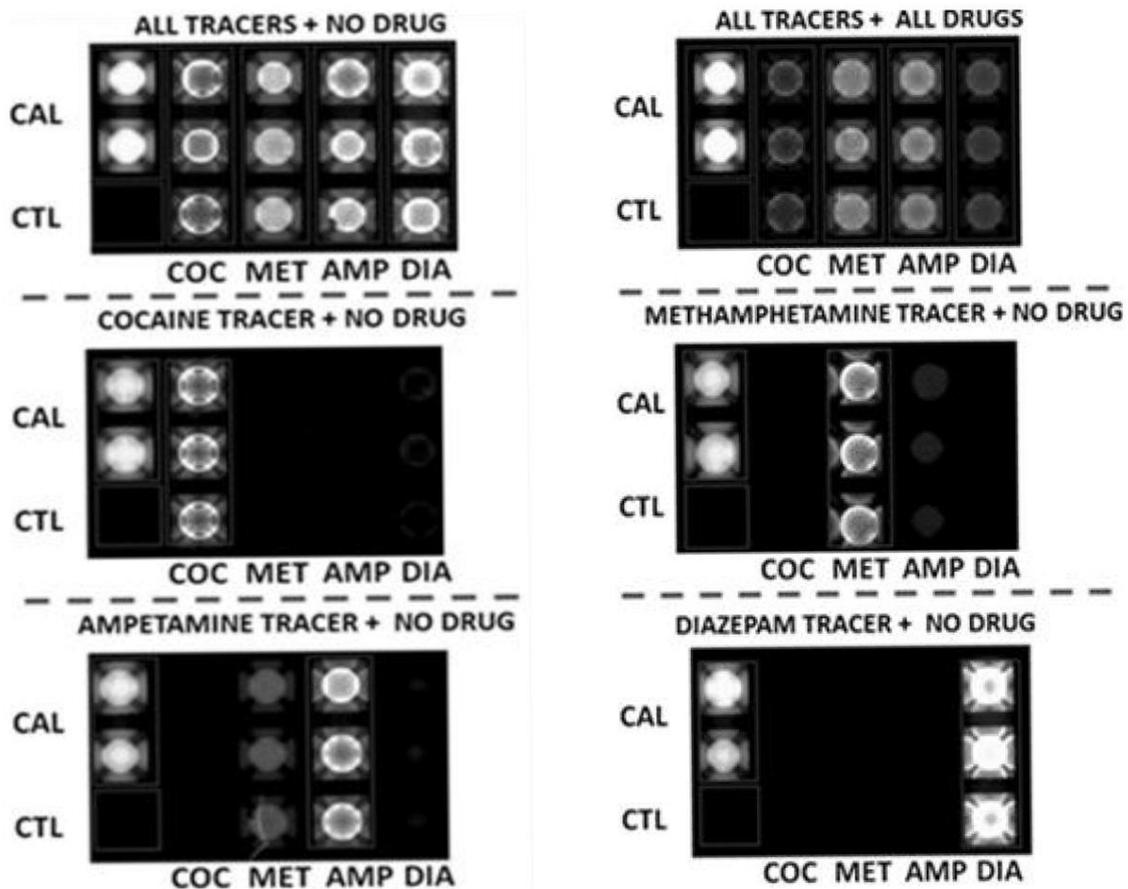


Figura 14. Panel multi-drogas del p-BNC. Demuestra la especificidad de los marcadores para sus respectivos analitos. CAL: cuentas acopladas a una determinada cantidad de flúor que sirven como calibradores del sistema. CTL: cuentas acopladas a albúmina de suero de bovino que sirve como control negativo y como indicador de la especificidad de las reacciones que se llevan a cabo en la celda (Christodoulides, De La Garza, Simmons, McRae, Wong, Newton, Kosten, et al. 2015)

El artículo también menciona que los límites de detección del chip son tan bajos como los medidos por cualquier aparato de LC-MS/MS, pero no requiere tiempo de trabajo ni consumo de muestras o reactivos como una técnica tradicional.

D'Elia (D'Elia et al. 2018) utilizó espectroscopía Raman combinada con UV. Se mezclan diferentes concentraciones de cocaína en saliva para obtener espectros Raman y comparar contra cocaína en agua y ACN. El UV se usa a 239 nm para eliminar la interferencia de la saliva. No es un método usado comúnmente para este tipo de análisis en orina debido a la complejidad del tratamiento previo.

Dik-Lung (Ma et al. 2015) Usa un ensayo basado en luminiscencia que detecta las proteínas que son producidas por las células que procesan la cocaína. Sin embargo, no especifica un ensayo biológico como tal, solo explica la creación de diez diferentes complejos de iridio con la proteína G, para seleccionar al que mejor se acople para detectar cocaína. Se alcanza un límite de detección de 30 nM con una relación lineal entre la intensidad de luminiscencia y la concentración de cocaína en un rango de 30 a 300 nM. Permite detectar los aptameros (cadenas de RNA o DNA artificiales hechas in vitro que se enlazan selectivamente a un objetivo) de las células que sirven de receptores a la cocaína.

Muñoz (Munoz et al. 2011) usa un inmunoensayo denominado resonancia de plasmon de superficie (Surface Plasmon resonance, SPR), en donde inmunosensores ofrecen una detección precisa de analitos en matrices complejas gracias a la reacción antígeno-anticuerpo. Tiene la ventaja de que no se necesitan moléculas etiquetadoras, lo que implica que la medición sea rápida y barata. Detecta benzoilecgonina, el metabolito más importante de la cocaína, reportando un LOQ de 4 µg/mL en saliva.

Sorribes-Soriano (Sorribes-Soriano et al. 2018) trabajó con IMS (Espectroscopía por movilidad de ion) determinado con MMIP (Polímeros magnéticos impresos molecularmente). La novedad de este estudio es que utiliza ambas técnicas en una sola matriz compleja (saliva) para facilitar el análisis y disminuir el efecto matriz. Presenta un LOQ de 4 µg/L, lo que resulta un valor ligeramente alto para métodos tan específicos.

Tavares (Tavares et al. 2018) propone una técnica denominada PS (paper spray) con espectroscopía de masas. Consiste en la aplicación de un voltaje alto sobre un papel triangular. La diferencia de potencial entre el papel y la MS

genera un campo eléctrico con la máxima intensidad en la punta del papel. La generación de iones por este método sigue el mismo principio que la ESI (electrospray Ionization). Se puede usar papel filtro o papel cromatográfico. Para una mejor selectividad, puede usarse papel de celulosa y MIP como biosensor para reducir costos e incrementar precisión y exactitud.

Yu (Yu et al. 2017) presentó un estudio que usa un aptámero que incrementa la afinidad de anclaje mediante un enlace cooperativo con un segundo dominio. Dicha técnica recibe el nombre de Cooperative Bindingsplit Aptamer (aptamero de sitio de anclaje cooperativo, CBSA por sus siglas en inglés), para que sirva como etiqueta fluorescente y su posterior lectura.

Guinan (Guinan, T.M. et al., 2015) propone el uso de micropartículas porosas de silicón (pSI-MPs, porous silicon microparticles en inglés) usadas en SALDI (Surface assisted laser desorption/ionization). El método se utiliza como una alternativa a los inmunoensayos que necesitan confirmación con GC o LC. SALDI solo requiere un lavado y utiliza sustratos nanoestructurados que pueden detectar un analito de interés sin importar la matriz en la que se encuentren. Se diferencia de MALDI por el tamaño de partícula que puede reconocer (MALDI >700 Da, SALDI <700 Da). El análisis es directo y específico. Elimina pasos extra en la preparación de muestras, sin embargo, en algunas drogas, el tamaño de partícula es directamente proporcional a la cantidad detectada.

Zhang (Zhang et al. 2014) propuso un método que utiliza nanoclusters de DNA como señalizadores y amplificadores de señal de endonucleasas. No especifica el método que se sigue, solo presenta la parte teórica de como se supone que debe funcionar la endonucleasa y algunos resultados obtenidos sin validación.

Emrani (Emrani et al. 2016) desarrolla un aptasensor, que es un sensor fluorescente que reconoce aptameros. Estas secuencias exhiben diferentes ventajas como buena reproducibilidad, tamaño pequeño, bajo costo, alta estabilidad termal, ausencia de inmunogenicidad y toxicidad, facilidad de síntesis y de modificación. En este estudio, un aptasensor formado de nanopartículas de sílica con nanopartículas de oro y una cadena complementaria de aptamero se creó para reconocer cocaína en suero de rata.

Al ser un método nuevo, juegan con las concentraciones, condiciones de tratamiento y condiciones de la muestra para determinar las mejores condiciones de detección. Presenta un LOD de 209 pM.

Rauf (Rauf et al. 2017) utiliza un heptámero (α -HL -alfa hemolisina-) de *Staphylococcus aureus* para detectar la presencia de cocaína. La molécula se convierte en un oligonucleótido mediante la hibridación de la molécula con una cadena de DNA. El heptámero reconoce la cadena de DNA provocando una señal eléctrica altamente sensible (a concentración nanomolar). Su ventaja consiste en que se pueden usar matrices complejas como saliva o suero sin tratamiento previo. El experimento consiste en añadir diferentes cantidades de cocaína a suero y saliva para determinar el % de recuperación con dicha técnica, obteniendo valores por encima del 95%.

Roushani (Roushani & Shahdost-Fard 2016) también trabaja un aptasensor, pero basado en técnicas electroquímicas (detección de cambios de potencial) como resultado de las interacciones que ocurren en la superficie celular. El método más común para sintetizar nanopartículas de oro (AuNP's) es por deposición-precipitación (DP). Este método permite que los AuNP's se depositen en la superficie de un electrodo de fibra de carbono (GCE) y se unan covalentemente a un aptámero receptor de cocaína. Esta plataforma incrementa el área efectiva del electrodo y permite la carga de más aptámeros, lo que mejora la transferencia electrónica y con ello mejora la señal electroquímica. Su protocolo establece las bases para otros métodos electroquímicos.

Smolinska-Kempisty (Smolinska-Kempisty et al. 2017) construye un sensor potenciométrico para detección de cocaína a través de un tubo que contiene nano MIP con diferentes membranas. Presenta gráficas de linealidad (respuesta vs concentración) pero no presenta validación.

Thibert (Thibert et al. 2014) desarrolla un polímero impreso molecularmente (MIP, Molecularly Imprinted Polymer) para la extracción selectiva de cocaína y sus metabolitos. Fue evaluado en suero y orina con un LOQ de 0.5 ng/mL.

Vidal (Vidal et al. 2016) innova al utilizar un inmunoensayo con enzimas ligadas a partículas magnéticas (Magnetic Particles Enzyme-Linked Immunoassay,

mpEIA) que permite incubaciones más rápidas, tiene reproducibilidad mejorada y bajo consumo de anticuerpos y enzimas conjugadas gracias al uso de campos magnéticos. Se usan partículas con propiedades magnéticas y previamente tratadas con agentes afines (como la proteína G) que puedan unirse a los anticuerpos de cocaína selectivamente. Prueba su trabajo en Suero, saliva y orina, obteniendo LOD de 0.06 ng/mL, 0.15 ng/mL y 0.09 ng/mL respectivamente.

Nakayama (Nakayama et al. 2016) propone el uso de un anticuerpo monoclonal para marcar la molécula. El estudio no se realiza sobre alguna matriz biológica, sino directamente sobre la droga para saber si funciona. No presenta validación.

6. Discusión

De los 174 artículos revisados en total, se observa que solo 15 estudios optaron por una extracción líquido-líquido. Esto confirma que no es una opción factible en términos de viabilidad para los laboratorios por la toxicidad de los solventes usados y el tiempo invertido para los análisis.

Por otro lado, 56 procedimientos utilizan la extracción en fase sólida para mejorar la detección de la droga en diversas matrices, siendo el cabello la matriz en donde más se utiliza dicho procedimiento (19 en total), seguido de cerca por la orina con 18 procedimientos. En el caso del cabello, se puede explicar de manera sencilla, toda vez que es una matriz sólida compuesta de diversos materiales que es susceptible a la contaminación, por lo que es necesario realizar una purificación y concentración del analito, proceso para el que la SPE es muy útil. En el caso de la orina, la presencia de sales inorgánicas y otros residuos hidrofílicos dificulta el análisis al ser compuestos que perjudican los resultados cromatográficos, así, la separación y pre-concentración de los analitos son pasos necesarios para obtener mejores resultados. (Juan Sánchez-González et al. 2016)

Las innovaciones en cuanto a métodos de extracción son principalmente enfocados en disminuir las cantidades de reactivos y de muestras usadas, y solo unos cuantos se enfocan en la ciencia amigable con el ambiente, es decir, en buscar alternativas de extracción que no contaminen o que no sean tóxicos.

Para métodos de análisis, siguen existiendo dos técnicas que son los estándares.

La GC es un método que pocos analistas eligen debido al largo proceso de tratamiento de las muestras. Además de un proceso de descontaminación en el caso del cabello, la extracción y la derivatización necesaria de las muestras elevan el tiempo de análisis y su costo, así como el uso de recursos. En ese sentido, también son pocos los avances y/o nuevas tecnologías que se proponen para este método analítico. Solo 30 de los estudios revisados utilizan GC ya sea como método de análisis principal o como método comparativo sobre otras técnicas.

La cromatografía de líquidos se ha convertido en el estándar de oro para el análisis de drogas, en todas sus variaciones: LC, HPLC o la más reciente, UHPLC, mejorando conforme avanza la tecnología. Igualmente, el desarrollo de nuevos métodos de detección como TOF o MALDI que son pequeñas modificaciones que pueden ser adaptadas a lo ya existente para mejorar la sensibilidad, la velocidad o el tiempo de trabajo. En ese sentido, se busca innovar sobre lo ya existente antes que crear un método totalmente nuevo.

También existen métodos inmunológicos que, aunque se usaban poco anteriormente, sus innovaciones consisten principalmente en facilitar la detección con métodos como fluorescencia o complejos coloridos para hacerlo más visual. La desventaja de estos métodos es que difícilmente son cuantitativos y no sirven para fines académicos. Se enfoca en detecciones sencillas como hacer cumplir la ley en conductores o determinar si un paciente bajo tratamiento ha dejado de consumir o por el contrario lo sigue haciendo a escondidas del doctor.

En cuanto a otras alternativas, existen avances prometedores como los polímeros impresos molecularmente, los sensores basados en reconocimiento de DNA o los chips que minimizan todo: equipos y reactivos.

Comparar los LOD y LOQ es útil para cuando se tiene establecido un laboratorio y se desea escoger un método analítico de acuerdo a los objetivos que se persiguen. Si se trata de un laboratorio académico, casi cualquier método sirve, debido a que casi todos los límites están del orden de nanogramos, suficiente para una muestra cualquiera de una persona adicta. Si se trata de un laboratorio ambulante, como los que utilizan en países europeos principalmente, para hacer pruebas de rutina a conductores, bastará con uno que sea barato y rápido (en cuestión de minutos) y sin usar muchos componentes tecnológicos, humanos y químicos. Si por el contrario, es necesario establecer un límite muy bajo en donde hasta la más mínima cantidad importa para determinar alguna causa toxicológica o en donde la libertad de la gente dependa de una diferencia mínima, se optará por tener la tecnología más avanzada que permita detectar la droga del orden de picogramos.

Después de revisar estos artículos, se ha propuesto un método de acuerdo a las capacidades y recursos del laboratorio de licenciatura en Ciencia Forense de la Facultad de Medicina de la UNAM. Dicho método involucra una extracción en fase sólida con MeOH y posteriormente, el uso de un equipo de HPLC-MS/MS para el análisis de las muestras de orina que se pueden obtener de alumnos de la UNAM en una primera fase.

La propuesta con especificaciones del material y los pasos a seguir están especificadas en el anexo 2

7. Conclusiones

El avance en las técnicas de análisis ha permitido que cada vez sean más las matrices biológicas utilizadas para la determinación de consumo de drogas de abuso, y que los límites de detección y cuantificación sean más bajos, todo dependiendo del tipo de análisis que se realice y los resultados a los que se quiera llegar.

La revisión hecha en este tema monográfico de actualización ha permitido expandir el conocimiento y encontrar alternativas a los métodos tradicionales que representan un avance en la sensibilidad y facilidad de realizar los estudios y al mismo tiempo, en algunos casos, disminuir costos para hacerlos más accesibles a aquellos investigadores que cuentan con pocos recursos.

Anexo 1. Lista de artículos consultados ordenados según el esquema del capítulo 5

Tabla 1. Artículos que usan SPE como método de extracción con Cromatografía de gases

Ref.	Autor	Matriz	Tratamiento previo	SPE	Técnica de detección	Condiciones Equipo	LOD	LOQ
1	Agius, Ronald	Cabello	Lavado CH ₂ Cl ₂ 10 minutos, Lavado CH ₃ OH , secado 50 °C	NaHCO ₃ /K ₂ CO ₃ , extraer con CH ₃ Cl/isopropanol (90:10), derivatización con PFPA (50 µL) + PFP (25 µL)	GC/MS	GC - QP 210, Columna capilar Zebron ZB-5MS , C18		
2	Agius, Ronald	Cabello	Ultrasonificación (2h) en buffer fosfatos	NaHCO ₃ /K ₂ CO ₃ , extraer con CH ₃ Cl/isopropanol (90:10), derivatización con PFPA (50 µL) + PFP (25 µL)	ELISA, confirmación con GC/MS	GC - QP 210, Columna capilar Zebron ZB-5MS , C18	0.004 ng/mg	0.04 ng/mg
3	Aleksa, Katarina	Cabello	10 mg muestra lavado CH ₂ Cl ₂ (1 min) x 2	SPME - acondicionamiento con 2 mL CH ₃ OH. Muestra. Secado. Reconstituir 2 mL PBS (0.1 M) y 2 ML HCl (0.1 M). Eluir CH ₂ Cl ₂ /isopropanol (80:20) y NH ₃ OH (2%)	GC/MS	GC - QP 210, columna capilar FourFactor	0.13 ng/mg	0.4 ng/mg
61	Fucci, Nadia	cabello	20 mg muestra lavado 1 min CH ₂ Cl ₂ . 1 mL MeOH + 20 µL IS. Incubación 60 °C, toda la noche. Evaporado. 20 µL PBS	SPME. Polidimetilsiloxano fused silica. DI 80 °C 1 h.	DI-GC/MS	ion monitoring mode. Electron impact mode.	0.2 ng/mg	

66	Gouveia, carla	Cabello	Lavado 5 mL CH ₂ Cl ₂ + 5 mL H ₂ O + 5 mL MeOH (x2). 20 mg muestra + 3 mL MeOH/HCl 0.1M (2:1) + 40 µL IS. Incubación 16 h, 65 °C. Centrifugación 5 min 3500 g, Añade 5 mL KH ₂ PO ₄ .	Acondicionamiento 2 mL MeOH + 2 mL H ₂ O. Lavado 2 mL HCl 0.1 M + 2 mL MeOH. Secado al vacío. Elución 2 mL CH ₂ Cl ₂ /isopropanol/NH ₄ OH (80:20:2). Evaporación. Derivatización 50 µL MSTFA. Mezcla 30 min 80 °C	GC-MS	Columna capilar Agilent VF-5 ms.	0.01 ng/mg	0.03 ng/mg
95	López-Guarnido, O.	cabello	Lavado Tween 80 (0.1%) + H ₂ O. 1 mm muestras. Digestión 0.5 mL dithiotreitol 37 °C 2 h. Digestión 0.5 mL pronase 37 °C toda la noche.	HLB Oasis. Acondicionamiento 2 mL MeOH + 2 mL H ₂ O. Muestra + 1 mL buffer bórax (100 mM, pH 9). Lavado 2 ml MeOH 5% + 2 mL NH ₄ OH 20% (x2). Secado al vacío. Elución 2 mL ácido acético 2% (en MeOH). Evaporación. Reconstitución 40 µL BSTFA/TMSC (99:1) para derivatización a 100 °C 20 min. Inyectado inmediato	GC/MS	Columna HP-5MS. Modo SIM	0.01 ng/mg	0.2 ng/mg
100	Miguez-Framil, Martha	cabello	Lavado con jabón diluido y agitación. Secado y pulverizado. 0.05 g + 20 µl IS. Mezclado en agente dispersivo (aluminio) (MSPD - Matriz solid phase dispersion)	Acondicionamiento (directo en jeringa) 2 mL MeOH + 2 mL H ₂ O + 1 mL buffer boratos. Elución 4 mL HCl 0.6 M con bomba de vacío. Separación de jeringa. Lavado 2 mL H ₂ O/EtOH (95:5) + 2 mL H ₂ O /MeOH/NH ₄ OH (78:20:2). Elución 2 mL ác. Acético 2% en MeOH. Evaporación. Reconstitución 2 mL	ESI-MS/MS	Columna capilar HP-5. MRM	2.1 ng/g	3.5 ng/g

				acetonitrilo/H ₂ O/ác. formico (80:19.875:0.125) y derivatización 40 µL BSTFA/TMCS (99:1) 100 °C, 20 min				
121	Pritchett, Jeanita	cabello	Tratados con relajadores. Lavados con shampoo neutro y H ₂ O. Secado natural. 20 mg + IS + 2 mL HCl 0.1 N, incubación 45 °C 24 h. Neutralizados con KOH a pH 4-5	Acondicionamiento 2 mL MeOH + 2 mL PB (pH 6). Lavado 6 mL H ₂ O + 3 mL ác. Acético 1.0 M. Secado al vacío. + 6 mL MeOH. Elución 2 mL cloruro metileno/isopropanol/NH ₄ OH (78:20:2). Evaporación. Derivatización con 100 µL BSA 65C 30 min.	GC-MS	Columna capilar no polar DB-5 MS. Modo SIM		
150	Tassoni, Giovanna	cabello	Lavado H ₂ O + CHCl ₃ . Incubación toda la noche con 2 mL HCl (0.1N, 50 °C) + IS. Añade 2 mL PB (pH 6) + 130 µL NaOH (2M, pH 6)	Acondicionamiento 2 mL MeOH + 2 mL PB (pH 6). Lavado 2 mL H ₂ O + 3 mL HCl (0.1N) + 3 mL MeOH. Elución 2 mL CH ₂ Cl ₂ /isopropanol (8:2) + 2% NH ₄ OH Evaporación. Derivatización con 50 µL MSTFA 60 °C 20 min.	GC-MS	Columna fused silica	0.2 ng/mg	0.07 ng/mg
112	Ottaviani, G.	diente	Pulverización. Incubación 2 días en 2 mL HCl 0.1 N a 50 °C. Neutraliza 2 mL buffer fosfatos. Añade 130 µL NaOH 2M	Acondicionamiento 2 mL MeOH + buffer fosfatos. Lavado 2 mL H ₂ O + 2 mL HCl 0.1 N + 2 mL MeOH. Elución 2.5 mL CH ₂ Cl ₂ /2-PrOH (80:20) +2% NH ₄ OH. Derivatización 30 µL BSTFA + 1% TMCS	GC-MS	Columna ZB-5MS	0.01 ng/mg	0.05 ng/mg
2	Agius, Ronald	Orina	Lavado CH ₂ Cl ₂ 10 minutos, Lavado CH ₃ OH , secado 50	NaHCO ₃ /K ₂ CO ₃ , extraer con CH ₃ Cl/isopropanol (90:10), derivatización con PFPFA (50	ELISA, confirmación con GC/MS	GC - QP 210, Columna capilar Zebron ZB-5MS	0.3 ng/mL	2.5 ng/mL

			°C	μL) + PFP (25 μL)		, C18		
125	Rosado, T	orina	200 μL muestra + 100 μL buffer fosfato + 20 μL IS.	Acondicionamiento 250 μL MeOH + 250 μL ácido fórmico 0.1%. Lavado 50 μL àc. Fórmico 0.1% x 4. Elución 100 μL NH ₄ OH 1% en MeOH. Derivatización 50 μL MSTFA con 5% TMCS	MEPS-GC-MS	columna capilar HP-5ms, modo SIM		25 ng/mL
4	Alvear, Eduardo	Sangre	2 mL + 8 mL PB + 400 ng deuterado. Sonicación 30 min, centrifuga 3500 rpm 10 min,	2 ml CH ₃ OH + 2 ml PB. Lavado Hexanethyl acetate 80:20 y 50:50 acetona:cloroformo. Elución CH ₂ Cl ₂ /isopropano/NH ₃ (78:20:2) y acetato etilo/NH ₃ 98:2. Derivatización N.O-bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida con 1% trimetilclorosilano acetonitrilo 50:50	GC/MS	Columna DB-5MS	1.51 ng/mL	5.03 ng/mL
117	Pelicao, fabricio	sangre	1 mL + 6 mL PB (0.1M) mezcla 10 s. Sonicado 15 min. Centrifuga 1055 g, 15 min.	Acondicionamiento 2 mL MeOH + 2 mL PB (0.1 M). Lavado 1 mL H ₂ O + 0.5 mL àc. Acético 0.01 M. Vacío 5 min. + 50 μL MeOH. Elución A) 2 mL acetona/CHCl ₃ (1:1) x 2 (ácidos y neutrales). Elución B) acetato etilo/NH ₄ OH (98:2) (básicos). Evaporación. Derivatización 50 μL MSTFA 80 °C 30 min	GC-MS	Columna capilar HP-5. MRM	5 ng/mL	10 ng/mL
65	Gentili, S.	sudor	Parche + 5 μL IS + 200 μL HCl 1M. Reposo 60 min 60	Fibra expuesta a absorción sobre el espacio de la aguja de la SPME. Derivatización	GC/MS	Columna capilar ME siloxano	0.07 ng/pad	0.21 ng/pad

			°C. Añade 200 mg K ₂ CO ₃	con anhídrido acético.				
90	Lerch, Oliver	suero	0.6 ml muestra + 0.1 mL H ₂ O + 20 µL IS + 1 mL acetonitrilo + 0.1 mL isopropanol. Centrifuga 17530 g. Sobrenadante 0.75 mL +4.25 mL PB	Acondicionamiento 2 mL MeOH + 2 mL PB. Lavado 2 mL H ₂ O + 2 mL ác. Acético (0.15 M) + 2 mL MeOH. Evaporación. Elución 2 mL CH ₂ Cl ₂ /isopropanol/NH ₄ 25% (40/10/1). Evaporación. Reconstitución 0.2 mL en isoctano/piridina/MSTFA (14:5:1) para derivatización.	GC/MS	Columna HP-5MS. Autosampler 7683B	1.1 ng/mL	3.5 ng/mL

Tabla 2. Artículos que usan SPE como método de extracción con Cromatografía de líquidos

Ref.	Autor	Matriz	Tratamiento previo	SPE	Técnica de detección	Condiciones Equipo	LOD	LOQ
48	Ellefsen, Kayla	Aliento	Filtros c/boquilla para obtener la muestra. Añade 50 µL estándar interno + 6 mL ác. Fórmico 1%. Agitado. 3 mL + 3 mL ác. Fórmico 1% (x3 veces)	UCT clean Screen. Acondicionamiento 3 mL MeOH + 3 mL H ₂ O. Lavado 3 mL H ₂ O/ác. Fórmico (2%) + 3 mL MeOH/ác. Fórmico (2%). Secado. Elución 3 mL MeOH/NH ₄ OH (95:5). Evaporación. Reconstitución en fase móvil 200 µL	LC-HRMS (LC-MS/MS)	Columna phenomenex Synergi-Polar RP. Modo HESI-II	0.015 ng/mL	0.025 ng/mL
52	Favretto, Donata	Cabello	Lavado con 10 mL SDS 10% + 10 mL H ₂ O + 10 mL acetona 3 minutos. Secado 60 °C, 30 min. 50 mg muestra + 3 mL MeOH/TFA (90:10) + IS. Ultrasonicación 1 h. Incubación 45 °C. Centrifugado 3690 rpm 15 min. Evaporación. Reconstituido 3 mL PB 0.1M	Acondicionamiento 2 mL MeOH + 2 mL PB (0.1 M, pH6), Muestra 1 mL. Lavado 3 mL H ₂ O + 0.5 mL ác. acético (0.01M). Secado al vacío. Elución 1.5 mL acetato etilo/NH ₄ OH (2%). + 1.5 mL CH ₂ Cl/isopropanol/NH ₄ OH (78:20:2)	LC-HRMS	Columna Atlantis T3. Modo ESI +	0.03 ng/mg	3.8 ng/mg

55	Fernández, María del Mar	Cabello	Lavado con CH ₂ Cl ₂ . Sonicación 2 min. Pulverización. Incubación con 1 mL MeOH 45 °C 4 h en baño de agua bajo sonicación. Centrifugado 14000 rpm 5 min. Sobrenadante transferido + 2.5 µL buffer acetato sodio	Intercambio catiónico. Acondicionamiento 1 mL MeOH + 1 mL buffer acetato de sodio (0.1M, pH4). Lavado 1 mL HCl 0.1N + MeOH. Secado al vacío. Elución 1 mL MeOH/NH ₃ (95:5). Evaporación. Reconstitución 300 µL buffer formato amonio 0.05 mM (5% ácido formico)	UPLC-MS/MS	Columna BEH Phenyl. Modo ESI +, MRM	no validado	
73	Imbert, L.	Cabello	Lavado 10 mL H ₂ O + 10 mL CH ₂ Cl ₂ (1 min) x 2. Secado, cortado. 20 µL IS (2mg/L) + 3 mL PB (0.1N, pH5) incubación 18 h, 45 °C. Centrifuga 3000 rpm 5 min.	MCX oasis. Acondicionamiento 2 mL MeOH + 3 mL PB (pH% 0.1N). Lavado 2 mL H ₂ O + 1.5 mL HCl 0.1N. Secado. Lavado 2 mL MeOH. Elución 3 mL CH ₂ Cl ₂ /2-propanol (80:20). Evaporación. Reconstitución 50 µL acetonitrilo/buffer formato (2mM, pH 3) (5:95).	LC-MS/MS	Columna Atlantis T3. Modo ESI +, MRM	0.005-0.030 ng/mg	0.05 ng/mg
124	Ropero-Miller, Jeri	cabello	Lavado con agua. Sonicado 3 h 75 °C. En buffer fosfatos acido (pH 2.7, 0.025M). Decantación. Reconstitución buffer fosfato sodio (pH 6.0)	Elución cloruro metileno/MeOH/NH ₄ OH (78:20:2) Evaporación. Reconstitución MeOH	LC-MS/MS			

136	Schaffer, Michael	cabello	12 mg muestra + 2 mL PrOH. Vortex, 15 min, 37 °C. Añade 2 ml PB (0.01 M con 0.1% BSA). 60 min, 37 °C (x2) Solución digestiva (pH 5.5) 1 mL 37 °C, 8 h.	Lavado 5 mL H ₂ O + 3 mL HCl 0.1M + 9 mL MeOH. Elución 2 mL Cloruro metileno/isopropanol/NH ₄ OH (80:20:2). Evaporación. Reconstitución 150 µL cloruro metileno + 25 µL N-N dimetiformamida. Calentar 120 °C 5 min. Añade H ₂ SO ₄ 0.1M + Hexano/acetato etilo (9:1). Evaporación.	LC-MS/MS	Columna Thermofisher BETASIL C8. ESI + MRM		
138	Sergi, manuel	cabello	1 cm muestra + 5 mL PB (0.1M, pH 6). Vortex. Lavado 5 mL isopropanol + 5 mL CH ₂ Cl ₂ . Colectar lavado y evaporar. Reconstituir 1 mL ác. fórmico en MeOH (10 mM. PLE: 25 µL MeOH + IS(1 ng/µL). Un ciclo de extracción con H ₂ O/MeOH (80:20) a 100 bar, 150 °C 1 min precalentamiento y 7 min calentamiento, 5 min reposo	Acondicionamiento 1 mL MeOH + 1 mL H ₂ O/MeOH (80:20). Lavado 1 mL H ₂ O. Secado al vacío. Elución 0.5 mL ácido fórmico en MeOH (10 mM)	LC-MS/MS	Columna fase reversa C18 kinetex XB	0.5 pg/mg	1.8 pg/mg
98	Mella, M	Hueso	Pulverizado con bolas de metal + 4 mL MeOH 90 s, 5000 rpm x 3	Lavado 1: 2 mL H ₂ O + HCl 0.1N. Lavado 2: 2 mL MeOH + ác. Fórmico 2%. Elución 2 mL MeOH + NH ₄ OH 5%.	LC-MS/MS	Columna Acquity HSS T3, ESI +		

23	Bujak, renata	orina	1 mL muestra + rastros de soluciones estandar. 200 mg polimero empacados en columna de 3 cm con filtros de PTFE	Extracción polimero. Acondicionamiento H ₂ O y MeOH. 1 mL muestra. Elución MeOH/NH ₃ (19:1) 2 mL x 2. Evaporación. Redisolución 1 mL fase móvil.	HPLC-TOF/MS	Columna C18 Ascentis express. Ion positivo.		
38	Daems, Devin	orina		Acondicionamiento 3 mL MeOH + 3 mL H ₂ O + 1 mL PB (0.1 M, pH6). 1 mL muestra. Lavado 2 mL HCl (0.1M) + 3 mL MeOH. Secado. Elución 6 mL CH ₂ Cl ₂ /isopropanol (80:20) con 2% NH ₄ OH. Evaporación. Reconstitución 125 µL MeOH	UPLC/potenciometría. Confirmación UPLC-MS/MS	Columna BEH C18. Triple cuadrupolo. ESI positivo. Electrodo potenciométricos.		
54	Fernández, María del Mar	orina	100 µL orina+ 100 µL IS. 25 µL B-glucuronidasa. Mezcla. Incubación 37 °C 16 h. + 675 µL H ₂ O	Oasis MCX. Acondicionamiento 1 mL MeOH + 1 mL buffer acetato sodio (0.1 M, pH 4) + 3 mL aire entre solventes. Lavado 0.8 mL HCl 0.1 M + 0.8 mL MeOH (x4). Elución 1.5 mL CH ₂ Cl ₂ /2-propanol/NH ₃ (80:18:2). Evaporación. Reconstitución 1 mL buffer formato amonio	UPLC-MS/MS	Columna BEH Phenyl. Modo ESI +, MRM		15 ng/mL
92	li, Xiaowen	Orina		Oasis HLB. Acondicionamiento 1 mL MeOH + 1 mL H ₂ O + 1 mL buffer NaHCO ₃ + H ₃ BO ₃ (pH 9.6). 1 mL muestra diluida.	HPLC-LTQ-orbitrap-MS	Columna Hypersil PFP. ESI +. Mod DDA	0.5 ng/mL	

				Lavado 1 mL buffer + 1 mL H ₂ O. Secado. Elución 1 mL ACN/H ₂ O (95:5) x 2. Evaporación. Reconstitución 0.2 mL buffer ACN (95:5)				
131	Sánchez-González, Juan	Orina		MIP- μ SPE: acondicionamiento sonicación con 5 mL KH ₂ PO ₄ /NaOH buffer (0.1M/0.1M, pH 5.5) por 10 min. 5 mL muestra + IS incubar 30 °C 15 min con agitación. Quitar MIP y lavar con 5 mL buffer previo. Elución 5 mL CH ₂ Cl ₂ /2-Pr-OH/NH ₄ OH (72:20:8) con radiación ultrasonido (37 kHz) por 8 min. Evaporación. Redisolución 50 μ L acetato amonio 2mM en MeOH	HPLC-MS/MS	Columna Kinetex 5u C18 100 A	0.049 ng/mL	0.081 ng/mL
133	Sánchez-González, Juan	Orina		MMIP- μ SPE: acondicionamiento 2 mL KH ₂ PO ₄ /NaOH buffer (0.1M/0.1M, pH 5.5). 1.8 mL muestra + 0.2 mL IS + 200 μ L hexano (precisión). incubar 25 °C 10 min con agitación. Quitar MMIP y lavar con 2 mL buffer previo. Elución 2 mL CH ₂ Cl ₂ /2-Pr-OH/NH ₄ OH (75:20:5) con sonicación (37 kHz, 5 min). Evaporación. Redisolución	HPLC-MS/MS	Columna Kinetex 5u C18 100 A	0.12 ng/mL	0.41 ng/mL

				40 µL acetato amonio 2mM en MeOH				
144	Snozek, Christine	orina		Acondicionamiento 3 mL MeOH + 3 mL buffer ác. Acético (0.1M). Lavado 3 mL buffer ác. Acético + 3 mL MeOH. Secado al vacío. Elución 3 mL CH ₂ Cl ₂ /isopropanol/NH ₄ OH (78:20:2). Evaporación. Reconstitución 200 µL fase móvil A	LC-MS/MS	Columna Agilent Rapid resolution HT XDB-C8. ESI +		
147	Sundstrom, Mira	orina	1 mL + 10 µL B-glucuronidasa. Incubación 37 °C toda la noche. Añade 2 mL PB (0.2M, pH 5-6) + 10 µL IS	Acondicionamiento 2 mL MeOH + 2 mL H ₂ O + 3 mL PB (0.1 M pH 6). Lavado 1 mL PB + 1 mL ác. Acético 1M. Vacío 5 min. Elución fracción ácida 3 mL acetato etilo/hexano (25:75). Lavado 1 mL MeOH y elución fracción básica acetato etilo/NH ₃ (98:2). Se combinan fracciones y se evaporan. Reconstitución con 150 µL MeOH (45% ác. fórmico (0.1%))	UHPLC-HR-TOF-MS	Columna Waters HSS T3 ESI +	7.0 ng/mL	
164	Xiong, Lingjuan	orina	100 µL + 100 µL ác fórmico 2% + 25 µL IS. Centrifuga 14000 rpm 10 min.	Acondicionamiento 200 µL MeOH + 200 µL H ₂ O. Lavado 100 µL MeOH (x2). Elución 50 µL MeOH/H ₂ O (95:5 + 7.5% NH ₄ OH), Lavado 10 µL MeOH. Evaporación. Reconstitución 50 µL H ₂ O	UHPLC-QTOF-MS	Columna HSS T3	0.5 ng/mL	2.5 ng/mL

166	Yang, F.	orina	1 mL muestra + 20 µL NaOH 5% + 10 µL IS.	10 mg absorbentes + muestra. Ultrasonificación 1 min. Agitación 20 min 300 rpm. Magneto fuerte para separar partículas. Elución 1 mL MeOH/ACM (4:1)	HPLC-MS/MS	Columna Eclipse XDB C18	0.29 ng/mL	0.92 ng/mL
50	Ellefsen, Kayla	plasma	0.1 mL muestra+ 0.4 mL H ₂ O + 10 µL estandar interno.	Acondicionamiento MeOH + ác. Trifluoroacético (0.06%). Lavado H ₂ O. Elución 1 mL MeOH + ác. Trifluoroacético 0.06%	LC-MS/MS	Columna PFP propyl. Modo ESI +. Detección MRM.		1 ug/mL
97	Mascini, Marcello	plasma	Fase estacionaria: péptido modificado (de acuerdo a docking) disuelto en 5 mL EtOH/H ₂ O (80:20). Plasma: 800 µL muestra + 10 µg cocaína. Dilución en 100 µL Tris-HCl + 100 µL MeOH. Sonicación y centrifugación 12000 rpm. Sobrenadante tomado a SPE	Acondicionamiento Tris-HCl (pH 5). Lavado con 1 mL H ₂ O y elución con 1 mL ácido fórmico 5mM en MeOH	Docking. Confirmación con LC-MS/MS	Hyperchem 8.0.5 (docking). Columna Kinetex HILIC fase reversa. . ESI +, MRM		

132	Sánchez-González, Juan	Plasma		MIP- μ SPE: acondicionamiento sonicación con 5 mL $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ buffer (0.1M/0.1M, pH 5.5) por 10 min. 0.1-1 mL muestra (diluida a 5 mL con buffer) + IS incubar 50° C 10 min con agitación. Quitar MIP y lavar con 5 mL buffer previo. Elución 5 mL $\text{CH}_2\text{Cl}_2/2\text{-Pr-}$ $\text{OH}/\text{NH}_4\text{OH}$ (76:20:4) con radiación ultrasonido (37 kHz) por 8 min. Evaporación. Redisolución 100 μL acetato amonio 2mM en MeOH	HPLC- MS/MS	Columna Kinetex 5u C18 100 A	0.061 ng/mL	0.20 ng/mL
42	Di Rago, Mateo	saliva		200 μL muestra diluida en PBS + 10 μL estándar interno + 20 μL estándar calibración + 200 μL buffer carbonato amonio (pH 9, 2M). Vórtex. + 1 mL Cloroformo/isopropanol (9:1). Centrifuga 15,000 rpm 2 min. Evaporación. Reconstitución 50 μL MeOH	LC-MS/MS	MRM, modo ESI +. Columna Kinetex C18		

102	Montesano, Camilla	saliva	Obtenida con jeringa MEPS equipada con sorbente C18. Diluida en agua para reducir viscosidad	Acondicionamiento 250 µL MeOH + 250 µL H ₂ O/MeOH (80:20). 120 µL muestra + 80 µL H ₂ O + 40 µL NH ₃ (25 mM en MeOH) + 10 µL IS (250ng/mL). Sonicación 6 min, centrifuga 10000 g 5 min. Sobrenadante se pasa a través del MEPS para mejorar retención de analitos. Lavado 100 µL NH ₃ (50 mM en H ₂ O/MeOH 90:10) 3 veces. Elución 100 µL ác. fórmico (5 mM en MeOH)	LC-MS/MS	columna fase reversa PFP kinetex. Modo PI , MRM	0.3 ng/mL	1 ng/mL
17	Bidny, S.	Sangre	100 µL sangre + 300 µL estándar + 3 mL ACN. Centrifugado y se obtiene capa orgánica. Reconstituido 200 µL MeOH.	Procedimientos diversos según la naturaleza de las drogas (ácidas, básicas o neutrales)	UPCL-QTOF-MS	Columna HSS C18, ESI + y ESI -	0.005 mg/L	
18	Birkler, Rune	sangre		Acondicionamiento 2 mL MeOH + 2 mL H ₂ O. Muestra 1 g + 25 µL deuterado + 9 mL buffer acetato amonio (pH 4, 0.1M), centrifuga 3000 g x 10 min. Lavado 2 mL H ₂ O + 2 mL HCl 0.1M + 2 mL H ₂ O:MeOH (95:5). Elución acetato etilo (5% NH ₃ OH).	UPLC-TOF-MS	Columna BEH C18. TOF-MS modo positivo electrospray ionization,		0.4 ng/mL
19	Bjork, Marie	sangre	200 µl muestra + 20 µL estándar, + 800 µL ácido fórmico 1%.	Acondicionamiento MeOH + H ₂ O. Lavado 900 µL H ₂ O + 900 µL ácido fórmico (5%	LC-MS/MS	UPLC CSH C18. Triple cuadrupolo.		0.010 ng/mL

			Centrifuga 1000g 10 min,	MeOH) 2 veces. Elución 250 μ L acetonitrilo con 8% NH_3 (25%). Secado. Reconstitución 200 μ L MeOH/ H_2O 50:50		Positive electrospray ionization mode. MRM		
28	Chen, X.	Sangre	Sangre + IS (1:1). Sobrenadante + 500 μ L Ác. fórmico 4%	Acondicionamiento 1 mL MeOH + 1 mL H_2O . Lavado 1 mL MeOH x 2. Elución 500 μ L MeOH/ H_2O (95:5 + 7.5% NH_4OH)	LC-MS/MS	Columna Atlantis T3	0.9 ng/mL	3.0 ng/mL
68	Guale, Fessesework	sangre	1 mL muestra + 1 mL IS (20 ng/mL) + 4 mL H_2O . Centrifuga 10 min 3500 rpm. Sobrenadante + 2 mL PBS 100 mM.	SPE automatizado Caliper RapidTrace. Acondicionamiento 3 mL MeOH + 3 mL H_2O + 1 mL PBS 100 mM. 3.5 mL Muestra. Lavado 3 mL MeOH + 1 mL ác. Acetico. Elución 3 mL Hexano/acetato etilo (1:1) (Fracción 1). Lavado MeOH 3 mL. Elución 3 mL cloruro metileno/isopropanol/ NH_4OH (78:20:2). (Fracción 2). Ambas fracciones juntar y evaporar. reconstituir 200 μ L MeOH 10%	LC-TOFMS	Columna Agilent Eclipse Plus C18. Modo ion positivo. (TOF-MS)		
115	Pedersen, Anders	sangre	200 μ L muestra + 20 μ L IS + 800 μ L MeOH en acetato amonio buffer (10%, pH 4.1). Distribuido en 96 platos. Agitado. Centrifuga 1000 g 1 min.	SPE automatizado. Acondicionamiento MeOH + H_2O . 800 μ L mezcla previa. Lavado 800 μ L MeOH en H_2O (5% (x4)+ 800 μ L MeOH en H_2O (30%) (x2) + 800 μ L MeOH en H_2O (5%). Elución 900 μ L acetonitrilo con 8%	UHPLC-TOF-MS	Columna BEH C18 acuity. ESI +,	0.001 mg/kg	

				NH ₃ (25% en H ₂ O). Evaporado. Reconstitución 50 µL MeOH en H ₂ O (25%, 1% ác. fórmico) Agitado 3 min.				
127	Rosano, Thomas	sangre		Columnas de extracción. Acondicionamiento 3 mL MeOH + 3 mL H ₂ O + 1 mL PB (0.1 M pH 6.0) 1 mL muestra + 30 µL IS. Sonicación 15 min. 2 mL PB. Lavado 2 mL H ₂ O + 2mL HCl (0.1 N) + 2 mL MeOH. Secado al vacío 15 min. Elución 3 mL solvente (NH ₄ OH/isopropanol/cloruro metileno 2:20:80). Evaporación. reconstituir 150 µL fase móvil	UPLC- TOF/MS. Validación UPLC- MS/MS	Columna C18 alkyl-bonded. Modo ESI +. SRM		

Tabla 3. Artículos que usan SPE como método de extracción con otras técnicas

Ref.	Autor	Matriz	Tratamiento previo	SPE	Técnica de detección	Condiciones Equipo	LOD	LOQ
11	Baciu, Tatiana	cabello	1.5 cm muestra + 2 mL DCM. Secado. 50 mg + 2mL HCl 0.1 M, incubación noche 45° C. Filtrado por filtro PTFE, 5 mL H2O miliQ.	Capilar al vacío. 930 bar con MeOH, SPE en línea. Elución con MeOH + 2% CH ₃ COOH a 20 mbar x 20 seg	CE		0.02 ng/mg	6 ng/mg
24	Bynum, Nichole	orina	200 µL muestra + deuterado. + 600 µL PB (pH6 100 mM),	SPE polychrom. Lavado 1 mL H2O + 1 mL HCl (0.1M). Secado N ₂ . Lavado MeOH 1 mL + 1 mL acetato etilo. Elución 1 mL CH ₂ Cl ₂ /isopropanol/NH ₄ OH (80:18:2)	LDTD-MS/MS	LDTD-APCI ionization interface.	0.5 ng/mL	
27	Chantada, María P.	orina	Preparación de polímero sensor.	Acondicionamiento 2 mL MeOH + 2 mL PB (0.1 M, pH6), Muestra 1 mL. Lavado 3 mL H ₂ O + 3 mL HCl (0.1M) + 9 mL MeOH + 3 mL NH ₄ OH. Secado al vacío. Elución 3 mL cloroformo/isopropanol (4:1). Evaporación. Redisolución en 100 µL 0.1M/0.1M KH ₂ PO ₄ /NaOH	modified Mn dopedZnS quantum dots, confirmación HPLC-MS/MS	Columna C18 Kinetex 5u.	76 µg/L	14 µg/L

72	Hezinova, vera	orina	Muestra centrifugada 2680 g 10 min. Sobrenadante sujeto a SPE	SCX superclean. 500 µL orina/H ₂ O (1:1). + 100 µL ác. 100 mM. Acondicionamiento 3 mL MeOH + 3 mL H ₂ O + 3 mL ác. fosfórico. Muestra. Evaporación. Lavado 2 mL ác. fosfórico 10 mM + 1 mL ac. Acético + 2 mL MeOH. Elución 4 mL NH ₃ (3% en MeOH). Secado. Reconstitución 1 mL MeOH	CZE-ESI-MS (Capillary Zone Electrophoresis)		5 ng/mL	
123	Rodriguez-Lafuente, Angel	Orina		SPME capa delgada. Capa C18-PAN. Acondicionada con MeOH/H ₂ O (1:1) 30 min Proceso de extracción a diferentes tiempos en equilibrio	DART-MS/MS	Modo +. Helio gas acarreador		
31	Christodoulides, Nicolaos	saliva		Acondicionamiento 3 mL MeOH + 3 mL H ₂ O. Muestra + 1 mL PB 50%. Lavado 3 mL H ₂ O + 2 mL acetato potasio (pH4) + 3 mL MeOH. Secado. Reconstitución 0.1 mL ácido fórmico 1%/MeOH (96:4)	p-BNC (Programmable bioanalytical chip). Confirmación LC-MS/MS	Columna Metabasil 3 Basic. Modo EI positivo		
39	Dana, Kathryn	saliva	Saliva limpia, añadida con cocaína	Acondicionamiento con 1.3 mL MeOH + 1.3 mL H ₂ O. 2 mL muestra bombeado 1 mL/min. Secado. Elución 100 µL Hexano/acetato etilo (50:50) bombeado 1 mL/min. 25 µL de lo colectado, se carga a capilar SERS activo.	SERS (Surface Enhanced Raman Spectroscopy). Confirmación con GC-FID	UCT C8+ SCX Clean screen		

6	Antelo, Angel	Sangre	140 µL muestra + + 10 µL deuterado interno + 100 µL agua ultrapura. Secado. 5 mL EtOH, agitado, secado. Disolución en acetonitrilo/H ₂ O/acido fórmico (80:19.875:0.125)	Acondicionamiento 2 mL MeOH + 2 mL PB. 1 mL muestra + deuterado. Elución 3 mL H ₂ O + 3 mL HCl 0.1 N, + 9 mL MeOH + 3 mL NH ₄ 0.3 M. Secado al vacío. Elución CHCl ₃ /isopropanol (4:1) 3 mL, evaporado. Disolución 40 µL BSTFA-TMCS (99:1). Derivatización 100° C, 20 min	ESI-MS/MS	ESI ion positivo.		3.5 ng/mL (promedio derivatizaciones)
---	---------------	--------	---	---	-----------	-------------------	--	---------------------------------------

Tabla 4. Artículos que usan LLE como método de extracción con Cromatografía de gases

Ref.	Autor	Matriz	Tratamiento previo	LLE	Técnica de detección	Condiciones Equipo	LOD	LOQ
20	Breidi, Salah	cabello	50 mg muestra, lavado 3 mL CH ₂ Cl ₂ ,	LLE. 6 mL pentano. Centrifuga 10 min 2383 g. Fase orgánica + 25 µL HCl 2M. Evaporación. Reconstitución 60 µL hexano	Digestión enzimática, confirmación con GC-MS	Agilent XL EI/CI MSD triple axis detector. Columna capilar BP-X5 SIM	0.02 ng/mg	0.05 ng/mg
63	Gambelun ghe, cristiana	Cabello	Lavado + 20 µL IS (1µg/mL). Incubación 1 mL MeOH toda la noche. Evaporación. Añade PBS.	LLE. pH 8. CHCl ₃ /Isopropanol (9:1). Derivatización PFPA 50 µL y PFPOH 30 µL a 80° C 30 min. Evaporación. 25 µL acetato etilo para análisis	GC-MS	Electron Impact Mode. Equity 5 capilar column.	0.01 ng/mg	0.02 ng/mg
116	Pego, A.	cabello	50 mg muestra + 2 mL CH ₂ Cl ₂ 15 min 37° C. añade 2 mL MeOH + IS. Incubación 18 h, 50° C. Derivatización 100 µL ACN + 2 µL piridina + 2 µL butilcloroformato	LPME: fibra propileno 9 cm sumergida en eter dihexilo x 15 s. Llenar 50-70 µL HCl 0.05 M. Insertar la fibra en la fase orgánica de extracción. 10 min 2400 rpm. Secar. Reconstituir 50 µL acetato etilo	LPME-GC-MS	columna capilar HP-5ms, modo SIM	0.1 ng/mg	0.5 ng/mg
140	Silveira, Gabriela	leche materna	0.5 mL muestra + 50 µL IS + 0.5 mL buffer borato (pH 9.0) + 0.25 mg NaCl.	LPME: acondicionamiento: fibra de 8 cm de polypropileno en octanol 30 seg. Sonicación con H ₂ O. Sumerge solución HCl (0.4 M). Agitación 2400 rpm 30 min. Secado. Derivatización 25 µL BSTFA + 1% TMS + 25 µL ACN 60° C 30 min.	GC/MS con LPME	Columna HP-5MS. Modo SIM	6 ng/mL	10 ng/mL

Tabla 5. Artículos que usan LLE como método de extracción con Cromatografía de líquidos

Ref.	Autor	Matriz	Tratamiento previo	LLE	Técnica de detección	Condiciones Equipo	LOD	LOQ
88	Lendoiro, Elena	Cabello	50 mg muestra lavado 3 veces 2 mL CH ₂ Cl ₂ . Pulverizado. Incubación 2 mL acetonitrilo 50° C	LLE. Con Hexano/etilacetato. SPE	LC-MS/MS	Columna T3 atlantis, MRM		
89	Lendoiro, Elena	Cabello	Lavado 2 mL CH ₂ Cl ₂ x 2 min (x3). Secado a 70° C, 40 min. Pulverizado. Incubación 2 mL acetonitrilo + 50 µL Is, incubación 50° C, 12 h. Centrifuga 4000 rpm 10 min. Evaporación. Reconstitución 200 µL MeOH.	LLE: 4 mL Hexano/acetato etilo (55:45). Centrifuga 4000 rpm, 10 min. Fase orgánica evaporada Reconstitución 200 µL MeOH + 2 mL buffer boratos (pH 9). Y enviado a SPE. SPE: acondicionamiento 2 mL MeOH + 2 mL H ₂ O. Lavado 2 mL MeOH 5% + 2 mL H ₂ O/MeOH/NH ₄ OH (75:24.5:0.5) Secado 10 min. Evaporado. Reconstitución 100 µL fase móvil	LC-MS/MS	Columna T3 atlantis, MRM	2 pg/mg	
37	D'Avila, felipe	Meconio	225 mg muestra + 2 mL propileno. 25 µL estándar + 125 µL MeOH + 125 µL acetonitrilo/ 1% ác. Fórmico. Centrifugación 14000rpm 30 min. Filtrado PTFE	LLE. 225 mg muestra + disolvente polar + disolvente no polar. Filtrado PTFE.	LC-MS	Columna phenomenex Kinetex HILIC. Modo ESI+, análisis SIM	5 ng/mg	15 ng/mg
74	Jagerdeo,	orina	300 µL muestra +	SLE. Muestra + 3 mL cloruro	UPLC-	Columna Cortex	1 ng/mL	

	Eshwar		25 µL IS + 600 µL buffer acetato amonio (0.5M, pH 5) + 100 µL b-glucuronidasa. Incubación 30 min 68° C. Añade 600 µL H ₂ O + 80 µL NH ₄ OH.	metileno/isopropanol (95:5). 5 minutos reposo. Añade 4 mL cloruro metileno/isopropanol (95:5) x 2. Evaporación. Reconstitución 100 µl H ₂ O/acetonitrilo (95:5)	HRMS (orbitrap)	C18.		
56	Fernández, P.	Plasma		DLLME (dispersive LL Micro Extraction). 500 µl Plasma con drogas + 3.2 mL acetonitrilo. Centrifuga 4000 rpm 4 min. Sobrenadante + 220 µL CHCl ₃ + 4.5 mL H ₂ O + 50 µL NaOH 0.5M + 0.2 g NaCl. Baño ultrasónico 3.5 min. Centrifuga 4000 rpm 4 min. Evaporación. Reconstitución 100 µl fase móvil.	DLLME-HPLC	Columna RP18	13.9 ng/mL	46.2 ng/mL
93	Liu, Yongzhen	Plasma	100 mL muestra + 2 mL Piridostigmina Bromine (0.5 g/mL) + 4.5 mL HCl 2.4 N	LLE rango bajo. 10 µl IS + 0.2 mL NaHCO ₃ 1 M + 400 µl muestra. Extracción en 2.5 mL MTBE/cloruro metileno (3:1) 1 min. Centrifuga 1100 g 5 min. Fase orgánica evaporada. Reconstitución en 0.4 mL fase móvil	LC-ESI-MS/MS	Columna HILIC, ESI +, MRM		0.01 ng/mL
156	Valen, A.	saliva	0.4 mL muestra + 0.8 mL buffer. 200 µL muestra + 10 µL triton-X + 70 µL buffer formato	*SLE: elución 700 µL acetato etilo/heptano (4:1) X 2. Añade 30 µL HNO ₃ 0.1% en MeOH. Evaporado. Reconstitución 100 µL ACN/H ₂ O (10:90)	UHPLC-MS/MS	Columna Acquity BEH C18, ESI	0.018 ng/mL	0.182 ng/mL

			amonio					
170	Zancanaro , Ivomar	saliva		LLE: 0.5 mL muestra + 50 µL (NH ₄) ₂ CO ₃ + 1.3 mL acetato etilo/hexano (4:3). 1 mL de la fase orgánica evaporación y reconstituir en 250 µL fase móvil + IS	LC-MS/MS	Columna Luna C18, ESI +	0.26 ng/mL	0.52 ng/mL
53	Feliu, Catherine	sangre	100 µL muestra + 10 µL acetonitrilo + IS.	LLE. 500 µL CHCl ₃ + 500 µL etilacetato + 20 µL NaCO ₃ buffer (20%). Centrifuga 10000 g 5 min. Fase orgánica evaporada. Reconstitución 200 µL H ₂ O	UPLC-MS/MS	columna HSS T31.8 uM. Modo ESI+, MRM.	0.09 ug/L	2.5 ug/L

Tabla 6. Artículos que no usan método de extracción con Cromatografía de gases

Ref.	Autor	Matriz	Tratamiento previo	Técnica de detección	Condiciones Equipo	LOD	LOQ
45	Dufaux, bertin	cabello	3 cm muestra, lavado 5 mL CH ₂ Cl ₂ 10 min (x2). + 10 µL estándar interno. Incubación 18 h, 45° C. Evaporación. Derivatización 25 µL MBTFA. Incubación 90° C, 1 h.	ELISA; confirmación GC-MS	Columna HP-5 MS, modo SIM	0.005 ng/mg	0.0028 ng/mg
67	Gryczynski, Jan	Cabello		GC-MS			
77	Joya, Xavier	Cabello		EMIT, confirmación GC-MS		0.5 ng/mg	
110	Orfanidis, A.	cabello	Lavado 1.5 mL H ₂ O x3. Añade 1 mL MeOH + 20 µL IS. Ultrasonificado. Secado. Derivatización BSTFA + 1% TMCS	GC-MS	columna capilar HP-5ms, modo SIM	0.37 ng/mg	
119	Poon, S.	cabello	10 mg muestra lavado 1 mL DCM (x2) 1 min. Secado. 1 mL MeOH. Cortado. Incubado 18 h 56° C. Evaporación. Reconstitución PBS	ELISA, confirmación con GC/MS		0.13 ng/mg	
9	Arroyo, Amparo	saliva	1 mL muestra + 4 mL PB, centrifuga 10000 rpm, 10 min,	GC/MS	ion trap, electron impact ionization. Columna VF-5 (95% methyl suilicone, 5% fenil), detección MS	2.5 ng/mL	10 ng/mL
49	Ellefsen, Kayla	saliva	Muestra colectada en aparato especial: DrugTest 5000 cassette	Prueba rápida. Confirmación GC-MS			9.6 ug/mL
94	Lopez, Viorica	otro		GC-HRTOF-MS	Columna HP-5 MS, modo SIM. MPPI con VUV (vacuum ultraviolet)		

Tabla 7. Artículos que no usan método de extracción con Cromatografía de líquidos

Ref.	Autor	Matriz	Tratamiento previo	Técnica de detección	Condiciones Equipo	LOD	LOQ
15	Beck. Olof	Aliento	Filtro polímero + 7 mL MeOH + 100 µL standard (1 ng MDMA-d5 + 5.1 ng THC-d3). Baño ultrasónico 5 min. Sobrenadante + 1 ml MeOH. Secado.	LC-MS/MS	UPLC; ESI mode, ion positivo. Columna C 18 BEH	0.2 pg on column	0.6 pg on column
71	Henkel, K.	Biofilm dental	Muestra + 500 mL ACN + 10 mL IS ultrasonido. Evaporación. Añade 100 µL 2-propanol/HCl (3:1). Evaporación. Reconstituir en solvente	LC-MS/MS	Columna PFP , ESI +	2.5 pg/mg	10 pg/mg
5	Alves, Marcela	Cabello	Lavado 1 mL CH ₂ Cl ₂ + 1 mL MeOH. 5 mg muestra + deuterado. Final 0.1 ng/mg + 100 µL HCl 0.1 M, incuba noche 45° C. Centrifuga	LC-MS/MS	Agilent 6460 triple quadrapolo, electrospray ion, modo ion positivo		0.1 ng/mg
14	Baumgartner, Markus	cabello	Lavado 15 mL H ₂ O (2 min) + 10 mL acetona (2 min) + 10 mL hexano (2 min). Secado, cortado. Extracción 5 mL MeOH (16 h, ultrasonificación), + 3 mL MeOH (50 µL HCl 33%), (3h, ultrasonificación). Secado. Reconstituir 50 µL MeOH + 500 µL Formato amonio (0.2 mM)	LC-MS/MS	Qtrap 3200 Turbo V ion source, modo ESI. Columna de separación Synergi POLAR-RP 80 A		
21	Broecker Sebastian	Cabello	0-6 cm muestra. Lavado 1 mL H ₂ O + 1 mL acetona (x2). 20 mg muestra + 5 µL deuterado. 18 h incubación con 0.5 mL MeOH/Acetonitrilo/formato amonio 2mM (25:25:50). Fase líquida incubada con 0.5 mL misma mezcla 18 h.	LC-QTOF-MS	LC-QTOF-MS. ESI mode. Columna Zorbax eclipse C18 MS mode.	0.001 ng/mg	0.003 ng/mg
41	Di Corcia, D.	cabello	50 mg muestra lavado 2 mL CH ₂ Cl ₂ (x2). Secado, cortado. + 2 µL estándar interno + 2 mL MeOH. Incubación 15 h 55° C. Fase orgánica recolectada.	UHPLC-MS/MS	Columna BEH C18, modo ESI +, modo SRM	0.011 ng/mg	0.03 ng/mg
84	Koster,	cabello	Lavado 3 veces con 3 ML DCM 10 min.	LC-MS/MS	Triple quadrapolo.		30

	Remco		Evaporación. Reconstitución en 1.5 mL solvente. Evaporación. 1.5 mL solvente + 50 bolas de acero, sonicación 30 Hz 30 min. Sobrenadante tomado.		ESI + Columna HyPURITY		pg/mg
85	Kronstrand, R.	cabello	Lavado 2-propanol x 15 min. 3 lavados con buffer fosfatos 30 min. Extracción con buffer/solvente 37° C 18 h.	UHPLC-MS/MS	Columna silica T3		0.10 ng/mg
86	Kronstrand, Robert	Cabello	20 mg muestra. Incubación en 500 µL MeOH/acetonitrilo/buffer formiato (10:10:80) 18 h.	HPLC-TOF/MS	columna T3 silica.	0.2 ng/mg (Threshold)	
91	Leung, K.	Cabello	Lavado acetona + 0.1% SDS. Secado. Añade MeOH/ACN/formiato amonio 8% (25:25:50). Secado. Reconstitución 50 µL ACN 3% y ácido fórmico 0.1%	LC-MS/MS	Columna Zorbax eclipse C18, ESI +		
101	Miyaguchi Hajime	cabello	0.2 mg muestra + 4 µL IS (10 mg/mL) + 50 µL formiato amonio (pH 3.5, 0.1 M). Agitado y pulverizado. Filtrado membrana PVDF	LC-MS/MS linear ion Orbitrap	Columna UK-C18, SRM y MRM		0.10 ng/mg
104	Morris-Kukoski, Cynthia	cabello	12 mg muestra + 2 mL PrOH. Vortex, 15 min, 37° C. añade 2 ml PB (0.01 M con 0.1% BSA) 30 min, 37° C (x2) Solución digestiva (pH 5.5) 1 mL 37° C, 12 h.	LC-MS/MS	Columna C8 Waters Xbridge. MRM, ESI +	250 pg/mg	250 pg/mg
108	O'byrne, Paul	cabello	1 mL muestra centrifugado 4000 rpm 5 min. 100 µL + 900 µL H ₂ O	LC-MS/MS y RP-HPLC	Columna Xterra XP18, Gemini C18 y Allure PFP propyl		5 ng/mL
120	Pragst, Fritz	cabello	Lavado H ₂ O y acetona (x2). Secado. 0.5 mL MeOH/ACN/formiato amonio (25:25:50) + IS. Incubación 18 h 37° C. Centrifuga. Sobrenadante 0.5 mL misma mezcla, 18 h. Ambos extractos unidos.	LC-QTOF-MS	Columna Zorbax Eclipse C18, ESI +		

129	Rubio, Nelida	cabello	0-6 cm muestra. Lavado 1 mL H ₂ O + 1 mL acetona (x2). 20 mg muestra + 5 µL deuterado. 18 h incubación con 0.5 mL MeOH/ACN/formato amonio 2mM (25:25:50). Fase líquida incubada con 0.5 mL misma mezcla 18 h.	HPLC-MS/MS	Columna HILIC, ESI +, MRM	0.02 pg/mg	0.06 pg/mg
139	Shah, Iltaf	cabello	Lavado CH ₂ Cl ₂ . 20 mg muestra incubado con NaOH 1 M 95° C, 5 min. Neutralización HCl 1 M y añade 2 ml PB 0.2 M. Extracción con hexano	LC-MS/MS con DYN-MRM	Columna Zorbax Eclipse C18, ESI +	0.25 pg/mg	
25	Bystrowska, Beata	Hígado	Órganos periféricos. 10 mg tejido + 250 µg CHCl ₃ /MeOH (2:1). 0.15 mL + 2µL estándar interno. + 250 µL Na ₂ CO ₃ (0.1M) Centrifuga 10 min, 2000 g. Fase orgánica evaporada, reconstituida 40 µL acetonitrilo	LC-MS/MS	LiChristopher 60 RP-select column. Positive electrospray mode.		
78	Joya, Xavier	Meconio		UPLC-MS/MS		1.5 ng/g	5 ng/g
22	Bujak	orina	Concentrado y eluido con polímeros diseñados, mezcla MeOH/NH ₃ (19:1)	Polímero diseñado. HPLC-TOF/MS	Columna Ascentis express C18, ESI +		
58	Fiorentin, T.	orina	200 µL muestra + 10 µL IS + 100 µL ACN	LC-MS/MS	Columna HILIC, modo ESI +	1 ng/mL	5 ng/mL
40	de Jager, Andrew	orina	Solución estándar de calibración: diluciones en MeOH/H ₂ O (1:1). 100 µL + 100 µL orina + 20 µL estándar interno + 400 µL MeOH/H ₂ O (40:60, con 10 mM acetato amonio)	LC-MS/MS	Columna Thermo AQUASIL C18. ESI +, sMRM. Tres modos: Trap, Elute y Flushvariando gradientes en las bombas y en las columnas		
126	Rosano, T.	Orina		UPLC-MS/MS	Columna Acquity BEH		

135	Schaefer, Nadine	orina	500 µL muestra + 450 µL buffer acetatos (0.1 M, pH 4) + 25 µL IS. Añade 50 µL b-Glucuronidasa/arylsulfatasa. Vortex. Incubación 90 min 40° C. Centrifuga 3500 g 8 min.	LC-MS/MS	Columna Thermo Fisher Hypersil Gold aQ. ESI +	4.9 ng/mL	24.4 ng/mL
137	Sena, Lais	orina	4 ml muestra + 2 mL buffer fosfato sodio (pH 10, 0.5M) + NaCl (20%). Añade 150 µL ACN (con 30 µL 1-dodecanol). Centrifuga 4000 rpm 15 min. Gotitas solidificadas se separan para centrifuga 4000 rpm 5 min. La capa fina superior se toma para HPLC	DLLME-HPLC	Columna Zorbax Extend C18		
155	Tsai, Lin	orina	100 µL muestra + 400 µL H ₂ O. Centrifuga 15000 g 5 min.	UHPLC-QTOF-MS	Columna Poroshell C18, ESI +	15.7 ng/mL	
57	Fiorentin, T.	saliva	100 µL muestra + 10 µL IS + 70 µL buffer	LC-MS/MS	Columna HILIC, modo ESI +	1.7 ng/mL	4.25 ng/mL
146	Strano-Rossi, Sabrina	saliva	250 µL muestra diluido en 3 buffer. Añade 25 µL MIXDRRUGS-D3	UHPLC-ESI-MS/MS	Columna Kinetex C18	1 ng/mL	5 ng/mL
172	Zheng, Y.	saliva	Muestra recolectada en parche comercial. 150 µL + 40 µL IS + 100 µL ACN. Vortex. 200 µl MeOH	UPLC-MS/MS	Columna Acquity BEH C18, ESI		0.5 ng/mL
7	Anzilloti, Luca	sangre	1 mL muestra + 10 µL B-glucuronidasa (pH 4-5), reposo 8 h 40° C (solo mezcla). 100 µL Buffer carbonatos + 10 µL deuterado.	UHPLC-MS/MS	triple cuadrupolo, MRM, columna C 18 Kinetex	0.5 ng/mL	2 ng/mL
46	Dulaurent, Sylvain	sangre	100 µL sangre + EDTA + 20 µL estándar interno + 200 µL ACN. Reposo 10 min. Añadir sales QUECHERS (4 mg MgSO ₄ /1 g NaCl/1 g citrato sodio dihidratado/0.5 g citrato sodio sesquihidratado). Centrifuga 10 min 18 200 g. 50 µL dilución 1/3 en formato amonio 5mM/buffer ácido fórmico 1%	LC-MS/MS	Triple cuadrupolo, modo ESI +, modo MRM. Columna DB PFPP		5 ng/mL

109	odoardi, Sara	sangre	Cartuchos DBS. 100 µL muestra + 10 µL IS. 30 µL en cada tarjeta (3 gotas). Secado 2 h. Disco de 3 mm removido con muestra, sumergido en 900 µL MeOH (0.1% ác. Fórmico). Reposo 1 h. Centrifuga 4000 rpm 5 min. Sobrenadante evaporado. Redisuelto en 100 µL H ₂ O (0.1% ác. fórmico)	UHPLC-MS/MS	Columna C18 superficie porosa Kinetex. ESI +	0.5 ng/mL	2 bg/mL
130	Ruíz-Colon, Kazandra	sangre	0.25 mL centrifuga. 0.75 mL ACN (con 0.2 mg/L IS). Vortex 10 s, -20° C 10 min. Centrifuga 8000 rpm 10 min. Sobrenadante evaporado. Reconstituido 0.1 mL ácido fórmico 1% en H ₂ O. Centrifuga 4000 rpm 2 min	UPLC-MS/MS	Columna aquity HSS T3. Modo ESI +. MRM	1 ng/mL	10 ng/mL
134	Saussere au, E.	sangre	100 µL sangre diluida 1:10 con 100 µL IS + 800 µL H ₂ O. Vortex. Centrifugación 13500 g 5 min. Añade 400 µL H ₂ O a 100 µL de sobrenadante. Para DBS 30 µL muestra sobre papel filtro, secado toda la noche. Cortar disco 3 mm diámetro y suspender en 150 µL H ₂ O con 1ng/mL IS	LC-MS/MS	Columna Oasis HLB. Fase reversa Atlantis C18	1 ng/mL	
154	Thomas, Andreas	sangre	20 µL sangre en tarjeta DBS. 2 h secado. Añade 2 µL IS + 100 µL MeOH + 400 µL TBME. Baño ultrasónico 45 min, centrifuga 13000 g 5 min. Sobrenadante extraído. 300 µL acetona 30 min ultrasonicación. Ambos solventes combinados y evaporados. Reconstitución en 35 µL ACN/H ₂ O (65:45)	LC-MS/MS combina HCD + MS + quadropole mass filter	Columna Hypersil Gold C18	0.05 ng/ml	0.25 ng/mL
173	Zhu, Kevin	Sangre	Lavado 0.1% dodecyl sulfato de sodio, H ₂ O y acetona (15 mL). 2 mg muestra + 0.5 mL sol. Extracción (MeOH/ACN/formato amonio 20 mM 25:25:50). Centrifuga 15000 g 6 min. Evaporar. Reconstituir 50 µL H ₂ O/ACN (97:3)	nano-HPLC-MS/MS	columna Zorbax 80 SB-C18	0.1 pg/mg	0.2 pg/mg
83	Koster, Remco	sudor	Parches de sudor. Extracción con agitación x 10 min con 1.5 mL MeOH/formato amonio (20	parches de sudor,	columna HyPURITY		3 ng/parc

			mmol, pH 7) (50:50)	confirmación con LC-MS/MS	aquastar, ESI +		he
13	Bassan, David	suero	50 µL muestra + 50 µL deuterado (250 ng/mL) + 150 µL MeOH. Filtro membrana celulosa	HPLC-MS/MS	Q Trap linear ion, turbo ion spray interface. Columna analítica PFP propyl Allure (50 y 150 mm). MRM	2.3 ng/mL	8.7 ng/mL
87	Krumbiegel, F.	uñas	20 mg muestra + H ₂ O + acetona. Lavado x 2. pulverizado. 5 µL IS + 500 µL MeOH/ACN/H ₂ O (25/25/50). 800 rpm 18 h, 40° C. sobrenadante repite procedimiento.	UHPLC-MS/MS	Columna kinetex C18, MRM	4.4 pg/mg	7.2 pg/mg
148	Sykutera, Marzena	uñas	Lavado 5 mL H ₂ O (x2) + CH ₂ Cl ₂ (x3). Baño ultrasonico 10 min. 3er lavado de CH ₂ Cl ₂ se recupera. Evaporación. Redisuelto 100 µL MeOH para contaminación. 50 mg muestra + 50 µL IS + 2 mL HCl (0.1M). Incubación 10 h 56° C. Centrifuga. Extracción 5 mL CHCl ₃ /isopropanol/heptano (50:17:33) + 2 mL PB (1 M pH 8.4). Baño ultrasónico 30 min. Evaporación. Redisolución 200 µL MeOH	LC-ESI-MS/MS	Columna Zorbax Eclipse C18, ESI +	0.1 ng/mg	0.5 ng/mg

Tabla 8. Artículos que no usan método de extracción con otros métodos de análisis

Ref.	Autor	Matriz	Tratamiento previo	Técnica de detección	Condiciones Equipo	LOD	LOQ
10	Baciu, T.	cabello	2 ml CH ₂ Cl ₂ 5 min (x2). Secado bajo flujo de nitrógeno a temp. Ambiente. 100 mg + 1 g tierra diatomea. Extracción H ₂ O + HCl 37% a 80° C. Añade 50 µL NH ₄ OH 28%. Filtrar 2 mL	PLE on line SPE/CE	CE capilar	0.10 ng/mg	
33	Cuypers, Eva	cabello	Frotado con cocaína en polvo o con cocaína base en HCl x 5 h. Pegado en portaobjetos. Solución 10 mg/mL CHCA en ACN/H ₂ O (70:30)	MALDI (Matrix assisted laser desorption ion mobility tandem mass spectrometry)			
34	Cuypers, Eva	cabello	Frotado con cocaína en polvo o con cocaína base en HCl x 5 h. Pegado en portaobjetos. Solución 10 mg/mL CHCA en acetonitrilo/agua (70:30). Blanqueado con crema con 9% H ₂ O ₂ (5,15,60 min)	MALDI (Matrix assisted laser desorption ion mobility tandem mass spectrometry)			
47	Duvivier, Wilco	cabello	Lavado 5 mL CH ₂ Cl ₂ (x2) por 5 min. Secado.	DART-HRMS (Direct Análisis in Real Time, High Resolution Mass Spectrometry, confirmación LC-MS/MS)	Modo ion positivo, modo transmisión con modulo X-Z		
59	Flinders, B.	cabello	Lavado 10 mL CH ₂ Cl ₂ x 2.	MALDI-MS/MS	modo ion positivo		
60	Flinders, Bryn	Cabello	2 lavados 10 mL CH ₂ Cl ₂ . Cortado y montado en una placa de vidrio ITO (Indium Tin	MALDI-MS/MS,	CID, modo ion positivo. (MALDI).		

			oxide)..	confirmación con LC-MS/MS	Columna BEH C18, ESI+,		
118	Poetzsch, Michael	cabello	Lavado 15 mL H ₂ O + 10 mL acetona + 10 mL hexano. Agitado 2 min. Fijado en plato para MALDI. Para LC, 50 µL fase móvil A/B (85:15). Fase A: buffer formiato (10 mM, pH 3.5) Fase B: ác. Fórmico (0.1% en ACN). Centrifuga 11180 g. 15 h reposo.	MALDI-MSI, confirmación con LC-MS/MS			
12	Bailey, Melanie	huellas	Huella sobre vidrio, congelada. 0.5 µL BZE (100 µg/mL) + MeOH/H ₂ O (1:9) + 1:1 a-CHCA/ACN (0.5%) (70:30)	MALDI	MALDI ion mobility MS/MS. Transfer fragmentation,		
32	Costa, C.	Huellas	Huellas tomadas sobre un papel cromatográfico. Lavado con HCl 0.1% + MeOH/H ₂ O (50:50)	PS-MS (paper spray mass spectrometry)			
142	Skriba, A.	Huellas		NALDI-MS/MS			
157	Van der Heide, Susan	huellas	Añade 20 mL MeOH. Vortex 5 min. Evaporación. Reconstitución 0.5 mL PB (10 mM pH 7.4) con 2% MeOH	cEIA, confirmación con LC-MS/MS		0.162 ng/ml	
44	Dos Santos, R.	leche materna	500 µL muestra + 500 µL H ₂ O + 200 µL modificador + 1 mL ác. Tricloroacético 20%. Sobrenadante + 3mL buffer pH 8.0 + 9 mg mCNT. Secado. Añade 250 µL ACN. Separación por magneto.	CNT (carbon nano tubes)	Columna capilar Rtx-5ms	1.6 ng/mL	5.0 ng/mL
8	Armenta, Sergio	Nasal	Muestra en 1.5 mL MeOH.	IMS	ionización radiactiva ⁶³ Ni. Ion positivo, membrana de teflón		
152	Taylor, I.	neuronas		electroquímico			

26	Carreiro, Stephanie	orina		Biosensor	El biosensor mide EDA (ElectroDermal Activity), temperatura de la piel y movimientos. Mide cambios en temperatura (vasoconstricción), estimulantes actividad, etc.		
62	Galano, E.	Orina	pH 9. 1 mL muestra + 1 mL CHCl ₃ . centrifuga 30 min 4° C. Fase orgánica análisis	MALDI-MS/MS		50 ng/mL	
79	Kim, S.	Orina		DXLink, EZCup, Multi4 card. Inmunoensayos de anclaje competitivo.			
81	Kohler, Isabelle	orina	Centrifuga, filtrar. Disolver en MeOH a concentración 1 mg/mL	CE-TOF-MS	Cefused silica capillary. Acondicionamiento MeOH, H ₂ O y NaOH (5 min c/u). TOF-MS en modo ESI +, triple tube sprayer.		10 ng/mL
82	Kohler, Isabelle	Orina	4 mL muestra + 1 mL NaOH + 1400 µL isopropanol + 600 µL CH ₂ Cl ₂ . Centrifuga 10000 rpm 5 min Fase orgánica. + 10 µL HCl/MeOH (1:99). Secado. Reconstituir en 30 µL BGE/H ₂ O (1:9)	CE-ESI-TOF-MS combinado con DLLME	Cefused silica capillary. Acondicionamiento MeOH, H ₂ O y NaOH (5 min c/u).	5 ng/mL	

					TOF-MS en modo ESI +, triple tube sprayer.		
99	Meng, J.	orina	0.5 mL orina + 30 µL NaOH 2% + 100 µL hexano	Raman			
105	Moslah, B.	orina		inmunològicos			
165	Yamini, Yadollah	orina		HF-LPME	Columna HP-5MS	0.05 µg/L	
169	Yu, Mingming	plasma	200 µL + 20 UI IS + 1000 µL hexano . Centrifuga 1000 rpm 10 min Evaporar. Reconstituir 50 µL fase móvil	UPLC-FLD	Columna ACQUITY UPLC BEH C18		
30	Christodoulides, Nicolaos	saliva		p-BNC (Programmable bionano chip)	Funciona como un inmunoensayo.	1.3 ng/mL	10 ng/mL
36	D'Elia, V.	Saliva	Saliva recolectada en filtros. Mezclada con cocaína y medida directamente	UV-Raman	239 nm en rango 500-1900 cm ⁻¹		
96	Ma, Dik-Lung	Saliva		Luminiscencia			
106	Munoz, Eva	Saliva	1 mL muestra disuelta en 3 mL buffer prueba. Centrifuga 6000 rpm 25° C, 30 min. Dividir 2 alícuotas 2 mL, una diluir en 2 µL BZE y diluir 1:4, 64 y 256.	Inmunoensayo			4 µg/L
145	Sorribes-Soriano, A:	Saliva	500 µL muestra + 100 µL buffer amonio. Añade MMIP. Lavado 1 min. 500 µL H ₂ O + 500 µL CH ₃ Cl. Elución 0.2 mL ácido acético en MeOH (5%) 5 min.	IMS			4 µg/L
151	Tavares, L.	Saliva		PS-MS/MS		0.27 ng/mL	1.0 ng/mL
168	yu, H.	Saliva		fluorescencia		50 nm	
69	Guinan, T.	sangre		SALDI-MS	Equipo MALDI. Modo RP. Laser a 200 Hz.	20 ng/mL (medido en agua)	

171	Zhang, Kai	Sangre		DNA			
51	Emrani, Ahmad	Suero	50 µL muestra + 125 µL acetonitrilo (sedimentación proteínas). Incubación 4° C 1h. Centrifuga 9500 g 10 min.	Fluorescencia.	Aptasensor	209 pM	
122	Rauf, S.	Suero		inmunoensayo			
128	Roushani, Mahmoud	Suero		Microscopia TEM, SEM y AFM. Espectrofotometría UV e IR			
143	Smolinska-Kempisty, K.	Suero		potenciométrico			
153	Thibert, Valerie	Suero	Ajusta pH 3-11. 1 mL muestra + 1 mL MeCN (50%). Centrifuga 6000 rpm 4C. IS a 1µg/mL. Carga 0.5 mL al MIP. MIP: Lavado 1 mL MeCN. Elución 2.25 mL MeOH/ác. Acético (95%). Evaporación. Reconstitución 200 µL fase móvil	MPI	Columna Waters Symmetry Shield RP18. ESI +		
159	Vidal, Juan	Suero	500 µl muestra ultrafiltrado (membrana celulosa y polisulfona)Centrifuga 14000 g 10 min)	mpEIA		0.06 ng/mL	
107	Nakayama, H.	Otro		fluorescencia			

Anexo 2. Método analítico propuesto para la detección de cocaína y sus metabolitos en orina mediante HPLC-MS/MS

1 Equipo e instrumentos.

- Columna Kinetex 5µm EVO C18 50 x 2.1 mm
- Cartuchos de Extracción en Fase Sólida (SPE) Strata™-X-Drug B 33µm Polymeric Strong Cation, 30mg/3 mL,
- Espectrometro de Masas, Applied Biosystems 3200 Q Trap LC/MS/MS Systems
- Cromatógrafo de líquidos HPLC Agilent 1100 series
- Software Analyst 1.4.2. Applied bisystems

2 Material de laboratorio.

- Matraces volumétricos de 25 mL, 50 mL, 100 mL
- Vasos de precipitados de 50 mL
- Pipetas volumétricas de 1 mL, 5 mL
- Pipetas Pasteur
- Viales
- Agitadores
- Balanzas
- Potenciómetro
- Baño María
- Sistema Manifold de vacío

3 Reactivos.

- Acetonitrilo (Grado HPLC)
- Ácido Fórmico (Grado HPLC)
- Buffer Acetatos (pH 6, 100mM)
- Agua (grado HPLC)
- Estándar de Hidrocloruro de Cocaína o Benzoilecgonina

4 Preparación de soluciones.

Fase Móvil:

- Fase Móvil A: Agua + ácido fórmico 0.1% v/v
- Fase Móvil B: acetonitrilo + ácido fórmico 0.1% v/v

Buffer Acetatos:

Disolver 8.709 g de Acetato de sodio + 3 mL de ácido acético glacial en 1 litro de agua. Ajustar a pH = 5 (± 0.2)

Solución estándar Cocaína

Concentración de 10 mg/mL en acetonitrilo

5 Procedimiento

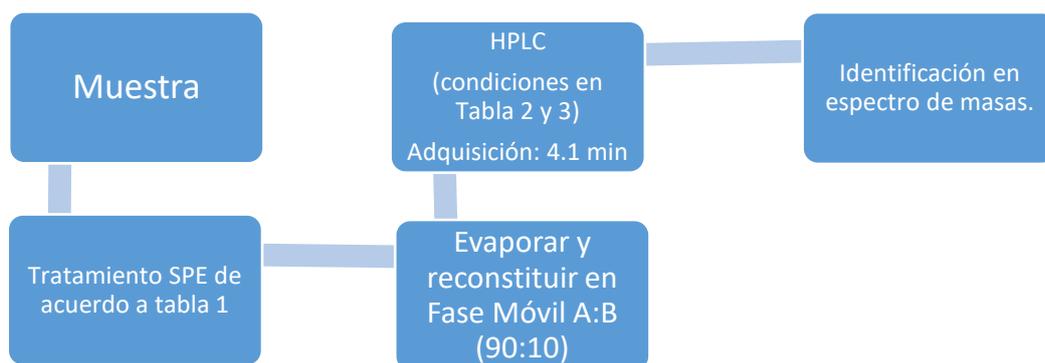


Tabla 1. SPE Cocaína en Orina

<i>Pretratamiento</i>	2 mL muestra + 2 mL buffer acetato sodio (100 mM, pH 5). Vortex
<i>Lavado 1</i>	2 mL de HCl (0.1 N)
<i>Lavado 2</i>	2 mL Metanol
<i>Secado</i>	10 minutos en vacío (Manifold)
<i>Elución</i>	2 mL Acetato de etilo/Isopropanol/Hidróxido de Amonio (70:20:10)

Tabla 2 Condiciones del equipo**HPLC**

<i>Equipo</i>	Agilent 1100 series HPLC Value System
<i>Columna</i>	Columna Kinetex 5µm EVO C18 50 x 2.1 mm
<i>Temperatura de Columna</i>	25 °C
<i>Temperatura de Muestra</i>	25 °C
<i>Volumen Inyección</i>	5 µL
<i>Flujo</i>	450 µL

Tabla 3. Perfil del gradiente para elución de la muestra en HPLC

Gradiente de elución	Tiempo (min)	Fase Móvil A (%)	Fase Móvil B (%)
1	0	90	10
2	2	30	70
3	2,1	5	95
4	2,3	5	95
5	2,31	90	10
6	4,1	90	10

Condiciones del equipo Espectroscopía de masas

<i>Equipo</i>	Applied Biosystems3200 Q Trap LC/MS/MS System
<i>Software</i>	Analyst 1.4.2
<i>Modo de Ionización</i>	ESI Positivo
<i>Voltaje de Capilar</i>	5.5 kV
<i>Voltaje Cono</i>	27 V
<i>Cono Offset</i>	
<i>Temperatura de Solvatación</i>	400 °C
<i>Gas de Solvatación</i>	
<i>Gas Cono</i>	
<i>Modo de Adquisición</i>	MRM

Bibliografia

1. Agius, R., 2014. Utility of coloured hair for the detection of drugs and alcohol. *Drug Testing and Analysis*, 6(S1), pp.110–119. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24817056> [Accessed June 28, 2016].
2. Agius, R. & Nadulski, T., 2014. Utility of ELISA screening for the monitoring of abstinence from illegal and legal drugs in hair and urine. *Drug Testing and Analysis*, 6(S1), pp.101–109. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24817055> [Accessed June 21, 2016].
3. Aleksa, K. et al., 2012. Simultaneous detection of seventeen drugs of abuse and metabolites in hair using solid phase micro extraction (SPME) with GC/MS. *Forensic Science International*, 218(1–3), pp.31–36. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22047752> [Accessed June 21, 2016].
4. Alvear, E. et al., 2014. Determination of cocaine and its major metabolite benzoylecgonine in several matrices obtained from deceased individuals with presumed drug consumption prior to death. *Journal of forensic and legal medicine*, 23, pp.37–43. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24661704> [Accessed June 23, 2016].
5. Alves, M.N.R. et al., 2013. Determination of cocaine and metabolites in hair by column-switching LC-MS-MS analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(19), pp.6299–6306.
6. Antelo-Domínguez, Á. et al., 2013. Simultaneous determination of cocaine and opiates in dried blood spots by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Talanta*, 117, pp.235–41. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24209335> [Accessed June 23, 2016].
7. Anzillotti, L., Odoardi, S. & Strano-Rossi, S., 2014. Cleaning up blood samples using a modified “QuEChERS” procedure for the determination of drugs of abuse and benzodiazepines by UPLC-MS/MS. *Forensic Science International*, 243, pp.99–106. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24907511> [Accessed June 23, 2016].
8. Armenta, S. et al., 2013. Noninvasive double confirmation of cocaine abuse. *Analytical chemistry*, 85(23), pp.11382–90. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24171548> [Accessed June 23, 2016].
9. Arroyo, A. et al., 2013. Drivers under the influence of drugs of abuse: quantification of cocaine and impaired driving. *The Medico-legal journal*, 81(Pt 3), pp.135–43. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24057314> [Accessed July 5, 2016].
10. Baciú, T. et al., 2016. Findings in the hair of drug abusers using pressurized liquid extraction and solid-phase extraction coupled in-line with capillary electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 131, pp.420–428. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0731708516306057> [Accessed April 25, 2018].
11. Baciú, T. et al., 2015. Determination of cocaine in abuser hairs by CE: monitoring compliance to a detoxification program. *Bioanalysis*, 7(4), pp.437–47. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25747763> [Accessed June 21, 2016].
12. Bailey, M.J. et al., 2015. Rapid detection of cocaine, benzoylecgonine and methylecgonine in fingerprints using surface mass spectrometry. *The Analyst*,

- 140(18), pp.6254–9. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25977942> [Accessed July 5, 2016].
13. Bassan, D.M., Erdmann, F. & Krüll, R., 2011. Quantitative determination of 43 common drugs and drugs of abuse in human serum by HPLC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 400(1), pp.43–50.
 14. Baumgartner, M.R. et al., 2012. Analysis of drugs of abuse in hair: evaluation of the immunochemical method VMA-T vs. LC-MS/MS or GC-MS. *Forensic science international*, 215(1–3), pp.56–9. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22019396> [Accessed April 7, 2016].
 15. Beck, O. et al., 2012. Detection of drugs of abuse in exhaled breath from users following recovery from intoxication. *Journal of analytical toxicology*, 36(9), pp.638–46. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23045289> [Accessed June 28, 2016].
 16. Bianchini, F. et al., 2015. Determination of cocaine / crack biomarkers in colostrum by LC – MS following protein precipitation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 103, pp.67–72. Available at:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2014.10.026>.
 17. Bidny, S. et al., 2017. Simultaneous screening and quantification of basic, neutral and acidic drugs in blood using UPLC-QTOF-MS. *Journal of Analytical Toxicology*, 41(3), pp.181–195. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27881618> [Accessed April 25, 2018].
 18. Birkler, R.I.D. et al., 2012. Screening analysis for medicinal drugs and drugs of abuse in whole blood using ultra-performance liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry (UPLC-TOF-MS)-Toxicological findings in cases of alleged sexual assault. *Forensic Science International*, 222(1–3), pp.154–161. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22770621> [Accessed June 23, 2016].
 19. Bjørk, M.K. et al., 2013. Quantification of 31 illicit and medicinal drugs and metabolites in whole blood by fully automated solid-phase extraction and ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 405(8), pp.2607–17. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23292043> [Accessed June 23, 2016].
 20. Bosker, W.M. & Huestis, M.A., 2009. Oral fluid testing for drugs of abuse. *Clinical Chemistry*, 55(11), pp.1910–1931. Available at:
<http://www.clinchem.org/cgi/doi/10.1373/clinchem.2008.108670> [Accessed February 17, 2017].
 21. Breidi, S.E. et al., 2012. Enzymatic digestion and selective quantification of underivatized delta-9-tetrahydrocannabinol and cocaine in human hair using gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of analytical methods in chemistry*, 2012, p.907893. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3335444&tool=pmc&rentertype=abstract> [Accessed April 7, 2016].
 22. Broecker, S., Herre, S. & Pragst, F., 2012. General unknown screening in hair by liquid chromatography-hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC-QTOF-MS). *Forensic science international*, 218(1–3), pp.68–81. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22036310> [Accessed April 7, 2016].
 23. Bujak, R. et al., 2016. New sorbent materials for selective extraction of cocaine and benzoylecgonine from human urine samples. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 120, pp.397–401. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26689741> [Accessed April 6, 2016].

24. Bynum, N.D., Moore, K.N. & Grabenauer, M., 2014. Evaluation of laser diode thermal desorption-tandem mass spectrometry (LDTD-MS-MS) in forensic toxicology. *Journal of Analytical Toxicology*, 38(8), pp.528–535. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25217542> [Accessed June 23, 2016].
25. Bystrowska, B. et al., 2012. LC/MS/MS evaluation of cocaine and its metabolites in different brain areas, peripheral organs and plasma in cocaine self-administering rats. *Pharmacological reports : PR*, 64(6), pp.1337–49. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23406744> [Accessed June 23, 2016].
26. Carreiro, S. et al., 2015. iMStrong: Deployment of a Biosensor System to Detect Cocaine Use. *Journal of Medical Systems*, 39(12), p.186. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26490144> [Accessed June 28, 2016].
27. Chantada-Vázquez, M.P. et al., 2016. Simple and Sensitive Molecularly Imprinted Polymer - Mn-Doped ZnS Quantum Dots Based Fluorescence Probe for Cocaine and Metabolites Determination in Urine. *Analytical Chemistry*, 88(5), pp.2734–2741. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26857857> [Accessed June 23, 2016].
28. Chen, X. et al., 2017. A quantitative LC–MS/MS method for simultaneous determination of cocaine and its metabolites in whole blood. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 134, pp.243–251. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27923200> [Accessed April 25, 2018].
29. Chericoni, S. et al., 2015. A Direct Aqueous Derivatization GSMS Method for Determining Benzoyllecgonine Concentrations in Human Urine. *Journal of Forensic Sciences*, 60(5), pp.1355–1359. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26300490> [Accessed June 28, 2016].
30. Christodoulides, N. et al., 2015. Next Generation Programmable Bio-Nano-Chip System for On-Site Detection in Oral Fluids. *Journal of drug abuse*, 1(1), pp.1–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26925466> [Accessed June 28, 2016].
31. Christodoulides, N. et al., 2015. Application of programmable bio-nano-chip system for the quantitative detection of drugs of abuse in oral fluids. *Drug and Alcohol Dependence*, 153, pp.306–313. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26048639> [Accessed June 23, 2016].
32. Costa, C. et al., 2017. Rapid, secure drug testing using fingerprint development and paper spray mass spectrometry. *Clinical Chemistry*, 63(11), pp.1745–1752. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28939761> [Accessed April 25, 2018].
33. Cuypers, E. et al., 2016. Consequences of Decontamination Procedures in Forensic Hair Analysis Using Metal-Assisted Secondary Ion Mass Spectrometry Analysis. *Analytical chemistry*, 88(6), pp.3091–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26878081> [Accessed April 6, 2016].
34. Cuypers, E. et al., 2014. Hydrogen peroxide reactions on cocaine in hair using imaging mass spectrometry. *Forensic Science International*, 242, pp.103–110. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25047217> [Accessed June 21, 2016].
35. Daems, D. et al., 2015. Potentiometric detection in UPLC as an easy alternative to determine cocaine in biological samples. *Biomedical Chromatography*, 29(7), pp.1124–1129. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25516367> [Accessed June 28, 2016].

36. Dana, K. et al., Rapid Analysis of Cocaine in Saliva by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Journal of analytical & bioanalytical techniques*, 6(6), pp.1–5. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4725314&tool=pmc&rendertype=abstract> [Accessed April 6, 2016].
37. D'Avila, F.B. et al., 2016. Analysis of cocaine/crack biomarkers in meconium by LC-MS. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 1012–1013, pp.113–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26821344> [Accessed April 6, 2016].
38. D'Avila, F.B., Limberger, R.P. & Fröhlich, P.E., 2016. Cocaine and crack cocaine abuse by pregnant or lactating mothers and analysis of its biomarkers in meconium and breast milk by LC-MS-A review. *Clinical biochemistry*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26827634> [Accessed April 2, 2016].
39. De Jager, A.D. & Bailey, N.L., 2011. Online extraction LC-MS/MS method for the simultaneous quantitative confirmation of urine drugs of abuse and metabolites: Amphetamines, opiates, cocaine, cannabis, benzodiazepines and methadone. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 879(25), pp.2642–2652. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.07.029>.
40. D'Elia, V. et al., 2018. Ultraviolet resonance Raman spectroscopy for the detection of cocaine in oral fluid. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 188, pp.338–340. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28750309> [Accessed April 25, 2018].
41. Di Corcia, D. et al., 2012. Simultaneous determination in hair of multiclass drugs of abuse (including THC) by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 899, pp.154–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22626893> [Accessed April 7, 2016].
42. Di Rago, M. et al., 2016. Ultra-rapid targeted analysis of 40 drugs of abuse in oral fluid by LC-MS/MS using carbon-13 isotopes of methamphetamine and MDMA to reduce detector saturation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(14), pp.3737–3749. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26993306> [Accessed July 5, 2016].
43. Domínguez-Romero, J.C., García-Reyes, J.F. & Molina-Díaz, A., 2011. Screening and quantitation of multiclass drugs of abuse and pharmaceuticals in hair by fast liquid chromatography electrospray time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 879(22), pp.2034–2042. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21680266> [Accessed June 21, 2016].
44. dos Santos, R.R. et al., 2017. Efficient extraction method using magnetic carbon nanotubes to analyze cocaine and benzoylecgonine in breast milk by GC/MS. *Bioanalysis*, 9(21), pp.1655–1666. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29095043> [Accessed April 25, 2018].
45. Dufaux, B. et al., 2012. Comparison of urine and hair testing for drugs of abuse in the control of abstinence in driver's license re-granting. *Drug Testing and Analysis*, 4(6), pp.415–419. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22447399> [Accessed June 28, 2016].

46. Dulaurent, S. et al., 2016. QuEChERS sample preparation prior to LC-MS/MS determination of opiates, amphetamines, and cocaine metabolites in whole blood. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(5), pp.1467–1474. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26753977> [Accessed June 23, 2016].
47. Duvivier, W.F. et al., 2016. (Un)targeted Scanning of Locks of Hair for Drugs of Abuse by Direct Analysis in Real Time-High-Resolution Mass Spectrometry. *Analytical chemistry*, 88(4), pp.2489–96. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26813807> [Accessed June 21, 2016].
48. Ellefsen, K.N. et al., 2014. Quantification of cocaine and metabolites in exhaled breath by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry following controlled administration of intravenous cocaine. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(25), pp.6213–6223. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25129634> [Accessed July 5, 2016].
49. Ellefsen, K.N. et al., 2016. Pharmacodynamic effects and relationships to plasma and oral fluid pharmacokinetics after intravenous cocaine administration. *Drug and alcohol dependence*, 163, pp.116–25. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27114201>.
50. Ellefsen, K.N. et al., 2016. Cocaine and benzoylecgonine oral fluid on-site screening and confirmation. *Drug testing and analysis*, 8(3–4), pp.296–303. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26968560> [Accessed July 5, 2016].
51. Emrani, A.S. et al., 2016. A novel fluorescent aptasensor based on hairpin structure of complementary strand of aptamer and nanoparticles as a signal amplification approach for ultrasensitive detection of cocaine. *Biosensors and Bioelectronics*, 79, pp.288–293. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26716422>.
52. Favretto, D. et al., 2011. High performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry and micropulverized extraction for the quantification of amphetamines, cocaine, opioids, benzodiazepines, antidepressants and hallucinogens in 2.5 mg hair samples. *Journal of chromatography. A*, 1218(38), pp.6583–95. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21831386> [Accessed April 7, 2016].
53. Feliu, C. et al., 2015. (and their derivatives) in human whole blood. *Bioanalysis*, 7(20), pp.2685–700. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26507790> [Accessed June 23, 2016].
54. Fernández, M.D.M.R. et al., 2014. A quantitative, selective and fast ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the simultaneous analysis of 33 basic drugs in hair (amphetamines, cocaine, opiates, opioids and metabolites). *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 965, pp.7–18. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24973771> [Accessed April 7, 2016].
55. Fernández, M. del M.R. et al., 2014. Validation of an automated solid-phase extraction method for the analysis of 23 opioids, cocaine, and metabolites in urine with ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*, 38(5), pp.280–288. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24790061> [Accessed June 28, 2016].
56. Fernández, P. et al., 2015. Analysis of drugs of abuse in human plasma by dispersive liquid-liquid microextraction and high-performance liquid

- chromatography. *Journal of Applied Toxicology*, 35(4), pp.418–425. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25091865> [Accessed June 23, 2016].
57. Fiorentin, T.R. et al., 2017. Simultaneous determination of cocaine/crack and its metabolites in oral fluid, urine and plasma by liquid chromatography-mass spectrometry and its application in drug users. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 86, pp.60–66. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28395991> [Accessed April 25, 2018].
 58. Flinders, B. et al., 2017. Optimization of Sample Preparation and Instrumental Parameters for the Rapid Analysis of Drugs of Abuse in Hair samples by MALDI-MS/MS Imaging. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 28(11), pp.2462–2468. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28801836> [Accessed April 25, 2018].
 59. Flinders, B. et al., 2015. Preparation of longitudinal sections of hair samples for the analysis of cocaine by MALDI-MS/MS and TOF-SIMS imaging. *Drug testing and analysis*, 7(10), pp.859–65. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25981643> [Accessed April 7, 2016].
 60. Fucci, N. et al., 2014. A DIRECT IMMERSION SOLID-PHASE MICROEXTRACTION GAS CHROMATOGRAPHY/MASS SPECTROMETRY (DI-SPME-GC/MS) METHOD FOR THE SIMULTANEOUS DETECTION OF LEVAMISOLE AND MINOR COCAINE CONGENERS IN HAIR SAMPLES FROM CHRONIC ABUSERS. *Therapeutic drug monitoring*, 36(6), pp.789–95. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24713867> [Accessed June 21, 2016].
 61. Galano, E. et al., 2012. Qualitative screening in doping control by MALDI-TOF/TOF mass spectrometry: A proof-of-evidence. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 71, pp.193–197. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22980317> [Accessed June 23, 2016].
 62. Gambelunghe, C. et al., 2015. Norcocaine and cocaethylene distribution patterns in hair samples from light, moderate, and heavy cocaine users. *Drug testing and analysis*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26621770> [Accessed April 7, 2016].
 63. García, M.A. et al., 2002. Guía de validación de métodos analíticos. , pp.1–123.
 64. Gentili, S. et al., 2016. Determination of different recreational drugs in sweat by headspace solid-phase microextraction gas chromatography mass spectrometry (HS-SPME GC/MS): Application to drugged drivers. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 129, pp.282–287. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27442890> [Accessed April 25, 2018].
 65. Gouveia, C.A. et al., 2012. Simultaneous quantification of morphine and cocaine in hair samples from drug addicts by GC-EI/MS. *Biomedical chromatography : BMC*, 26(8), pp.1041–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22753238> [Accessed April 7, 2016].
 66. Gryczynski, J. et al., 2014. Hair drug testing results and self-reported drug use among primary care patients with moderate-risk illicit drug use. *Drug and Alcohol Dependence*, 141, pp.44–50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24932945> [Accessed June 21, 2016].
 67. Guale, F. et al., Validation of LC-TOF-MS screening for drugs, metabolites, and collateral compounds in forensic toxicology specimens. *Journal of analytical toxicology*, 37(1), pp.17–24. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23118149> [Accessed June 23, 2016].

68. Guinan, T.M. et al., 2015. Direct detection of illicit drugs from biological fluids by desorption/ionization mass spectrometry with nanoporous silicon microparticles. *The Analyst*, 140(23), pp.7926–33. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26502296> [Accessed June 28, 2016].
69. Henderson, G.L., 1993. Mechanisms of drug incorporation into hair. *Forensic Science International*, 63(1–3), pp.19–29. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8138221> [Accessed January 31, 2017].
70. Henkel, K. et al., 2018. Full validation of a method for the determination of drugs of abuse in non-mineralized dental biofilm using liquid chromatography-tandem mass spectrometry and application to postmortem samples. *Talanta*, 176, pp.360–366. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28917762> [Accessed April 25, 2018].
71. Hezinova, V. et al., 2012. Simultaneous analysis of cocaine and its metabolites in urine by capillary electrophoresis-electrospray mass spectrometry using a pressurized liquid junction nanoflow interface. *Electrophoresis*, 33(4), pp.653–660. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22451058> [Accessed June 28, 2016].
72. Imbert, L. et al., 2014. Development and validation of a single LC-MS/MS assay following SPE for simultaneous hair analysis of amphetamines, opiates, cocaine and metabolites. *Forensic science international*, 234, pp.132–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24378313> [Accessed April 7, 2016].
73. Jagerdeo, E. & Schaff, J.E., 2016. Rapid screening for drugs of abuse in biological fluids by ultra high performance liquid chromatography/Orbitrap mass spectrometry. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 1027, pp.11–18. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27236533> [Accessed June 21, 2016].
74. Janicka, M., Kot-Wasik, A. & Namieśnik, J., 2010. Analytical procedures for determination of cocaine and its metabolites in biological samples. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 29(3), pp.209–224.
75. Jenkins, A.J. & Cone, E., 1998. *Drug Abuse Handbook* S. B. Karch, ed., Costa Rica: CRCPress.
76. Joya, X. et al., 2012. Cocaine use during pregnancy assessed by hair analysis in a Canary Islands cohort. *BMC Pregnancy and Childbirth*, 12(1), p.2. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22230295> [Accessed June 21, 2016].
77. Joya, X. et al., 2015. Drugs of abuse in maternal hair and paired neonatal meconium: an objective assessment of foetal exposure to gestational consumption. *Drug testing and analysis*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26627903> [Accessed June 21, 2016].
78. Kim, S.Y. et al., 2017. Evaluation of an automated reader and color interpretation-based immunoassays for multiplexed Drug-of-Abuse Testing in Urine. *Journal of Analytical Toxicology*, 41(5), pp.412–420. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28201761> [Accessed April 25, 2018].
79. Kintz, P., 2011. Hair Analysis. *Clarke's Analysis and Poisons*, pp.323–333.
80. Kohler, I., Schappler, J. & Rudaz, S., 2013. Highly sensitive capillary electrophoresis-mass spectrometry for rapid screening and accurate quantitation of drugs of abuse in urine. *Analytica Chimica Acta*, 780, pp.101–109. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23680557>.
81. Kohler, I. et al., 2013. Dispersive liquid-liquid microextraction combined with capillary electrophoresis and time-of-flight mass spectrometry for urine analysis.

- Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 73, pp.82–89. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22494520>.
82. Koster, R.A. et al., 2014. Fast and highly selective LC-MS/MS screening for THC and 16 other abused drugs and metabolites in human hair to monitor patients for drug abuse. *Therapeutic drug monitoring*, 36(2), pp.234–43. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24071815> [Accessed April 7, 2016].
 83. Koster, R.A. et al., 2014. Application of sweat patch screening for 16 drugs and metabolites using a fast and highly selective LC-MS/MS method. *Therapeutic drug monitoring*, 36(1), pp.35–45. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24071814> [Accessed June 23, 2016].
 84. Kronstrand, R., Forsman, M. & Roman, M., 2013. A screening method for 30 drugs in hair using ultrahigh-performance liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry. *Therapeutic drug monitoring*, 35(3), pp.288–95. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23666579> [Accessed April 7, 2016].
 85. Kronstrand, R., Forsman, M. & Roman, M., 2018. Quantitative analysis of drugs in hair by UHPLC high resolution mass spectrometry. *Forensic Science International*, 283, pp.9–15. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29241093> [Accessed April 25, 2018].
 86. Krumbiegel, F. et al., 2016. The use of nails as an alternative matrix for the long-term detection of previous drug intake: validation of sensitive UHPLC-MS/MS methods for the quantification of 76 substances and comparison of analytical results for drugs in nail and hair samples. *Forensic Science, Medicine, and Pathology*, 12(4), pp.416–434. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27515931> [Accessed April 25, 2018].
 87. Lendoiro, E. et al., 2013. Maternal hair analysis for the detection of illicit drugs, medicines, and alcohol exposure during pregnancy. *Ther Drug Monit*, 35(3), pp.296–304. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23666580> [Accessed June 21, 2016].
 88. Lendoiro, E. et al., 2012. Target screening and confirmation of 35 licit and illicit drugs and metabolites in hair by LC-MSMS. *Forensic science international*, 217(1–3), pp.207–15. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22134122> [Accessed March 2, 2016].
 89. Lerch, O., Temme, O. & Daldrup, T., 2014. Comprehensive automation of the solid phase extraction gas chromatographic mass spectrometric analysis (SPE-GC/MS) of opioids, cocaine, and metabolites from serum and other matrices. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 406(18), pp.4443–51. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24788888> [Accessed June 23, 2016].
 90. Leung, K.W. et al., 2017. Surveillance of drug abuse in Hong Kong by hair analysis using LC-MS/MS. *Drug Testing and Analysis*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29205946> [Accessed April 25, 2018].
 91. Li, X. et al., 2013. Rapid screening of drugs of abuse in human urine by high-performance liquid chromatography coupled with high resolution and high mass accuracy hybrid linear ion trap-Orbitrap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1302, pp.95–104. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23838299>.
 92. Liu, Y. et al., 2014. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of cocaine and its metabolite (-)ecgonine methyl ester in human acidified stabilized plasma samples. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 961, pp.77–85.

- Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24861875> [Accessed June 23, 2016].
93. Lizasoain, I., Moro, M.A. & Lorenzo, P., 2002. Cocaína: Aspectos farmacológicos. *Adicciones*, 14(1), pp.57–64.
 94. Lopez-Avila, V. et al., 2012. Determination of stimulants using gas chromatography/high-resolution time-of-flight mass spectrometry and a soft ionization source. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 26(23), pp.2714–2724. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23124661> [Accessed July 5, 2016].
 95. López-Guarnido, O. et al., 2013. Hair testing for cocaine and metabolites by GC/MS: criteria to quantitatively assess cocaine use. *Journal of applied toxicology : JAT*, 33(8), pp.838–44. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22407992> [Accessed April 7, 2016].
 96. Ma, D.L. et al., 2015. A Luminescent Cocaine Detection Platform Using a Split G-Quadruplex-Selective Iridium(III) Complex and a Three-Way DNA Junction Architecture. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 7(34), pp.19060–19067. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26284502> [Accessed July 5, 2016].
 97. Mascini, M. et al., 2013. Peptides trapping cocaine: docking simulation and experimental screening by solid phase extraction followed by liquid chromatography mass spectrometry in plasma samples. *Analytica chimica acta*, 772, pp.40–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23540246> [Accessed June 23, 2016].
 98. Mella, M. et al., 2017. Detection of Cocaine and Metabolites in Bone Following Decomposition Using 2D LC–MS–MS. *Journal of Analytical Toxicology*, 42(4), pp.265–275. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29300918> [Accessed April 25, 2018].
 99. Meng, J. et al., 2017. Designing of ordered two-dimensional gold nanoparticles film for cocaine detection in human urine using surface-enhanced Raman spectroscopy. *Talanta*, 164, pp.693–699. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28107992> [Accessed April 25, 2018].
 100. Míguez-Framil, M. et al., 2011. Electrospray ionization tandem mass spectrometry for the simultaneous determination of opiates and cocaine in human hair. *Analytica chimica acta*, 704(1–2), pp.123–32. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21907029> [Accessed April 7, 2016].
 101. Miyaguchi, H. & Inoue, H., 2011. Determination of amphetamine-type stimulants, cocaine and ketamine in human hair by liquid chromatography/linear ion trap-Orbitrap hybrid mass spectrometry. *Analyst*, 136(17), pp.3503–3511. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21331390> [Accessed June 21, 2016].
 102. Montesano, C. et al., 2015. Determination of illicit drugs and metabolites in oral fluid by microextraction on packed sorbent coupled with LC-MS/MS. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 407(13), pp.3647–3658. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25772560> [Accessed July 5, 2016].
 103. Moore, C. & Crouch, D., 2013. Oral fluid for the detection of drugs of abuse using immunoassay and LC-MS/MS. *Bioanalysis*, 5(12), pp.1555–69. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23795933> [Accessed June 28, 2016].
 104. Morris-Kukoski, C.L., Montgomery, M.A. & Hammer, R.L., 2014. Analysis of Extensively Washed Hair from Cocaine Users and Drug Chemists to

- Establish New Reporting Criteria. *Journal of Analytical Toxicology*, 38(9), pp.628–636. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25100648> [Accessed April 7, 2016].
105. Moslah, B. et al., 2018. Fast screening tests for the simultaneous detection of 11 drugs of abuse in urine specimens. A forensic epidemiology study of 28,298 cases in Tunisia. *Forensic Science International*, 283, pp.35–40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29248810> [Accessed April 25, 2018].
 106. Munoz, E.M. et al., 2011. Direct surface plasmon resonance immunosensor for in situ detection of benzoylecgonine, the major cocaine metabolite. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(11), pp.4423–4428. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21664118>.
 107. Nakayama, H. et al., 2016. Fluorescence Immunoassay for Cocaine Detection. *Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy*, 35(2), pp.83–85. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26977890> [Accessed April 25, 2018].
 108. O’Byrne, P.M. et al., 2013. Screening of stimulants including designer drugs in urine using a liquid chromatography tandem mass spectrometry system. *Journal of Analytical Toxicology*, 37(2), pp.64–73. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23316030> [Accessed June 28, 2016].
 109. Odoardi, S., Anzillotti, L. & Strano-Rossi, S., 2014. Simplifying sample pretreatment: Application of dried blood spot (DBS) method to blood samples, including postmortem, for UHPLC-MS/MS analysis of drugs of abuse. *Forensic Science International*, 243, pp.61–67. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24814508> [Accessed June 23, 2016].
 110. Orfanidis, A. et al., 2017. A GC–MS method for the detection and quantitation of ten major drugs of abuse in human hair samples. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1047, pp.141–150. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27884570> [Accessed April 25, 2018].
 111. Otero-Fernández, M. et al., 2013. Direct tandem mass spectrometry for the simultaneous assay of opioids, cocaine and metabolites in dried urine spots. *Analytica chimica acta*, 784, pp.25–32. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23746404> [Accessed June 23, 2016].
 112. Ottaviani, G. et al., 2017. Determination of drugs of abuse in a single sample of human teeth by a gas chromatography-mass spectrometry method. *Journal of Analytical Toxicology*, 41(1), pp.32–36. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27681340> [Accessed April 25, 2018].
 113. Palmeri, A. et al., 2000. Drugs in nails: Physiology, pharmacokinetics and forensic toxicology. *Clinical pharmacokinetics*, 38(2), pp.95–110. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10709775> [Accessed February 16, 2017].
 114. Pascual, F., Torres, M. & Calafat, A., 2001. Monografía cocaína. , 13, pp.8–23.
 115. Pedersen, A.J. et al., 2013. Screening for illicit and medicinal drugs in whole blood using fully automated SPE and ultra-high-performance liquid chromatography with TOF-MS with data-independent acquisition. *Journal of separation science*, 36(13), pp.2081–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23610028> [Accessed June 23, 2016].

116. Pego, A.M.F. et al., 2017. Determination of cocaine and its derivatives in hair samples by liquid phase microextraction (LPME) and gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS). *Forensic Science International*, 274, pp.83–90. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28063635> [Accessed April 25, 2018].
117. Pelição, F.S. et al., 2014. A one-step extraction procedure for the screening of cocaine, amphetamines and cannabinoids in postmortem blood samples. *Journal of analytical toxicology*, 38(6), pp.341–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24782143> [Accessed June 23, 2016].
118. Poetzsch, M. et al., 2014. Single hair analysis of small molecules using MALDI-triple quadrupole MS imaging and LC-MS/MS: Investigations on opportunities and pitfalls. *Analytical Chemistry*, 86(23), pp.11758–11765. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25289728> [Accessed June 21, 2016].
119. Poon, S. et al., 2014. Norcocaine in human hair as a biomarker of heavy cocaine use in a high risk population. *Forensic science international*, 241, pp.150–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24929743> [Accessed April 7, 2016].
120. Pragst, F. et al., 2013. Methadone and illegal drugs in hair from children with parents in maintenance treatment or suspected for drug abuse in a German community. *Therapeutic drug monitoring*, 35(6), pp.737–52. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24263638> [Accessed June 21, 2016].
121. Pritchett, J.S. & Phinney, K.W., 2015. Influence of Chemical straightening on the stability of drugs of abuse in hair. *Journal of Analytical Toxicology*, 39(1), pp.13–16. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25298521> [Accessed June 21, 2016].
122. Rauf, S. et al., 2017. Label-Free Nanopore Biosensor for Rapid and Highly Sensitive Cocaine Detection in Complex Biological Fluids. *ACS Sensors*, 2(2), pp.227–234. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28723133> [Accessed April 25, 2018].
123. Rodriguez-Lafuente, A., Mirnaghi, F.S. & Pawliszyn, J., 2013. Determination of cocaine and methadone in urine samples by thin-film solid-phase microextraction and direct analysis in real time (DART) coupled with tandem mass spectrometry Anti-doping Analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(30), pp.9723–9727. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23685960> [Accessed June 28, 2016].
124. Roper-Miller, J.D., Huestis, M.A. & Stout, P.R., 2012. Cocaine analytes in human hair: Evaluation of concentration ratios in different cocaine sources, drug-user populations and surface-contaminated specimens. *Journal of Analytical Toxicology*, 36(6), pp.390–398. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22593566> [Accessed June 21, 2016].
125. Rosado, T. et al., 2017. Rapid analysis of cocaine and metabolites in urine using microextraction in packed sorbent and GC/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409(8), pp.2051–2063. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28012112> [Accessed April 25, 2018].
126. Rosano, T.G. et al., 2016. Definitive drug and metabolite screening in urine by UPLC-MS-MS using a novel calibration technique. *Journal of Analytical Toxicology*, 40(8), pp.628–638. Available at: <https://academic.oup.com/jat/article-lookup/doi/10.1093/jat/bkw050> [Accessed April 25, 2018].

127. Rosano, T.G. et al., 2014. Multi-drug and metabolite quantification in postmortem blood by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry: Comparison with nominal mass technology. *Journal of Analytical Toxicology*, 38(8), pp.495–506. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25217537> [Accessed June 23, 2016].
128. Roushani, M. & Shahdost-Fard, F., 2016. Fabrication of an electrochemical nanoaptasensor based on AuNPs for ultrasensitive determination of cocaine in serum sample. *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications*, 61, pp.599–607. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26838888>.
129. Rubio, N.C. et al., 2014. Possibilities for discrimination between chewing of coca leaves and abuse of cocaine by hair analysis including hygrine, cuscohygrine, cinnamoylcocaine and cocaine metabolite/cocaine ratios. *International Journal of Legal Medicine*, 129(1), pp.69–84. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25138383> [Accessed June 21, 2016].
130. Ruiz-Colón, K. et al., 2012. Simultaneous determination of xylazine, free morphine, codeine, 6-acetylmorphine, cocaine and benzoylecgonine in postmortem blood by UPLC-MS-MS. *Journal of Analytical Toxicology*, 36(5), pp.319–326. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22582266> [Accessed June 23, 2016].
131. Sánchez-González, J. et al., 2016. Determination of cocaine and its metabolites in plasma by porous membrane-protected molecularly imprinted polymer micro-solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Chromatography. A.*, 1451, pp.15–22. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27207577>.
132. Sánchez-González, J. et al., 2016. Development of magnetic molecularly imprinted polymers for solid phase extraction of cocaine and metabolites in urine before high performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry. *Talanta*, 147, pp.641–649. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26592657>.
133. Sánchez-González, J. et al., 2015. Porous membrane-protected molecularly imprinted polymer micro-solid-phase extraction for analysis of urinary cocaine and its metabolites using liquid chromatography - Tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 898, pp.50–59.
134. Saussereau, E. et al., 2012. On-line liquid chromatography/tandem mass spectrometry simultaneous determination of opiates, cocaine and amphetamines in dried blood spots. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 885–886, pp.1–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22281234> [Accessed June 23, 2016].
135. Schaefer, N. et al., 2013. Development and validation of two LC-MS/MS methods for the detection and quantification of amphetamines, designer amphetamines, benzoylecgonine, benzodiazepines, opiates, and opioids in urine using turbulent flow chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(1), pp.247–258. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23076398> [Accessed June 28, 2016].
136. Schaffer, M. et al., 2016. Analysis of cocaine and metabolites in hair: validation and application of measurement of hydroxycocaine metabolites as evidence of cocaine ingestion. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 408(8), pp.2043–54. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26873203> [Accessed April 6, 2016].

137. Sena, L.C.S. et al., 2016. Dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic drop and high-performance liquid chromatography to the analysis of cocaine's major adulterants in human urine. *Toxicology*, S0300–483X(16), pp.30038–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27142991>.
138. Sergi, M. et al., 2013. Pressurized-liquid extraction for determination of illicit drugs in hair by LC-MS-MS. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 405(2–3), pp.725–35. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22580425> [Accessed April 7, 2016].
139. Shah, I. et al., 2014. Hair-based rapid analyses for multiple drugs in forensics and doping: application of dynamic multiple reaction monitoring with LC-MS/MS. *Chemistry Central journal*, 8(1), p.73. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25530799> [Accessed June 21, 2016].
140. Silveira, G. de O. et al., 2016. Development of a method for the determination of cocaine, cocaethylene and norcocaine in human breast milk using liquid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Forensic science international*, 265, pp.22–28. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26826849> [Accessed March 29, 2016].
141. Silvestre, C.I.C. et al., 2009. Liquid-liquid extraction in flow analysis: A critical review. *Analytica Chimica Acta*, 652(1–2), pp.54–65.
142. Skriba, A. & Havlicek, V., 2018. Mass spectrometry imaging of illicit drugs in latent fingerprints by matrix-free and matrix-assisted desorption/ionization techniques. *European Journal of Mass Spectrometry*, 24(1), pp.124–128. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29232991> [Accessed April 25, 2018].
143. Smolinska-Kempisty, K. et al., 2017. New potentiometric sensor based on molecularly imprinted nanoparticles for cocaine detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 96, pp.49–54. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28472729> [Accessed April 25, 2018].
144. Snozek, C.L.H., Bjergum, M.W. & Langman, L.J., 2012. Cocaine and metabolites by LC-MS/MS. *Methods in Molecular Biology*, 902, pp.91–103. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22767110> [Accessed June 28, 2016].
145. Sorribes-Soriano, A. et al., 2018. Magnetic molecularly imprinted polymers for the selective determination of cocaine by ion mobility spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1545, pp.22–31. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29530403> [Accessed April 25, 2018].
146. Steuer, A.E., Poetzsch, M. & Kraemer, T., 2016. MALDI-MS drug analysis in biological samples: opportunities and challenges. *Bioanalysis*, 8(17), pp.1859–1878. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27524467> [Accessed April 25, 2018].
147. Strano-Rossi, S. et al., 2011. UHPLC-ESI-MS/MS method for direct analysis of drugs of abuse in oral fluid for DUID assessment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401(2), pp.609–624. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21674163> [Accessed July 5, 2016].
148. Sundström, M. et al., 2013. A high-sensitivity ultra-high performance liquid chromatography/high-resolution time-of-flight mass spectrometry (UHPLC-HR-TOFMS) method for screening synthetic cannabinoids and other drugs of abuse in urine. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 405(26), pp.8463–74. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23954996>.

149. Sykutera, M., Piotrowski, P. & Bloch-Bogusławska, E., 2014. Determination of cocaine and benzoylecgonine in nails by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Archiwum medycyny sądowej i kryminologii*, 64(3), pp.165–74. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25693174> [Accessed April 7, 2016].
150. Tang, Y.Q. & Weng, N., 2013. Salting-out assisted liquid-liquid extraction for bioanalysis. *Bioanalysis*, 5(12), pp.1583–98. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23795935>
<http://www.future-science.com/doi/abs/10.4155/bio.13.117>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23795935>.
151. Tassoni, G. et al., 2014. Hair analysis in order to evaluate drug abuse in driver's license regranting procedures. *Forensic Science International*, 244, pp.16–19. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25151106> [Accessed June 21, 2016].
152. Tavares, L.S. et al., 2018. Paper Spray Tandem Mass Spectrometry Based on Molecularly Imprinted Polymer Substrate for Cocaine Analysis in Oral Fluid. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 29(3), pp.566–572. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29196983> [Accessed April 25, 2018].
153. Taylor, I.M. et al., 2017. Aptamer-functionalized neural recording electrodes for the direct measurement of cocaine in vivo. *J. Mater. Chem. B*, 5(13), pp.2445–2458. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28729901> [Accessed April 25, 2018].
154. Thibert, V. et al., 2014. Molecularly imprinted polymer for the selective extraction of cocaine and its metabolites, benzoylecgonine and ecgonine methyl ester, from biological fluids before LC-MS analysis. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 949–950, pp.16–23. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24444871>.
155. Thomas, A. et al., 2012. Sensitive determination of prohibited drugs in dried blood spots (DBS) for doping controls by means of a benchtop quadrupole/Orbitrap mass spectrometer. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 403(5), pp.1279–1289. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22231507> [Accessed June 23, 2016].
156. Tsai, I.L. et al., 2013. Screening and confirmation of 62 drugs of abuse and metabolites in urine by ultra-high-performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*, 37(9), pp.642–651. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24084874> [Accessed June 28, 2016].
157. Valen, A. et al., 2017. Determination of 21 drugs in oral fluid using fully automated supported liquid extraction and UHPLC-MS/MS. *Drug Testing and Analysis*, 9(5), pp.808–823. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27464485> [Accessed April 25, 2018].
158. van der Heide, S. et al., 2015. A competitive enzyme immunoassay for the quantitative detection of cocaine from banknotes and latent fingermarks. *Forensic Science International*, 250, pp.1–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25766738>.
159. Vanstechelman, S. et al., 2012. Analytical evaluation of four on-site oral fluid drug testing devices. *Journal of Analytical Toxicology*, 36(2), pp.136–140.

- Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22337784> [Accessed July 5, 2016].
160. Vidal, J.C. et al., 2016. Rapid determination of recent cocaine use with magnetic particles-based enzyme immunoassays in serum, saliva, and urine fluids. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 125, pp.54–61. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27003120> [Accessed June 23, 2016].
 161. Vindenes, V. et al., 2012. Detection of drugs of abuse in simultaneously collected oral fluid, urine and blood from Norwegian drug drivers. *Forensic Science International*, 219(1–3), pp.165–71. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22284072>.
 162. Volkow, N.D. et al., 1999. Reinforcing effects of psychostimulants in humans are associated with increases in brain dopamine and occupancy of D(2) receptors. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 291(1), pp.409–15. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10490931> [Accessed March 28, 2017].
 163. Wang, X. & Drummer, O.H., 2015. Review: Interpretation of drug presence in the hair of children. *Forensic science international*, 257, pp.458–72. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26610304> [Accessed March 4, 2016].
 164. Wu, A.H. et al., 2012. Role of liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry (LC-HR/MS) in clinical toxicology. *Clinical toxicology (Philadelphia, Pa.)*, 50(8), pp.733–42. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22888997> [Accessed June 23, 2016].
 165. Xiong, L. et al., 2013. Determination of ecgonine and seven other cocaine metabolites in human urine and whole blood by ultra-high-pressure liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 405(30), pp.9805–16. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24202193> [Accessed June 23, 2016].
 166. Yamini, Y. et al., 2014. Liquid-phase microextraction based on two immiscible organic solvents followed by gas chromatography with mass spectrometry as an efficient method for the preconcentration and determination of cocaine, ketamine, and lidocaine in human urine samples. *Journal of Separation Science*, 37(17), pp.2364–2371. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24961921> [Accessed June 28, 2016].
 167. Yang, F. et al., 2017. Magnetic dispersive solid-phase extraction based on modified magnetic nanoparticles for the detection of cocaine and cocaine metabolites in human urine by HPLC-MS. *Journal of Separation Science*, 40(21), pp.4234–4245. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28843028> [Accessed April 25, 2018].
 168. Yonamine, M. et al., 2013. Detecting alcohol and illicit drugs in oral fluid samples collected from truck drivers in the state of São Paulo, Brazil. *Traffic injury prevention*, 14(2), pp.127–31. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23343020> [Accessed July 5, 2016].
 169. Yu, H. et al., 2017. A cooperative-binding split aptamer assay for rapid, specific and ultra-sensitive fluorescence detection of cocaine in saliva. *Chemical science*, 8(1), pp.131–141. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28451157> [Accessed April 25, 2018].
 170. Yu, M. et al., 2014. Simultaneous determination of l - tetrahydropalmatine and cocaine in human plasma by simple UPLC – FLD

- method : Application in clinical studies. *Journal of Chromatography B*, 965, pp.39–44. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24996068> [Accessed June 23, 2016].
171. Zancanaro, I. et al., 2012. Prescription and illicit psychoactive drugs in oral fluid-LC-MS/MS method development and analysis of samples from Brazilian drivers. *Forensic Science International*, 223(1–3), pp.208–216. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23000138>.
 172. Zhang, K. et al., 2014. Label-free and ultrasensitive fluorescence detection of cocaine based on a strategy that utilizes DNA-templated silver nanoclusters and the nicking endonuclease-assisted signal amplification method. *Chemical communications (Cambridge, England)*, 50(2), pp.180–2. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24217291> [Accessed June 23, 2016].
 173. Zheng, Y., Sparve, E. & Bergström, M., 2017. A simple validated multi-analyte method for detecting drugs in oral fluid by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). *Drug Testing and Analysis*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29044958> [Accessed April 25, 2018].
 174. Zhu, K.Y. et al., 2012. Microfluidic chip based nano liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry for the determination of abused drugs and metabolites in human hair. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 402(9), pp.2805–2815. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22281681> [Accessed June 21, 2016].

Bibliografía Complementaria

- Barquero Quirós, M., 2006. *Principios Y Aplicaciones de la Cromatografía de Gases*, Costa Rica: Editorial Universidad de Costa Rica.
- Barroso, M. & Gallardo, E., 2015. Assessing cocaine abuse using LC-MS/MS measurements in biological specimens. *Bioanalysis*, 7(12), pp.1497–525. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26168256> [Accessed June 21, 2016].
- Bianchini, F. et al., 2015. Determination of cocaine / crack biomarkers in colostrum by LC – MS following protein precipitation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 103, pp.67–72. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2014.10.026>.
- Borova, V.L. et al., 2014. Highly sensitive determination of 68 psychoactive pharmaceuticals, illicit drugs, and related human metabolites in wastewater by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(17), pp.4273–4285.
- Bortolotti, F. et al., 2012. Toxicokinetics of cocaine and metabolites: the forensic toxicological approach. *Current medicinal chemistry*, 19(33), pp.5658–63. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22856660> [Accessed July 5, 2016].
- Chertorivski, S., 2011. *Encuesta Nacional de Adicciones 2011 Drogas Ilícitas*, Available at: http://www.conadic.salud.gob.mx/pdfs/ENA_2011_DROGAS_ILICITAS_.pdf.
- Cone, E., 1995. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cocaine. *Analytical Toxicology*, 19(6), pp.459–78. Available at: <https://academic.oup.com/jat/article-abstract/19/6/459/774170/Pharmacokinetics-and-Pharmacodynamics-of-Cocaine>.
- Di Corcia, D. et al., 2012. Simultaneous determination in hair of multiclass drugs of abuse (including THC) by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 899, pp.154–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22626893> [Accessed April 7, 2016].
- Henderson, G.L., 1993. Mechanisms of drug incorporation into hair. *Forensic Science International*, 63(1–3), pp.19–29. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8138221> [Accessed January 31, 2017].
- Kintz, P., 2011. Hair Analysis. *Clarke's Analysis and Poisons*, pp.323–333.
- Linares, D.R., 2012. La importancia del protocolo de investigación. *Curso de la Maestría en Administración y Gestión de Instituciones Educativas de la Facultad*

- de Administración de la BUAP*. Available at:
<http://metodokent.blogspot.mx/2010/11/la-importancia-del-protocolo-de.html>
 [Accessed January 17, 2018].
- Mieczkowski, T. & Kruger, M., 2012. The informational yield of paired samples from a large sample: hair analysis and urinalysis for cocaine and cannabinoids. *Journal of Addictions Nursing*, 23(1), pp.30–9. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22468658> [Accessed June 21, 2016].
- Moore, C. & Crouch, D., 2013. Oral fluid for the detection of drugs of abuse using immunoassay and LC-MS/MS. *Bioanalysis*, 5(12), pp.1555–69. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23795933> [Accessed June 28, 2016].
- National Library of Medicine, U.S., 2018. Cocaine. Available at:
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5760#section=Top> [Accessed February 2, 2018].
- Palmeri, A. et al., 2000. Drugs in nails: Physiology, pharmacokinetics and forensic toxicology. *Clinical Pharmacokinetics*, 38(2), pp.95–110. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10709775> [Accessed February 16, 2017].
- Sáenz Campos, D., 2005. PROTOCOLOS PARA INVESTIGACIÓN CLÍNICA: ASPECTOS PRACTICOS PARA SU PREPARACIÓN. *Fármacos*, 18, pp.51–6. Available at: <http://www.emedic.ucr.ac.cr/images/BuenasPracticas/Prot-Investigacion-2007.pdf>.
- Tang, Y.Q. & Weng, N., 2013. Salting-out assisted liquid-liquid extraction for bioanalysis. *Bioanalysis*, 5(12), pp.1583–98. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23795935>
<http://www.future-science.com/doi/abs/10.4155/bio.13.117>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23795935>.
- UNODC, 2015. Informe Mundial sobre las Drogas. , p.162.
- UNODC, 2012. Métodos recomendados para la identificación y el análisis de cocaína en materiales incautados. *Manual para uso de los laboratorios nacionales de análisis de estupefacientes*, pp.1–48.
- Vanstechelman, S. et al., 2012. Analytical evaluation of four on-site oral fluid drug testing devices. *Journal of Analytical Toxicology*, 36(2), pp.136–140. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22337784> [Accessed July 5, 2016].
- Vindenes, V. et al., 2012. Detection of drugs of abuse in simultaneously collected oral fluid, urine and blood from Norwegian drug drivers. *Forensic Science International*, 219(1–3), pp.165–71. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22284072>.
- Wang, X. & Drummer, O.H., 2015. Review: Interpretation of drug presence in the hair of children. *Forensic science international*, 257, pp.458–72. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26610304> [Accessed March 4, 2016].

Zhang, K. et al., 2014. Label-free and ultrasensitive fluorescence detection of cocaine based on a strategy that utilizes DNA-templated silver nanoclusters and the nicking endonuclease-assisted signal amplification method. *Chemical communications (Cambridge, England)*, 50(2), pp.180–2. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24217291> [Accessed June 23, 2016].

Glosario

Analito: Componente específico de una muestra a medir

Especificidad: La capacidad de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente al analito de interés y no a otros componentes de la muestra

Estabilidad analítica de la muestra: Propiedad de una muestra preparada, de conservar su integridad fisicoquímica y la concentración del analito, después de almacenarse por un tiempo y condiciones determinadas

Exactitud, a la concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia;

Linealidad, a la capacidad de un método analítico, en un intervalo de trabajo, para obtener resultados que sean directamente proporcionales a la concentración del compuesto en la muestra;

Límite de detección, a la mínima concentración de un compuesto en una muestra el cual puede ser detectado, pero no necesariamente cuantificado, bajo las condiciones de operación establecidas;

Límite de cuantificación, a la concentración más baja del compuesto que puede cuantificarse cumpliendo con la precisión y exactitud establecidas en el método;

Matriz biológica, al material de origen biológico en el cual se encuentra la sustancia de interés;

Método: grupo de procedimientos involucrados en la colección, procesamiento, almacenamiento, y análisis de uno o varios compuestos a analizar en una muestra biológica

Método analítico: descripción de la secuencia de actividades, materiales y parámetros que se deben cumplir para llevar a cabo el análisis de un componente específico de la muestra.

Método normalizado: Proceso de medición robusto donde pequeñas variaciones en el procedimiento no deben producir de forma imprevista grandes variaciones en los resultados.

Muestras control, a las muestras de concentración conocida que se cuantifican durante la corrida analítica para corroborar la validez del método;

Precisión, al grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto, se evalúa como repetibilidad y reproducibilidad;

Protocolo, al documento que establece los objetivos, procedimientos y métodos que se utilizarán para realizar un estudio y analizar los datos

obtenidos. El protocolo debe definir la forma en que se cumplirá con los requerimientos regulatorios;

Protocolo de validación: Descripción de pruebas específicas para demostrar que un proceso da resultados que cumplen con los criterios preestablecidos de manera consistente.

Robustez: Es la medida de la capacidad del método analítico de permanecer inalterado por pequeñas, pero deliberadas variaciones (efecto de cambio en las condiciones) en los parámetros del mismo, proporcionando un índice de su confiabilidad durante su uso normal

Selectividad, a la capacidad de un método analítico para cuantificar exacta y específicamente el compuesto a analizar, en presencia de otros compuestos que pudieran estar presentes en la muestra;

Sensibilidad: Es el cambio en la respuesta del instrumento que corresponde a un cambio en la concentración del analito. Es la pendiente del intervalo de trabajo y cuanto mayor es esta, mayor es la sensibilidad del método.

Tolerancia: Reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos por el análisis de la misma muestra bajo diferentes condiciones normales de operación. La robustez y la tolerancia son conceptos diferentes, ya que el primero se refiere a la influencia de factores internos del método, mientras que la tolerancia se refiere a factores externos del método.

Validación, a la evidencia experimental documentada de que un procedimiento cumple con el propósito para el que fue diseñado

Validación del método analítico: Proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada.

Lista de Abreviaturas

EME – Ecgonina metil ester

BZE – Benzoilecgonina

NCOC – Norcocaína

AEME – Anhidroecgonina metil ester

IR – Infrarrojo

MS – Espectroscopia de masas

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

SPE – Extracción en fase sólida (Solid Phase Extraction)

LLE – Extracción en fase líquida (Liquid-Liquid Extraction)

ACN – Acetonitrilo

SIM – Monitoreo de un solo ion (single ion monitoring)

SRM – monitoreo selectivo reacción (Selected reaction monitoring)

LC-MS – Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas

ELISA – Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)

LOD – Límite mínimo de detección

SPME – Micro extracción en fase sólida (Solid Phase Micro Extraction)

GC – Cromatografía de gases

LC – Cromatografía de líquidos

LOQ – Límite mínimo de cuantificación

DBS – Punto de sangre seca (Dried Blood Spot)

HRMS – Espectrometría de masas de alta resolución (High Resolution Mass Spectrometry)

UPLC – Cromatografía de líquidos de alta resolución (Ultra Performance Liquid Chromatography)

TOF – Tiempo de vuelo (Time of Flight)

NaOH – Hidróxido de sodio

MeOH – metanol

MALDI – Desorción/ionización mediante láser asistida por matriz (Matrix Assisted Laser Desorption/ionization)