

COMUNICACIONES BREVES

Perfil de alcaloides de la hoja de coca en el fluido oral de un mascarador de hoja de coca y un bebedor de té de coca. Estudio preliminar

Coca alkaloids profile in oral fluid from people chewing coca leaves and drinking coca tea. Preliminary study

Rubio, Nélida Cristina¹; Moreda-Piñeiro A.²; Bermejo-Barrera P.²; Bermejo A.M.³

¹Laboratorio de Toxicología y Química Legal (LATOQUIL). Cipolletti, Río Negro. Patagonia. Argentina. ²Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Facultad de Química, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela -España. ³Instituto de Ciencias Forenses "Luis Concheiro" (INCIFOR), Departamento de Anatomía Patológica y Ciencias Forenses, Facultad de Medicina, Universidad de Santiago de Compostela. Rúa de San Francisco, s/n.15782. Santiago de Compostela – España. *cristinarubio2@gmail.com

Recibido: 16 de marzo de 2019

Aceptado: 5 de junio de 2019

Resumen. Actualmente el fluido oral (FO) es aceptado como una matriz biológica alternativa para detectar drogas en toxicología clínica y forense. En países como Argentina donde el uso de hojas de coca (mascar hojas de coca o beber té de coca) es legal son necesarios procedimientos adecuados para lograr una clara diferenciación entre los individuos que usan las hojas de coca de manera legal de aquéllos que usan cocaína en forma ilegal. Poca es la información que hay en la literatura sobre el perfil de los alcaloides de la hoja de coca en FO de personas que mascan hojas de coca o toman té de coca y hasta el presente trabajo no se hallaron datos sobre el perfil en FO de la higrina (HIG) y cuscohigrina (CUS). De este estudio preliminar participaron dos voluntarios. Los resultados mostraron que la CUS e HIG siguieron siendo positivas después que la cocaína (COC) y benzoilecgonina (BE) cayeron por debajo de los valores *cut-off* propuestos por las guías internacionales para FO en casos de screening (15 a 20 ng/mL) y de confirmación (8 a 10 ng/mL) en el caso del mascarador de coca. En el participante que tomó una taza de té de coca, en el último punto examinado (1 h) resultó ser positivo para la COC y BE y también para la CUS e HIG. El FO podría ser una muestra útil para confirmar el uso legal de la hoja de coca, aun cuando futuros estudios son necesarios para corroborar estos primeros datos.

Palabras clave: Fluido oral; Mascaradores de coca; Té de coca; Cuscohigrina; Higrina

Abstract. Nowadays oral fluid (OF) is accepted as an alternative biological sample for detecting drugs in clinical and forensic toxicology. In countries like Argentina, where the use of coca leaves (coca leaves chewing and coca tea drinking) is legal, adequate procedures are required to allow a clear differentiation between people who use coca leaves (legal practice) and those who use cocaine (illicit practice). There is scarce literature regarding coca leaf alkaloids profile in OF from people who chew coca leaves and drink coca tea. Until now, coca leaf alkaloids profile of hygrine (HYG) and cuscohygrine (CUS) in OF were not described in the literature. The current preliminary study was performed with two healthy volunteers. In this research CUS and HYG have been found to be positive (detectable) even when cocaine (COC) and benzoylecgonine (BE) are dropped below the cut-off values proposed by international guidelines for screening (15 to 20 ng/mL), and confirmation (8 to 10 ng/mL) in OF. In addition, CUS and HYG were also found to be positive at the same time of the last detection of COC and BE after coca tea consumption. The OF would be a useful sample to confirm the legal use of coca leaf, even when more researches are therefore needed.

Keywords: Oral fluid; Coca chewers; Coca tea; Cuscohygrine; Hygrine

Introducción

En países como la Argentina, Perú o Bolivia donde mascar hojas de coca o beber té de coca es legal (Ley 23737/1989 (InfoLEG)), son necesarios procedimientos que permitan diferenciar estas prácticas legales del uso ilegal del consumo de cocaína. Se requiere, por lo tanto, en situaciones judiciales o en casos de accidentes automovilísticos, como en situaciones de controles laborales o de catástrofes donde los responsables presentan un resultado positivo de cocaína y alegan un uso legal de la hoja de coca (mascado o beber té de

coca), contar con herramientas analíticas que nos permitan una clara diferenciación de estas dos situaciones.

Recientemente dos alcaloides de la hoja de coca: higrina (HIG) y cuscohigrina (CUS), han sido propuestos como marcadores del mascado de la hoja de coca para propósitos de *screening*/confirmación en muestras de pelo y orina, con algunas limitaciones (Rubio y col. 2013; Rubio y col. 2014a; Rubio y col. 2014b). La CUS e HIG poseen diferentes propiedades químicas (pK_b, y Log P_{o/w}) que la

cocaína (COC) (Drager 2002) y, en consecuencia, la HIG y CUS, no son extraídas o si lo son, son extraídas en muy baja proporción de las hojas de coca durante el proceso de producción clandestina del clorhidrato de cocaína, razón por la cual no son detectados en las muestras de secuestro y en las muestras biológicas de quienes han consumido cocaína ilegalmente (Casale y Klein 1993; Rubio y col. 2015; Rubio y col. 2017).

Escasas son las citas bibliográficas halladas sobre el perfil metabólico y farmacocinética de la COC y de sus dos mayores metabolitos (benzoilecgonina (BE) y metilecgonina (EME)) en fluido oral (FO) de mascadores de hojas de coca o de bebedores de té de coca (Coe y col. 2018). No se han encontrado datos referentes al comportamiento de la CUS e HIG como así tampoco de otros dos alcaloides de la hoja de coca como la cinamoilcocaína (CIN) y la tropococaína (TRO) en el FO.

Objetivos

Los objetivos del presente trabajo fueron: 1) establecer el perfil de los alcaloides de la hoja de coca en el FO de un voluntario que ha mascado hojas de coca y de otro que bebió té de coca. Se analizaron las concentraciones en FO de: COC y de sus dos principales metabolitos BE y EME, este último también constituyente de la hoja de coca, de CUS e HIG (propuestos como marcadores de mascado en orina y pelo) y de trCIN y TRO. 2) Determinar si la CUS e HIG son aún positivas a la concentración de *cut-off* propuesta por las guías internacionales para la COC, BE y EME en FO en casos de *Driving Under the Influence of Drug* (DUID), control de drogas de abuso en lugares laborales y otras situaciones forenses. Las guías internacionales han propuesto concentraciones para COC y BE de 15 a 20 ng/mL con propósito de *screening*, y 8 a 10 ng/mL para fines de confirmación (SAMHSA 2015; EWDTS 2015; Logan y col. 2018).

Materiales y método

Testigos, reactivos y materiales

Los testigos COC, BE, EME, cocaína- d^3 (COC- d^3), y benzoilecgonina- d^3 (BE- d^3) en concentraciones de 1000 µg/mL y 100 µg/mL fueron obtenidos de Cerilliant (Round Rock, TX, USA), CUS (10 mg) fue comprada en Toronto Research Chemicals Inc. (North York, ON, Canadá). TRO y trCIN (20 mg) fue de NMI (West Lindfield, Australia). El testigo HIG no pudo ser obtenido comercialmente, por lo que la HIG fue identificada con base en su m/z (ion precursor) → m/z (ion producto), las transiciones fueron obtenidas empleando un extracto de hojas

de coca y registrando el espectro de masa para futuras comparaciones.

Reactivos: el agua ultrapura 18 MΩcm se obtuvo de un purificador de agua Millipore CO. (Bedford, MA, USA). El acetonitrilo, metanol y 2-propanol (LC-MS grade) se compraron a Riedel-de Haën (Seelze, Germany). El ácido fórmico (98%) fue de Panreac (Barcelona, España) y el formiato de amonio (99%) fue de Fluka (Steinheim, Germany). Insumos: los filtros para jeringa de acetato de celulosa (0,20 µm) provinieron de Labbox Labware S.L. (Barcelona, España).

Instrumentación

Las determinaciones se realizaron en un sistema 3200 Q TRAP LC/MS/MS (ABSciex, Concord, Canadá), equipado con una bomba cromatográfica binaria Flexar FX-15 UHPLC (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) y un automuestreador Flexar UHPLC (Perkin Elmer). El software empleado para el control del sistema y adquisición de datos fue Analyst 1.6 (ABSciex), el procesamiento de los datos se realizó con el software MultiQuant 2.1 (ABSciex). La columna cromatográfica usada fue *Infinity LabPoroshell 120 Hilic* (2,7 µm, 2,10 × 100 mm) de Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA). Un GECKO 2000 se empleó para el control de la temperatura de la columna (30 a 80°C) de Amchro GmbH (Hattersheim, Germany). La fuente de iones con ionización por electrospray (ESI), fue operada en modo ionización positiva, a una temperatura de 400°C, 5000 V. La separación de los compuestos se realizó a 40°C y se empleó un gradiente con una fase móvil A de formiato de amonio 20 mM, pH 4,2 en agua ultrapura y una fase móvil B de acetonitrilo:metanol (4:1). El tiempo de corrida fue de 20 min.

En la *Tabla 1* se detallan para cada compuesto el ion precursor y los iones productos analizados, el modo MRM: *multi reaction monitoring*, los tiempos de retención, los límites de detección (LD) y los límites de cuantificación (LC). Se analizaron al menos dos iones producto para cada compuesto para garantizar la especificidad de la medida y la presencia de un analito fue confirmada cuando todos los iones cualificadores fueron identificados en cada corrida cromatográfica. La MRM transición de mayor respuesta fue empleada para la cuantificación.

Los rangos de cuantificación para COC, BE, trCIN y TRO estuvieron entre 5-200 ng/mL; entre 10-200 ng/mL para EME y para CUS entre 50-800 ng/mL. Detalles sobre la validación del método son descriptos en una publicación previa (Rubio y col. 2018) y en la *Tabla 1*.

Tabla 1. MS/MS, tiempos de retención, LC y LD de alcaloides de la hoja de coca y metabolitos de la cocaína en FO.

Compuesto	Ion precursor (amu)	Ion producto (amu)	ISTD	TR (min)	LD ng/mL	LC ng/mL
BE	290,1	168,2	BE-d ³	2,62	n/a	5
		105,1				
		77				
COC	304,1	182,2	COC-d ³	2,67	n/a	5
		105,1				
		82				
		77				
EME	200,1	182,2	BE-d ³	4,21	5	10
		82,1				
		67,1				
		41,1				
trCIN	330,2	77,1	BE-d ³	2,64	n/a	5
		182,1				
		103,1				
		51,1				
TRO	246,1	124,1	BE-d ³	3,75	n/a	5
		77,1				
		67,1				
		51,1				
CUS	225,1	84,1 42,1	BE-d ³	11,65	n/a	50
HIG ⁽¹⁾	142,1	84,1 42,1		3,53		
BE-d ³	293,1	171,2 77		2,62		
COC-d ³	307,1	185,1 85,1		2,81		

Amu: atomic mass unit; ISTD: internal standard; TR: tiempo de retención; LD: límite de detección; LC: límite de cuantificación; n/a: no aplica, dato no calculado; ⁽¹⁾HIG no disponible comercialmente, los datos se obtuvieron de un extracto de hojas de coca.

Cuantificación

La cuantificación de la COC, BE, EME, CUS, trCIN y TRO fue realizada empleando un método validado siguiendo las guías internacionales (Rubio y col. 2018). Las muestras de FO fueron colectadas por salivación en un tubo de vidrio (*spitting*) (Bosker y Huesties 2009). No se emplearon colectores de FO comerciales debido a la falta de conocimientos sobre el comportamiento de la HIG y CUS sobre este tipo de dispositivos y no se encontraron datos en la bibliografía sobre este punto.

Después de la colección, la muestra de FO fue centrifugada a 10000 rpm a 4°C por 10 min. Se tomaron 200 µL FO y fueron mezclados con 10 µL de una solución de estándar interno de 500 ng/mL (COC-d³ y BE-d³), se adicionaron 600 µL de fase móvil acetonitrilo: formiato de amonio 20 mM en agua, pH 4,2 (95:5) para precipitar las proteínas, se agitó por 2 min y se centrifugó (10000 rpm, 4°C, 10 min). EL sobrenadante fue filtrado (0,2 µm) y evaporado a sequedad bajo corriente de nitrógeno (a 40°C). El extracto evaporado fue redissuelto en 100 µL de fase móvil y una alícuota de 20 µL fue inyectada en el LC-MS/MS.

Participantes

Dos voluntarios sanos participaron en este estudio, a quienes se les permitió desayunar previo a mascar hojas de coca o beber una taza de té de coca. Los voluntarios realizaron su rutina diaria mientras las muestras de FO fueron colectadas. No se consumieron bebidas alcohólicas durante el experimento. Ambos participantes dieron su consentimiento por escrito.

El primer voluntario mascó 5 g de hoja de coca junto con una sustancia alcalina (bicarbonato de sodio) durante aproximadamente 1 hora. Una muestra blanco de FO fue tomada antes de iniciar el mascado (-1,5 h), se inicia el mascado al tiempo -1,17 h, las hojas fueron removidas de la boca a tiempo 0 y las muestras de FO fueron tomadas a los 5 y 30 min y 1,0- 2,0- 3,5- 4,5- 6,0- 7,5- 9,5- 13,5- 23,0 y 26,0 h (detalle del procedimiento en la *Tabla 2*).

El segundo voluntario bebió una taza de té de coca comercial (un saquito de té de 1 g de hojas de coca picadas). Las muestras de FO fueron tomadas a -1,5 h antes (muestra blanco), 5 y 30 min, y 1,0- 2,0 y 3,0 h. después de la ingesta del té (detalles del procedimiento en la *Tabla 3*).

En todos los casos las muestras de FO fueron mantenidas a -20°C hasta el momento del análisis.

Resultados y discusión

Las concentraciones de los alcaloides de la hoja de coca y metabolitos de la cocaína en FO vs el tiempo después de mascar hojas de coca y de beber el té de coca se muestran en las *Tablas 2 y 3* y en las *Figuras 1 y 2*.

La alta concentración hallada a los 5 y 30 min. (0,08 y 0,5 h) en el FO del voluntario que mascó hojas de coca pudo deberse a la contaminación del FO por éstas o a una absorción local que produciría un efecto depósito de las drogas en la cavidad oral (Drummer 2006, Reichardt 2014).

En el FO del mascador de hojas de coca la relación BE/COC, EME/COC, y CUS/COC pasó de menor de 1 a mayor de 11, sugiriendo que la eliminación de la COC en el FO fue más rápida que en el caso de la BE, de la EME (Scheidweiler 2010) y de la CUS (*Tabla 4*). La relación BE/CUS y EME/CUS fue menor de 1 en todas las mediciones mostrando que tanto la CUS, BE y EME tienen una velocidad de eliminación semejante (*Tabla 4*).

EL alcaloide trCIN se detectó hasta las 3,5 h, mientras que la CUS, HIG, BE y EME se detectaron hasta las 13,5 h y la COC fue cuantificada hasta las 9,5 h (*Tabla 2*). La BE y EME fueron encontradas en el FO luego del consumo oral de cápsulas con 100 y 200 mg de COC (Coe y col. 2018), pero además debe tenerse en cuenta que la BE puede originarse por hidrólisis química de la COC por la acción de sustancias alcalinas como el bicarbonato de sodio que es empleado durante el coqueo y que la EME es también un alcaloide que forma parte de la hoja de coca. Los alcaloides de la hoja de coca son absorbidos durante el mascado a través de la mucosa oral (proceso que se ve favorecido por el empleo de sustancias alcalinas) y por el tracto gastrointestinal pero no han sido estimados aún el grado de absorción de los alcaloides de la hoja de coca en la cavidad oral como en el tracto gastrointestinal.

EL análisis de las relaciones CUS/COC, BE/COC y EME/COC en el segundo voluntario que bebió una taza de té de coca muestra que éstas se incrementan con el tiempo indicando al igual que en el caso de mascador de coca la eliminación de la COC es más rápida que la de la CUS, BE y EME (*Tabla 4*). Los alcaloides y metabolitos analizados son detectados/cuantificados hasta 1 h después de beber té de coca, excepto la trCIN que fue detectada solamente hasta 0,5 h (*Tabla 3*). Estos resultados muestran que beber solamente una taza de té de coca genera

Tabla 2. Concentración de los alcaloides de la hoja de coca y metabolitos de la cocaína después de mascar 5 g de hoja de coca.

		Tiempo	COC	CUS	BE	EME	CIN	HIG
		(horas)	(ng/mL)					
Tiempo de mascado de las hojas de coca	Blanco	-1,5	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Inicio de la colocación de las hojas de coca en la boca	-1,17	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
	Final de la colocación de las hojas de coca en la boca	-1	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
	Se remueven las hojas de coca de la boca	0	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
		0,08	1768,5 ⁽¹⁾	3151,1 ⁽¹⁾	579,8 ⁽¹⁾	1080,1 ⁽¹⁾	445,1 ⁽¹⁾	Positivo
		0,5	974,1 ⁽¹⁾	3339,1 ⁽¹⁾	324,5 ⁽¹⁾	962,8 ⁽¹⁾	396,9 ⁽¹⁾	Positivo
		1	152,5	336,4	59,6	89,8	18,7	Positivo
		2	34,8	295,1	50,5	67,1	6,6	Positivo
		3,5	41,0	322,8	75,2	223,1	10,8	Positivo
		4,5	14,4	131,7	34,1	66,2	nd	Positivo
		6	16,0	115,4	22,8	26,4	nd	Positivo
		7,5	18,6	175,3	61,4	57,1	nd	Positivo
		9,5	11,4	125,6	44,5	33,8	nd	Positivo
		13,5	nd	52,5	7,6	<10	nd	Positivo
		23	nd	nd	nd	nd	nd	nd
		26	nd	nd	nd	nd	nd	nd

nd: no detectable, n/a: no aplica, ⁽¹⁾sobre el límite de cuantificación**Tabla 3.** Concentración de los alcaloides de la hoja de coca y metabolitos de la cocaína después de la ingesta de una taza de té de coca.

		Tiempo	COC	CUS	BE	EME	trCIN	TRO	HIG
		(horas)	(ng/mL)						
Muestra blanco		-1,5	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Ingesta de té de coca		-0,10 a 0,00	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
		0,25	170,0	59,0	17,1	<10	9,1	nd	Positivo
		0,50	67,8	43,7 ⁽¹⁾	10,0	<10	7,5	nd	Positivo
Muestras de FO		1,00	19,1	39,7 ⁽¹⁾	15,3	<10	nd	nd	Positivo
		2,00	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
		3,00	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

nd: no detectable, n/a: no aplica, ⁽¹⁾bajo el límite de cuantificación

Tabla 4. Relación CUS/COC, relaciones metabolitos/cocaína; relaciones metabolito/cuscohigrina; relación BE/EME en fluido oral de mascador de hojas de coca y de bebedor de té de coca.

	Tiempo (horas)	CUS/COC	BE/COC	EME/COC	BE/CUS	EME/CUS	BE/EME
Mascador hoja de coca							
	Blanco	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
	0,1	1,78	0,33	0,61	0,18	0,34	0,54
	0,5	3,43	0,39	0,99	0,10	0,29	0,34
	1,0	2,21	0,39	0,59	0,18	0,27	0,66
	2,0	8,48	1,83	1,93	0,17	0,23	0,75
	3,5	7,87	1,83	5,44	0,23	0,69	0,34
	4,5	9,14	1,43	4,60	0,26	0,50	0,52
	6,0	7,21	1,43	1,65	0,20	0,23	0,86
	7,5	9,42	3,90	3,07	0,35	0,33	1,08
	9,5	11,02	3,90	2,96	0,35	0,27	1,32
	13,5	n/a	n/a	n/a	0,14	<0,2	<0,7
	23,0	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
	26,0	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
Bebedor de té de coca							
	Blanco	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
	0,25	0,35	0,10	<0,05	0,29	<0,2	>1,7
	0,50	>0,6	0,15	<0,2	0,23	0,25	>1,0
	1,00	>2,0	0,80	<0,5	0,39	<0,25	>1,8
	2,00	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a

n/a: no aplica.

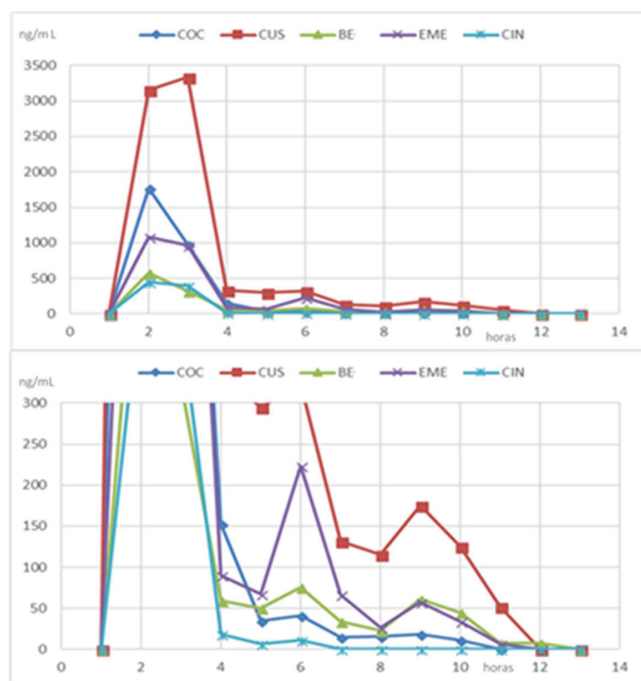


Figura 1. Perfil de concentración vs. tiempo de la COC, alcaloides de la hoja de coca y metabolitos en FO, después de mascar 5 g de hoja de coca por 1 h. A dos escalas de concentración.

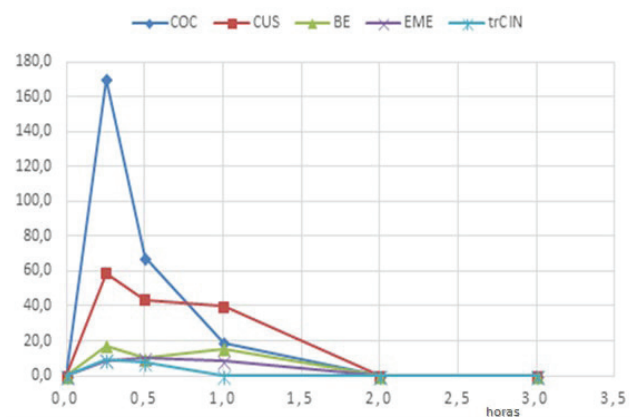


Figura 2. Perfil de concentración vs. tiempo de la COC, alcaloides de la hoja de coca y metabolitos en FO, después de beber una taza de té de coca comercial.

concentraciones en FO de COC y BE por encima de los niveles de *cut-off* recomendados por SAMHSA (Substance Abuse and Mental Health Services Administration) (8 ng/mL) hasta al menos 1 h luego de la ingesta. (SAMHSA 2015). Reichardt 2014 reportó resultados similares en su tesis: Validation of Oral Fluid as a Matrix for Drug Detection.

Se halló una buena correlación entre los resultados positivos de la HIG y la CUS en todas las muestras de FO de ambos participantes (Tablas 2 y 3). Por último, la TRO uno de los alcaloides menos abundante de la hoja de coca (Moore 1995), no fue detectada en ninguna muestra de FO analizada.

Conclusión

Este estudio preliminar es uno de los primeros que aportan datos de la cinética de los alcaloides de la hoja de coca en FO luego del consumo de hojas de coca a través del mascado de hojas de coca o de la ingesta de té de coca. Los resultados obtenidos podrían estar indicando que el FO sería una muestra útil para ser empleada en los laboratorios de toxicología forense para auxiliar a la Justicia como en los accidentes producidos por manejar bajo la influencia de drogas, en los controles laborales de drogas de

abuso o en otras causas criminales. La CUS e HIG son positivas en el FO del participante que mascó hojas de coca aun cuando la COC y BE han disminuido su concentración por debajo de los valores *cut-off* propuestos por las guías internacionales con propósito de *screening* (15 a 20 ng/mL) y de confirmación (8 a 10 ng/mL) (SAMHSA 2015; EWDTs 2015; Logan y col. 2018). Similar consideración es encontrada en el participante que bebió una taza de té de coca, en el cual la CUS y la HIG siguen siendo positivas hasta 1 h después de la ingesta y de la detección de la COC y BE. Por lo tanto, CUS e HIG podrían ser en FO útiles marcadores para corroborar un consumo legal y reciente de hojas de coca (mascado o ingesta de té de coca), aunque no podemos excluir que conjuntamente hubiera un consumo ilegal de cocaína. Esto es al menos una prueba para corroborar en el ámbito judicial o laboral que la persona imputada dice la verdad al alegar un consumo lícito de hojas de coca. Finalmente, y como ya se mencionó en otras secciones de este trabajo este es un estudio preliminar porque está referido a un solo voluntario en cada caso. Además, el escenario puede ser diferente en consumidores de Argentina, Perú y Bolivia quienes pueden consumir hojas de coca en variadas frecuencias diarias, sema-

nales o mensuales, pudiendo llegar a mascarse 5 a 10 g en una única vez con y sin sustancias alcalinas o en varias sesiones diarias u otras alternativas de consumo. Algunos autores han mostrado que repetidas administraciones orales cambian la relación de concentración de la COC y de sus mayores metabolitos (BE y EME) (Coe y col. 2018), en consecuencia, se requiere seguir investigando sobre este tema.

Bibliografía citada

Bosker W.M., Huestis M.A., Oral Fluid Testing for Drugs of Abuse. *Clin Chem.*2009; 55(11):1910–1931.

Casale J.F., Klein R.F.X. Illicit production of cocaine. *Forensic Sci Rev.*1993;5:95–107.

Coe M.A., Jufer Phipps R.A., Cone E.J., Walsh, S.L. Bioavailability and Pharmacokinetics of Oral Cocaine in Humans. *Journal of Analytical Toxicology.* 2018;42:285-292.

Drager B. Review Analysis of tropane and related alkaloids. *Journal of Chromatography A.* 2002;978:1-35.

Drummer O.H. Drug testing in oral fluid, *The Clinical Biochemist Reviews.* 2006;27(3):147–159
European Workplace Drug Testing Society (EWDTS). European guidelines for workplace in oral fluid. 2015. Versión 02. [en línea]. Disponible en: <http://www.ewdts.org/data/uploads/documents/ewdts-oral-fluid-2015-05-29-v02.pdf>. (Consulta: 15 de enero de 2018).

InfoLEG: Información Legislativa y Documental. Ministerio de Justicia y Derechos Humanos. Ley 23737. [en línea]. Disponible en: <http://servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/verNorma.do?id=138>. (Consulta 15 de enero de 2018).

Logan B.K., D’Orazio A.L., Mohr A.L., Limoges J.F., Miles A.K., Scarneo C.E., Kerrigan, Liddicoat L.J., Scott K.S., Huestis M.A. Recommendations for Toxicological Investigation of Drug-Impaired Driving and Motor Vehicle Fatalities—2017 Update. *Journal of Analytical Toxicology.* 2018;42:63–68.

Moore J.F., Casale J.F., Fodor G., Jones A.B. Detection and Characterization of Cocaine and Related Tropane Alkaloids in Coca Leaf, Cocaine, and Biological Specimens. *Forensic Science Review.* 1995;7(2):77-101.

Reichardt E.M. (2014). Validation of Oral Fluid as a Matrix for Drug Detection-Thesis Bournemouth University [en línea]. Disponible en http://eprints.bournemouth.ac.uk/21492/1/Reichardt%2CEva%20M_%20PhD_2014.pdf. (Consulta: 15 de julio de 2018).

Rubio N.C., Bermejo-Barrera P., Bermejo A., Moreda-Piñeiro A. Development of a reliable method for assessing coca alkaloids in oral fluid by HPLC-MS/MS. *Journal of Analytical Toxicology.* 2019;43:196–202.

Rubio N.C., Hastedt M., Gonzalez J., Pragst F. Possibilities for discrimination between chewing of coca leaves and abuse of cocaine by hair analysis including hygrine, cuscohygrine, cinnamoylcocaine and cocaine metabolite/cocaine ratios. *Int. J. Legal Med.* 2014b;129(1):69-84

Rubio N.C., Marquez C., Confalonieri A., Castiglione J.L. La eliminación de la higrina y cuscohygrina en las primeras etapas de la producción ilícita de cocaína por el método ácido confirma la utilidad de estos marcadores para diferenciar mascaradores de hoja de coca de consumidores de cocaína. Poster, TIAFT, Perú. 2015.

Rubio N.C., Strano-Rossi S., Tabernero M.J., Anzillotti L., Chiarotti M., Bermejo A.M. Hygrine and cuscohygrine as possible markers to distinguish coca chewing from cocaine abuse in workplace drug testing. *Forensic Sci. Int.* 2013;227(1-3):60-3.

Rubio N.C., Strano-Rossi S., Tabernero M.J., González J.L., Anzillotti L., Chiarotti M., Bermejo A.M. Application of hygrine and cuscohygrine as possible markers to distinguish coca chewing from cocaine abuse on WDT and forensic cases. *Forensic Sci. Int.* 2014a;243:30-34

Rubio N.C., Thurmann D., Krumbiegel F., Pragst F. Behavior of hygrine and cuscohygrine in illicit cocaine production establishes their use as markers for chewing coca leaves in contrast to cocaine abuse. *Drug Test and Anal.* 2017;9(2):323-326.

Scheidweiler K.B., Kolbrich Spargo E.A., Kelly T.L., Cone E.J., Barnes A.J., and Huestis M.A. Pharmacokinetics of Cocaine and Metabolites in Human Oral Fluid and Correlation with Plasma Concentrations following Controlled Administration. *Ther Drug Monit.* 2010;32(5):628–637.

Substance Abuse and Mental Health Services Administration (SAMHSA) Mandatory guidelines for federal workplace drug testing programs-oral fluid. Federal Register, 80 FR 28053- 2015 Version. Department of Health

and Human Services, [en línea]. Disponible en: <https://www.federalregister.gov/documents/2015/05/15/2015-11523/mandatory-guidelines-for-federal-workplace-drug-testing-programs>. (Consulta: 15 de enero de 2018).