

TRABAJO ORIGINAL

Optimización y validación de un método analítico para la cuantificación de cocaína y sus metabolitos en fluido oral utilizando cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)

Optimization and validation of an analytical method for the quantification of cocaine and its metabolites in oral fluid using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)

Fernández, Nicolás*; Quiroga, Patricia Noemí

Universidad de Buenos Aires, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Cátedra de Toxicología y Química Legal, Laboratorio de Asesoramiento Toxicológico Analítico (CENATOXA). Junín 956 7mo piso (C1113AAD). Ciudad Autónoma de Buenos Aires (CABA). Buenos Aires, Argentina. Tel.: +54 11 52874741.

*nfernandez@ffyb.uba.ar; pquiroga@ffyb.uba.ar

Recibido: 12 de septiembre de 2024

Aceptado: 18 de diciembre de 2024

Editor: Edda Villaamil Lepori

Resumen: La cocaína (COC) es un potente estimulante del sistema nervioso central, cuyo consumo continúa siendo un problema de salud pública a nivel global. El fluido oral (FO) se ha consolidado como una matriz biológica alternativa y no invasiva para el monitoreo de COC y sus metabolitos, siendo especialmente útil en aplicaciones como los controles por conducir bajo la influencia de drogas, entornos laborales, toxicología clínica y justicia penal. En el presente trabajo se describe la optimización y validación de un método para la cuantificación de COC, benzoilecgonina (BE), ecgonina metil éster (EME) y cocaetileno (CE) en FO mediante cromatografía gaseosa-espectrometría de masas (GC-MS), previa extracción en fase sólida (SPE). La SPE se optimizó utilizando 250 µL de FO (pH 6), seguido de acondicionamiento con buffer fosfato de sodio y extracción con diclorometano/2-propanol/amoníaco (70:26:4 v/v), y posterior derivatización con anhídrido pentafluoropropiónico y hexafluoro-2-propanol. El método fue validado de acuerdo con directrices internacionales, utilizando estándares deuterados (COC-d³, BE-d³, EME-d³, CE-d³). La curva de calibración obtenida fue lineal en el rango de trabajo (5 y 800 ng/mL), con coeficientes de correlación superior a 0,990 y un límite inferior de cuantificación (LC) de 5 ng/mL. La precisión intraensayo varió entre 2,2% y 14,4%, y la interensayo entre 4,2% y 14,9%, mientras que la exactitud, en términos de error relativo, fue de ±10%. La recuperación relativa osciló entre 89% y 106%. Los analitos mostraron estabilidad durante tres ciclos de congelado/descongelado. La aplicación del método a muestras de consumidores de COC demostró un rendimiento excelente. En conclusión, el método propuesto es altamente sensible, específico y rápido, con excelentes tasas de recuperación y precisión. Estas características lo hacen ideal para su aplicación en diversos campos de la toxicología, incluyendo toxicología laboral, clínica y forense.

Palabras clave: Cocaína; Benzoilecgonina; Fluido oral; Cromatografía gaseosa - espectrometría de masas; Validación.

Abstract: Cocaine (COC) is a potent central nervous system stimulant, the consumption of which continues to be a global public health issue. Oral fluid (OF) has emerged as a reliable, non-invasive biological matrix for monitoring COC and its metabolites, proving particularly useful in driving under the influence of drugs (DUID) testing, occupational settings, clinical toxicology, and criminal justice applications. This study describes the optimization and validation of a method for the quantification of COC, benzoylecgonine (BE), ecgonine methyl ester (EME), and cocaethylene (CE) in OF using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), preceded by solid-phase extraction (SPE). SPE was optimized using 250 µL of OF (pH 6), followed by conditioning with sodium phosphate buffer and extraction with dichloromethane/2-propanol/ammonia (70:26:4 v/v), and subsequent derivatization with pentafluoropropionic anhydride and hexafluoro-2-propanol. The method was validated according to international guidelines, using deuterated

standards (COC-d³, BE-d³, EME-d³, CE-d³). The obtained calibration curve was linear within the working range (5 to 800 ng/mL), with correlation coefficients above 0.990 and a lower limit of quantification (LLOQ) of 5 ng/mL. Intra-assay precision ranged from 2.2% to 14.4%, and inter-assay precision from 4.2% to 14.9%, while accuracy, in terms of relative error, was $\pm 10\%$. The relative recovery ranged from 89% to 106%. The analytes demonstrated stability through three freeze-thaw cycles. Application of the method to samples from cocaine users showed excellent performance. In conclusion, the proposed method is highly sensitive, specific, and rapid, with excellent recovery and precision rates. These characteristics make it ideal for application in various fields of toxicology, including occupational, clinical, and forensic toxicology.

Keywords: Cocaine; Benzoylecgonine; Oral fluid; Gas chromatography - mass spectrometry; Validation.

INTRODUCCIÓN

La cocaína (COC) es una droga estimulante cuyo consumo sigue representando un serio problema de salud pública global. Según el Informe Mundial sobre Drogas 2023 de la Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (UNODC), la producción mundial de cocaína alcanzó un máximo histórico en 2021, impulsando también un aumento en su demanda. América Latina sigue siendo una de las principales regiones afectadas, tanto por ser zona de producción como por el incremento sostenido en el consumo de cocaína en varios de sus países (UNODC 2023).

El abuso de COC no solo tiene consecuencias a nivel individual y social, sino que también genera un importante desafío en ámbitos como las pruebas por conducción bajo los efectos de drogas, el monitoreo en ambientes laborales y la administración de justicia penal, donde la detección confiable y rápida de la droga es esencial para la prevención y el control.

En los últimos años, el uso del fluido oral (FO) como matriz biológica alternativa para la detección de drogas ha ganado aceptación debido a su carácter no invasivo, la facilidad de recolección y la capacidad de reflejar concentraciones similares a las de la sangre en situaciones agudas de consumo (Drummer 2008; Bosker y Huestis 2009; Wille *et al.* 2014; Desrosiers y Huestis 2019; Gallardo *et al.* 2023). En el caso de la COC, el FO ha demostrado ser eficaz para detectar tanto la sustancia original como sus principales metabolitos: benzoilecgonina (BE), ecgonina metil éster (EME) y cocaetileno (CE), cada uno con importancia diagnóstica y toxicológica (Cone *et al.* 1997; Clauwaert *et al.* 2004; Verstraete 2004; Ellefsen *et al.* 2016; Bassotti *et al.* 2020). La BE es el principal metabolito de la COC y se considera un marcador clave de consumo, mientras que el CE, formado en presencia de alcohol, está asociado a mayor toxicidad y efectos cardiovasculares adversos (Xu *et al.* 1994; Roque Bravo *et al.* 2022).

Para la detección de COC y sus metabolitos en FO, la cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) se ha consolidado como una de las

técnicas analíticas de mayor sensibilidad y especificidad. Esta técnica permite la identificación precisa de los compuestos analizados, lo que resulta fundamental en contextos clínicos y forenses, donde la sensibilidad y la especificidad son requisitos indispensables (Barroso *et al.* 2009; Bosker y Huestis *et al.* 2009; Ellefsen *et al.* 2016). Sin embargo, el análisis depende en gran medida de una adecuada preparación de la muestra y de la optimización del método de extracción, siendo la extracción en fase sólida (SPE) una de las metodologías preferidas debido a su capacidad para concentrar y purificar los analitos de interés (Fernández *et al.* 2019; Álvarez-Freire *et al.* 2023). En comparación con la extracción líquido-líquido, la SPE ofrece mayor selectividad mediante el uso de fases estacionarias específicas, menor consumo de disolventes orgánicos, lo que disminuye los costos y el impacto ambiental, así como mejor reproducibilidad y recuperación de analitos, incluso en bajas concentraciones.

El objetivo de este estudio fue la optimización y validación de un método basado en GC-MS, con previa extracción en fase sólida, para la cuantificación de COC, BE, EME y CE en fluido oral. La validación del método se llevó a cabo de acuerdo con las normativas internacionales, evaluando parámetros críticos como la selectividad, el límite de cuantificación (LC), la linealidad, la precisión intra e interensayo, la exactitud, la recuperación y la estabilidad de los analitos. La consistencia del enfoque analítico asegura la fiabilidad del método para su aplicación en diversos contextos, desde el control por conducir bajo la influencia de drogas hasta la toxicología clínica y forense.

En resumen, este trabajo constituye un aporte original a la toxicología analítica, mediante el desarrollo y validación de un método sensible, específico y reproducible para la determinación de COC y sus principales metabolitos en fluido oral. La metodología propuesta se distingue por la optimización de los volúmenes de solventes en las etapas de acondicionamiento, lavado y elución en SPE, ajustados según la masa de relleno de las columnas utilizadas, lo cual mejora la eficiencia y reduce el uso de reactivos. Además, por primera vez, se emplea la combinación de HFP y PFPA como agentes

de derivatización para el análisis de estos compuestos en esta matriz biológica. Estas estrategias metodológicas permiten alcanzar una adecuada sensibilidad y especificidad, posicionando al método como una herramienta útil en estudios de monitoreo del consumo de COC en poblaciones reales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos y estándares

Los estándares analíticos: EME, BE, COC y CE en soluciones de acetonitrilo a 1,0 mg/mL; y los estándares internos (EI): ecgonina metil éster- d^3 (EME- d^3), benzoilecgonina- d^3 (BE- d^3), cocaína- d^3 (COC- d^3), y cocaetileno- d^3 (CE- d^3) en soluciones de acetonitrilo a 0,1 mg/mL, se adquirieron de Cerilliant (Round Rock, TX, EE. UU.).

El metanol, diclorometano, isopropanol, acetato de etilo e hidróxido de amonio fueron provistos por Merck Química (Buenos Aires, Argentina); todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico ACS o para cromatografía. El ácido clorhídrico (37% v/v) fue obtenido de Merck Química (Buenos Aires, Argentina). El agua ultrapura fue obtenida mediante un equipo PURELAB flex 1 (ELGA LabWater, Buenos Aires, Argentina).

El 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol [para derivatización en GC, 99%] (HFP) y el anhídrido pentafluoropropiónico [para derivatización en GC, 99%] (PFPA) se adquirieron de Sigma Aldrich (Buenos Aires, Argentina).

Los cartuchos Clean Screen® de SPE (CSDAU 131) fueron obtenidos de United Chemical Technologies (UCT Inc., Bristol, PA, EE. UU.), y los colectores de vacío fueron provistos por Varian (Lake Forrest, CA, EE. UU.).

Calibradores, controles de calidad y estándares internos

Se preparó una solución de trabajo (A) mediante la dilución adecuada de cada solución primaria (1 mg/mL) en acetonitrilo, obteniendo una concentración de 5 µg/mL para EME, BE, COC y CE. Posteriormente, se preparó una segunda solución de trabajo a una concentración de 0,5 µg/mL para estos mismos analitos, diluyendo la solución de trabajo (A) en acetonitrilo.

Las soluciones primarias de los estándares internos (EI), con una concentración inicial de 100 µg/mL, se diluyeron en acetonitrilo para obtener una solución de EI a 5 µg/mL.

Todas las soluciones primarias y de trabajo fueron almacenadas a -20 °C en viales de vidrio ámbar para preservar su estabilidad.

Los calibradores de trabajo con concentraciones de 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 600 y 800 ng/mL se prepa-

raron diariamente mediante la adición de estas soluciones a un blanco de fluido oral (volumen final: 1 mL). A cada punto de calibración confeccionado en fluido oral se adicionó EI (5 µg/mL), obteniendo una concentración final de 300 ng/mL.

Las muestras de control de calidad (CC) se prepararon diariamente usando fluido oral blanco (volumen final: 1 mL) a concentraciones de 5, 35, 150, 350 y 750 ng/mL.

Equipamiento

La optimización y cuantificación se realizó con un cromatógrafo gaseoso Hewlett-Packard (HP6890N, Palo Alto, California, EEUU) equipado con inyector automático HP6890, acoplado a un detector de masas MSD5973 Network (Agilent Technologies, Palo Alto, California, EEUU) y con una columna capilar HP-5MS (5% fenil-metilpolisiloxano, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) provista por J&W Scientific, (Folsom, CA, EEUU).

Muestras biológicas

Para la optimización y validación del método desarrollado, se utilizó fluido oral de voluntarios del personal del laboratorio (n: 25), quienes no estuvieron expuestos a COC, con el fin de garantizar que la matriz utilizada estuviera libre de interferencias por la presencia de esta sustancia y sus metabolitos. Las muestras se recolectaron sin estimulación previa, utilizando diferentes kits comerciales diseñados para este fin, en recipientes específicos, siguiendo las especificaciones de los fabricantes, sin requerir preparación previa del voluntario ni pretratamiento de la muestra, con un volumen mínimo de aproximadamente 0,5 – 1,0 mL.

Una vez optimizado el método, se procedió a la verificación mediante el análisis de fluido oral de individuos expuestos a COC. Estas muestras fueron obtenidas de personas que acudieron al Laboratorio de Asesoramiento Toxicológico Analítico (CENATOXA), quienes presentaban solicitudes de confirmación por GC-MS, luego de obtener resultados positivos de COC en pruebas de cribado realizadas sobre fluido oral.

Preparación de las muestras

Las muestras de fluido oral fueron homogeneizadas y centrifugadas utilizando un volumen de 0,5 mL. A una alícuota de 250 µL se le añadieron 15 µL de una solución de EI (5 µg/mL). La mezcla fue homogeneizada en vórtex durante 15 segundos y se dejó en reposo a temperatura ambiente por 10 minutos. Luego, se incorporaron 800 µL de buffer fosfato 100 mM (pH 6,00).

El acondicionamiento de las columnas SPE consistió en la aplicación secuencial de 520 µL de metanol, 520 µL de agua destilada y 520 µL de ácido clorhídrico 0,1 N. Posteriormente, la muestra se aplicó a una velocidad

de elución de 1 mL/min, seguida de una secuencia de lavado con 1,3 mL de agua destilada, 1,3 mL de HCl 0,1 N y 1,3 mL de una mezcla metanol/agua destilada (50:50, v/v). La elución se realizó con 2,1 mL de una mezcla de diclorometano: isopropanol: amoníaco (70:26:4, v/v/v), y el eluido se evaporó a sequedad bajo corriente de nitrógeno. Finalmente, al extracto seco se le añadieron 35 µL de PFPA y 15 µL de HFIP, se incubó en baño seco a 70 °C durante 10 minutos. Posteriormente, se evaporó a sequedad bajo corriente de nitrógeno y el residuo se re suspendió en 50 µL de acetato de etilo para su análisis por GC-MS.

Condiciones cromatográficas y del detector de masas
El programa de temperatura del horno fue 90 °C durante 2 minutos con una rampa de 20 °C/ min hasta 300 °C durante 3 minutos. La temperatura del inyector, línea de transferencia y fuente de ionización, fueron de 220, 280 y 220 °C respectivamente. El modo de inyección utilizado fue splitless, con un volumen de inyección de 2 µL y flujo de helio de 0,8 mL/min. La fragmentación se efectuó por impacto electrónico, a una corriente de 300 mA, energía del electrón de 70 eV, operado en modo SIM. En la *Tabla 1* se resumen los parámetros del espectrómetro de masas optimizados para cada compuesto.

Tabla 1. Parámetros del espectrómetro de masa optimizados para cada compuesto.

Compuesto	Tiempo de Retención (min)	Ventana de Tiempo (min)	Ion Cuantificador (m/z)	Ion Cualificador 1 (m/z)	Ion Cualificador 2 (m/z)	Dwell time (ms)	Peak width (m/z units)
EME	7,52	7,00 – 8,00	182	82	345	80	0,5
BE	10,65	10,00 – 11,40	318	334	439	80	0,5
COC	11,75	11,40 – 11,90	182	272	303	80	0,5
CE	12,00	11,90 – 13,00	196	272	317	80	0,5

EME ecgonina metil ester, BE benzoilecgonina, COC cocaína, CE cocaetileno.

Análisis de datos

El análisis de los datos obtenidos mediante GC-MS se realizó utilizando el software MSD ChemStation Data Analysis, provisto por Agilent Technologies. Para cada ion analizado, se determinó el tiempo de retención, el tiempo de retención relativo y la abundancia relativa porcentual en relación con el ion cuantificador. El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo utilizando el software GraphPad Prism 5.0 (2009), de GraphPad Software.

Optimización del método

El método fue optimizado para mejorar la eficiencia, selectividad y sensibilidad en la detección de EME, BE, COC y CE en fluido oral. Las modificaciones consistieron en ajustes en los volúmenes de los solventes utilizados en los pasos de acondicionamiento, lavado y elución de la columna SPE, los cuales se adaptaron en función de la masa del relleno de la columna empleada, que difería de la especificada en el protocolo descrito para la detección de COC en fluido oral, según el Clinical and Forensic Applications Manual de United Chemical Technologies Inc. (UCT 2023). En el paso de derivatización, se implementó el uso en conjunto de los reactivos HFP y PFPA.

Extracción en fase sólida (SPE)
La extracción de los compuestos se realizó siguiendo el protocolo descrito para la detección de COC en fluido oral, según el Clinical and Forensic applications manual de United Chemical Technologies Inc. (UCT 2023), pero con modificaciones específicas en varios pasos clave. A continuación, se detallan las modificaciones introducidas:

- Columna utilizada, Clean Screen® DAU [CSCOC 131 (130 mg/ 1 mL)]. Columna de modo mixto con fase reversa (C8) e intercambio iónico fuerte (ácido bencenosulfónico).
- Preparación de muestra: volumen de fluido oral 250 µL.
- Acondicionamiento de la columna: se utilizó 520 µL de metanol, 520 µL de agua ultrapura y 520 µL de ácido clorhídrico 100 mM.
- Lavado de la columna: se utilizó 1 300 µL de agua ultrapura, 1 300 µL de ácido clorhídrico 100 mM y 1 300 µL de metanol / agua ultrapura (50/50).
- Elución: se utilizó 2 100 µL de diclorometano / Isopropanol / Amoniaco (70/26/4).

Derivatización
Se reemplazó el uso de N,O-bis(trimethylsilyl)trifluo-

roacetamide (BSTFA) con 1% de trimethylchlorosilane (TMCS) por la combinación de PFPA y HFP, incubando la mezcla a 70 °C durante 10 minutos. Posteriormente, se evaporó a sequedad bajo corriente de nitrógeno y el residuo obtenido se resuspendió en 50 µL de acetato de etilo para su análisis mediante GC-MS.

Validación del Método Analítico

La validación del método analítico fue realizada conforme a las directrices de la Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX 2019), United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC 2009), la Food and Drug Administration (FDA 2020). Los parámetros evaluados fueron los siguientes:

Selectividad y Especificidad

Para evaluar la especificidad y la selectividad, se analizaron muestras de fluido oral de individuos no expuestos a la sustancia de interés (n=10), quienes estaban bajo tratamiento con diversos fármacos (ibuprofeno, paracetamol, clonazepam, alprazolam, lamotrigina, etinilestradiol, entre otros) y con hábitos de consumo frecuente de mate, café y tabaco.

Las muestras fueron extraídas y analizadas según el procedimiento previamente descrito. Se compararon los picos en el tiempo de retención de interés con los de muestras de fluido oral enriquecidas con los analitos en el LC.

Los criterios de aceptación para la identificación de compuestos fueron según los establecidos por la World Anti-Doping Agency (WADA, 2023). El tiempo de retención absoluto debía estar dentro del $2\% \pm 0,1$ minutos del tiempo de retención del mismo analito en el LC. La identificación mediante espectrometría de masas (modo SIM) requería la adquisición de al menos tres iones diagnósticos, y que sus abundancias relativas no difirieran en más de una cantidad tolerada con respecto a las generadas por el mismo compuesto en el LC preparado y analizado de manera contemporánea (si la abundancia relativa del ion en la muestra control era mayor al 50%, se aceptaba una tolerancia absoluta de $\pm 10\%$; si este valor era entre el 25% y el 50%, se permitía una tolerancia relativa de $\pm 20\%$; si se encontraba entre el 5% y el 25%, se aceptaba una tolerancia absoluta de $\pm 5\%$; y, finalmente, para abundancias relativas de iones de 5% o menos, se utilizaba una tolerancia relativa de $\pm 50\%$).

El método se considerará selectivo y específico si no se pudiera identificar ningún pico interferente en las muestras blanco al aplicar estos criterios.

Linealidad y Límite de Cuantificación (LC)

Para evaluar la linealidad del método, se preparó una curva de calibración durante siete días consecutivos, utilizando fluido oral fortificado para obtener concen-

traciones finales de 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 600 y 800 ng/mL (siete réplicas para cada concentración). La linealidad se analizó graficando la relación de áreas entre el ion cuantificador de cada compuesto y su análogo deuterado en función de la concentración del analito. Los criterios de aceptación incluyeron un coeficiente de determinación (R^2) igual o superior a 0,99, y una exactitud expresada en términos de error relativo porcentual (ER %) de los calibradores menor que 20% para el nivel bajo y menor que 15% para los niveles medio y alto. Además, se calcularon los valores medios y las desviaciones estándar ($\pm DE$) de las pendientes, las ordenadas al origen y los coeficientes de determinación (R^2) de las curvas de calibración diarias. Para evaluar la linealidad se aplicaron el test F de Fisher.

El LC se determinó analizando 10 réplicas de fluido oral blanco fortificadas con EME, BE, COC y CE a una concentración de 5 ng/mL (SWGTOX 2019). Se verificó que las relaciones señal/ruido de todos los analitos fueran superiores a 10. La relación señal/ruido se determinó utilizando la herramienta S/N del software Chemstation. Esta relación se definió como la altura del pico del ion cuantificador para cada compuesto dividida por el ruido pico a pico, el cual se midió desde -0,05 minutos hasta el inicio del pico. Además, se evaluaron los datos de precisión y exactitud. Los criterios de aceptación para el LC fueron un coeficiente de variación (CV %) y un ER % menor que 20% (SWGTOX 2019; FDA 2020).

Precisión y Exactitud

Precisión Intraensayo: se evaluó en cuatro concentraciones (5, 10, 300 y 800 ng/mL), fortificando fluido oral blanco y procesando cinco réplicas por concentración. El criterio de aceptación fue un CV % menor que 20% para el nivel bajo y menor que 15% para los niveles medio y alto (SWGTOX 2019; FDA 2020).

Precisión Interensayo: se estimó en cinco concentraciones (5, 35, 150, 350 y 750 ng/mL) con tres réplicas por concentración, durante cinco días consecutivos. El criterio de aceptación fue un CV % menor que 20% en el nivel bajo y menor que 15% en los niveles medio y alto (SWGTOX 2019; FDA 2020). La precisión intracorrída e inter-corrída se calculó mediante un análisis de varianza (ANOVA) de un solo factor, considerando el número de corrída como el factor categórico del modelo (SWGTOX 2019).

La exactitud se valoró en términos de ER %, con criterios de aceptación de un ER % menor que 20% para el nivel bajo y menor que 15% para los niveles medio y alto (FDA 2020).

Recuperación

La recuperación se determinó fortificando muestras de fluido oral en cuatro niveles de concentración (5, 10,

300 y 800 ng/mL), con 5 réplicas por nivel. Se compararon las áreas de los iones cuantificadores en el fluido oral fortificado con las obtenidas a partir de la disolución del analito puro en solución de acetonitrilo. El criterio de aceptación fue un CV % menor que 20% en el nivel bajo y menor que 15% en los niveles medio y alto (UNODC 2009).

Estabilidad

La estabilidad se determinó fortificando muestras de fluido oral a concentraciones baja, media y alta (35, 150, 350 y 750 ng/mL), con tres réplicas por nivel. Estas muestras se sometieron a tres ciclos de congelado (-20 °C) y descongelado. La estabilidad se evaluó en términos de CV %, siendo aceptable un valor menor que 20% en el nivel bajo y menor que 15% en los niveles medio y alto. También se evaluó en términos de ER %, con criterios de aceptación de un ER % menor que 20% para el nivel bajo y menor que 15% para los niveles medio y alto.

Aplicación en Muestras Reales

Finalmente, para la validación del método en muestras reales, se analizaron muestras de fluido oral (n=13) enviadas al CENATOXA para confirmar los resultados positivos en la prueba inicial de screening para BE. Los criterios de confirmación empleados fueron los establecidos por la World Anti-Doping Agency (WADA 2023), garantizando así que el método cumple con los estándares internacionales para la detección de sustancias en fluidos biológicos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La determinación de COC y sus metabolitos en FO es una herramienta clave para el monitoreo del consumo de COC, dada su capacidad para reflejar de manera precisa las concentraciones de la droga en sangre en situaciones de consumo reciente (Scheidweiler *et al.* 2010). La correlación entre las concentraciones de cocaína y sus metabolitos en plasma y FO ha sido ampliamente estudiada, mostrando una relación positiva significativa entre ambos fluidos. Aunque las concentraciones en FO suelen ser más bajas que en plasma, los metabolitos de la cocaína siguen un patrón similar en ambos casos, lo que sugiere que el FO puede ser una matriz alternativa viable (Cone *et al.* 1988; Scheidweiler *et al.* 2010). Sin embargo, se observa que el fluido oral presenta una ventana de detección más estrecha, lo que implica que los niveles de cocaína en esta muestra disminuyen más rápidamente tras su consumo, lo que puede representar tanto una ventaja para detectar el consumo reciente como una limitación en determinados contextos. Los metabolitos, como la BE, tienen

una correlación más fuerte en ambos fluidos, lo que refuerza su utilidad como biomarcador para la detección de consumo reciente de cocaína, incluso cuando los niveles de la droga en plasma ya han disminuido (Scheidweiler *et al.* 2010).

El metabolismo de la COC se produce principalmente en el hígado, donde la COC se hidroliza a través de la acción de las enzimas carboxilesterasas. Este proceso da lugar a la formación de BE, que luego se excreta predominantemente en la orina (Cone *et al.* 1997). La identificación y cuantificación de estos metabolitos en FO es posible debido a la presencia de cantidades significativas de BE en fluidos biológicos como la saliva, lo que permite la detección en un período temporal más corto en comparación con otras matrices como la orina (Cone *et al.* 1997; Scheidweiler *et al.* 2010).

En la práctica, la determinación de COC y sus metabolitos en FO se realiza utilizando técnicas altamente sensibles como GC-MS (UNODC 2014; SAMHSA 2023). Esta metodología ofrece especificidad y elevada sensibilidad, permitiendo la detección precisa de la COC, BE, EME y CE incluso en concentraciones bajas. La ventaja del FO como matriz biológica reside en su facilidad de recolección no invasiva, lo que facilita su aplicación en pruebas rápidas de detección, tanto en el control de tránsito como en entornos laborales (Bosker y Huestis 2009; UNODC 2014).

La técnica de SPE es esencial en la preparación de muestras para la detección de COC y sus metabolitos en fluido oral, proporcionando un método reproducible y eficiente. Diferentes tipos de fases sólidas, como las fases C18, mixtas y copoliméricas (Fernández *et al.* 2019), ofrecen alternativas que se adaptan a las propiedades fisicoquímicas de la COC y sus metabolitos, optimizando la recuperación y minimizando las interferencias.

En el marco de este trabajo, se utilizó una columna copolimérica para la extracción en fase sólida de COC y sus metabolitos. Estas columnas ofrecen una alta capacidad de retención para una amplia gama de compuestos debido a su estructura porosa y capacidad de interactuar con los analitos a través de múltiples mecanismos. Estas fases son especialmente útiles para la extracción simultánea de cocaína y sus diferentes metabolitos, incluyendo la BE y la CE (Fernández *et al.* 2019; UCT 2023). En el presente trabajo se adaptaron los volúmenes de solventes empleados en los pasos de acondicionamiento, lavado y elución de columnas de SPE, en función de la masa del relleno de la columna utilizada. El enfoque se basa en el "Clinical and Forensic Applications Manual" de United Chemical Technologies Inc. (UCT 2023), donde se especifican ciertos volúmenes estándar de solventes para estas etapas. Sin embargo, en este estudio se utilizó una columna con un relleno de 130 mg, lo que requirió modificaciones en los volúmenes de solvente para optimizar el rendi-

miento de la extracción. Este ajuste es crítico para garantizar la eficiencia en la retención y recuperación de los analitos de interés.

La derivatización es un procedimiento clave en la determinación de COC y sus metabolitos en FO mediante GC-MS, ya que mejora la volatilidad, estabilidad y la capacidad de detección de los compuestos. En particular, el uso en conjunto del HFP y PFPA ha demostrado ser altamente eficaz en la optimización de los análisis de COC y metabolitos en muestras de orina (Fernández *et al.* 2019). En este estudio, se adaptó el uso combinado de HFP y PFPA, previamente utilizado en el CENATOXA para el análisis de COC y sus metabolitos en muestras de orina, para la detección de estos analitos en FO. Esta modificación metodológica permitió explorar una nueva matriz biológica con ventajas sobre la orina, como lo es el FO, que presenta un acceso más

simple y menos invasivo, así como una correlación más cercana con los niveles de drogas en circulación en el momento de la toma de muestra.

Según nuestro conocimiento, esta es la primera vez que se emplean estos derivatizantes combinados para el análisis de COC y sus metabolitos en FO. Los resultados obtenidos mostraron que la combinación de HFP y PFPA es igualmente eficaz en la derivatización de estos compuestos en esta matriz, proporcionando una adecuada sensibilidad y especificidad.

El análisis de blancos de FO (n=10) no mostró picos interferentes en la ventana de detección de cada analito y de su análogo deuterado (Figura 1a), lo que demuestra la especificidad del método. Esta ausencia de interferencias es esencial, donde la complejidad de la matriz de FO puede generar interferencias con otros compuestos endógenos o exógenos.

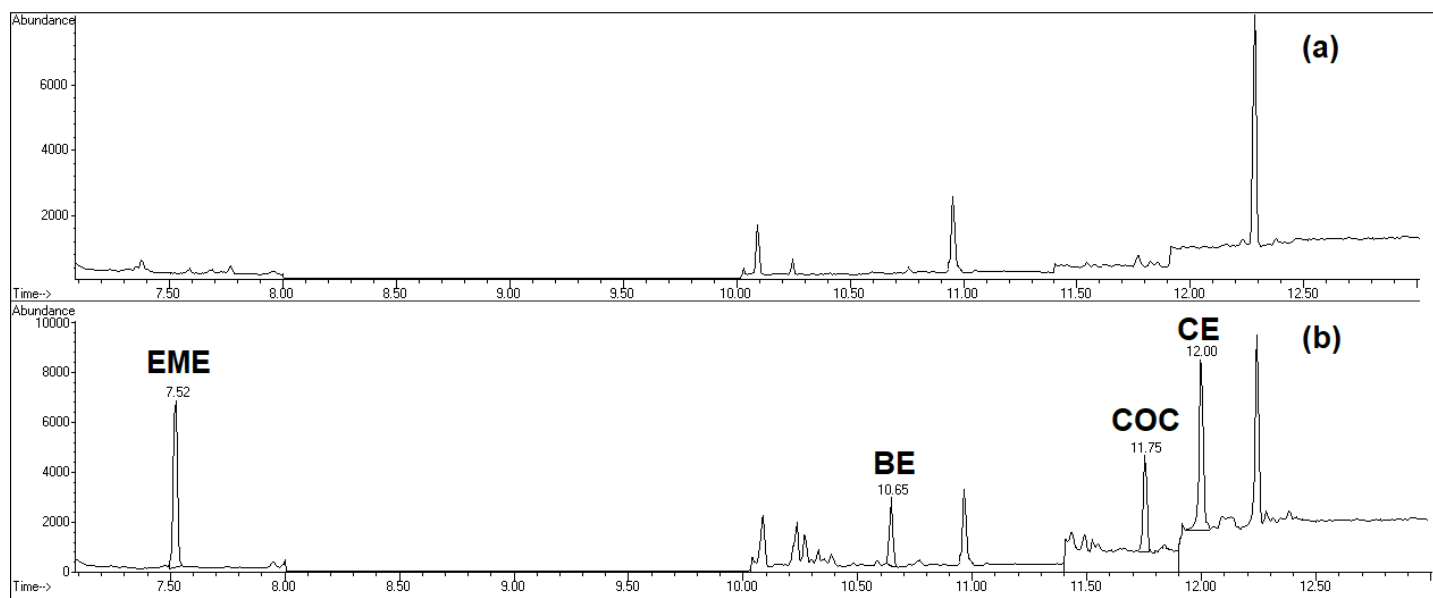


Figura 1. Cromatograma de una muestra de fluido oral blanco (a) y de una muestra de fluido oral fortificada en el LLOQ (b), adquiridos en modo SIM. **EME** egonina metil ester, **BE** benzoilecgonina, **COC** cocaína, **CE** cocaetileno.

Además, la selectividad del espectrómetro de masas fue reforzada por la utilización de ventanas de detección (m/z) estrechas que permitió la identificación precisa de los iones seleccionados, garantizando así la adecuada identificación y cuantificación del analito sin interferencias significativas.

El método desarrollado para la cuantificación de EME, BE, COC y CE en muestras de FO demostró una especificidad adecuada y alta selectividad bajo las condiciones cromatográfica descritas. Se logró una separación óptima entre los analitos, con una resolución adecuada para evitar interferencias entre los compuestos.

El modelo de calibración fue evaluado a partir de un

conjunto de siete curvas de calibración. La suposición de homocedasticidad se evaluó mediante un análisis de regresión lineal. Esta evaluación se llevó a cabo graficando los residuos en función de la concentración obtenida en el ensayo intra-diario y aplicando una prueba F. El gráfico de residuos mostró claramente que el error no se distribuía aleatoriamente en torno al eje de concentración. Asimismo, la prueba F reveló una diferencia significativa entre las varianzas, por lo cual no se cumplió con el supuesto de homocedasticidad. Para compensar la heterocedasticidad, se aplicaron regresiones ponderadas por mínimos cuadrados. Se evaluaron seis factores de ponderación para cada compuesto

Tabla 2. Linealidad (n=7).

Compuesto	IS	Modelo	Rango Lineal (ng mL ⁻¹)	Pendiente (media ± SD) (n=7)	y-Intercepto (media ± SD) (n=7)	R ² (rango) (n=7)
EME	EME-d ³	1/X ²	5 - 800	0,00341±0,00041	0,01930±0,01851	0,9911-0,9957
BE	BE- d ³	1/X ²	5 - 800	0,00245±0,00026	0,01181±0,00902	0,9927-0,9957
COC	COC-d ³	1/X ²	5 - 800	0,00276±0,00049	0,02298±0,01172	0,9910-0,9940
CE	CE-d ³	1/X ²	5 - 800	0,00327±0,00023	0,04370±0,02172	0,9902-0,9948

Media y desviación estándar.
EME ecgonina metil ester, BE benzoilecgonina, COC cocaína, CE cocaetileno.

(1/x^{0,5}, 1/x, 1/x², 1/y^{0,5}, 1/y, 1/y²). La selección del factor de ponderación más adecuado se realizó en función del ER% asociado a cada uno. Se eligió el factor que presentó la menor suma de errores y que, simultáneamente, mostró un valor medio de R² ≥ 0,99. Dicho factor fue 1/x² para todos los analitos evaluados. A partir de estas regresiones ponderadas por mínimos cuadrados, se obtuvieron relaciones lineales válidas entre 5 y 800 ng/mL para todos los analitos, con coeficientes de correlación superiores a 0,990 y a exactitud de los calibradores [ER%] fue inferior a ±15% para todas las concentraciones evaluadas. En la Tabla 2 se presentan los valores medios y las desviaciones estándar de las pendientes, las ordenadas al origen y los coeficientes de determinación (R²) de las curvas de calibración para cada compuesto. Estos resultados son consistentes con los estándares internacionales para la validación de métodos bioanalíticos, y comparables con otros estudios en fluido oral que también reportaron coeficientes de correlación mayores a 0,99 para cocaína y sus metabolitos (Cámpora *et al.*

2003; Concheiro *et al.* 2010; Montesano *et al.* 2015; Fiorentin *et al.* 2017; Fabresse *et al.* 2019)
El LC obtenido en este estudio fue de 5 ng/mL (Tabla 3, Figura 1b), proporciona una cuantificación precisa de bajas concentraciones de COC y sus metabolitos en FO. Este valor es comparable e incluso inferior al de algunos métodos previamente reportados en la literatura. Por ejemplo, Fabresse *et al.* (2019) reportaron un LC de 10 ng/mL para COC, BE, EME y CE en FO utilizando LC-MS/MS. Adicionalmente, Fiorentin *et al.* (2017) reportaron un LC de 4,25 ng/mL utilizando 1000 µL de FO. Cámpora *et al.* (2003) y Álvarez-Freire *et al.* (2023) reportaron LC de 1 ng/mL utilizando 1000 µL de FO. En contraste, nuestro estudio emplea un volumen significativamente menor (250 µL), lo que lo hace considerablemente más aplicable en la práctica. Esta reducción en el volumen requerido es crucial, ya que en los dispositivos de recolección de muestras de FO generalmente no se obtienen más de 1 mL de muestra, lo que limita la aplicabilidad de métodos que requieren mayores volúmenes.

Tabla 3. Límite de cuantificación (n=10).

Compuesto	Concentración Nominal (ng/mL)	Concentración media calculada ± SD (ng/mL)	CV ¹ (%)	ER ² (%)	S/R	Presencia de iones cualificadores
EME	5,0	4,4 ± 0,59	13,4	-12,0	42	Sí
BE	5,0	4,8 ± 0,42	8,0	-4,0	67	Sí
COC	5,0	5,3 ± 0,34	7,8	5,4	17	Sí
CE	5,0	4,7 ± 0,54	7,9	-6,5	49	Sí

Media y desviación estándar.
(¹) Coeficiente de variación (%).
(²) Error relativo (%) = [(concentración media calculada – concentración nominal)/concentración nominal] ×100]
S/R: Relación señal/ruido.
EME ecgonina metil ester, BE benzoilecgonina, COC cocaína, CE cocaetileno.

El LC obtenido en este estudio para COC y BE de 5 ng/mL, permite la cuantificación precisa de bajas concentraciones en FO. Este nivel de sensibilidad es particularmente relevante cuando se compara con los valores de corte (cut-off) para métodos confirmatorios establecidos por entidades internacionales para el análisis de drogas en el lugar de trabajo. Por ejemplo, la Substance Abuse and Mental Health Services Administration (SAMHSA 2023) de Estados Unidos establece un valor de cutoff para BE de 8 ng/mL en FO para pruebas de confirmación de COC en programas de monitoreo de drogas laborales y forenses. En la misma línea, la European Workplace Drug Testing Society (EWDTS 2022) establece un valor de corte similar de 8 ng/mL para la detección de BE en matrices orales en sus pautas para la detección de drogas

en el lugar de trabajo. El método desarrollado en este estudio, con un LC de 5 ng/mL, está en línea con estos valores de corte, lo que permite su aplicación en contextos forenses donde se requiere la detección de consumos recientes y la evaluación del cumplimiento de regulaciones internacionales. En cuanto a la precisión intraensayo, los resultados oscilaron entre 2,2% y 14,4%, mientras que la precisión interensayo varió entre 4,2% y 15,0% (Tabla 4). Estos valores se encuentran dentro de los límites aceptables establecidos por las guías de validación internacionales, y son comparables a los reportados por Cámpora *et al.* (2003). Además, la exactitud del método, expresada en términos de error relativo, fue de $\pm 12,8\%$ (Tabla 4), lo que indica una exactitud adecuada en la cuantificación de los analitos.

Tabla 4. Precisión intraensayo, precisión interensayo y exactitud.

Compuesto	Intra-día (n=5)				Inter-día (n=15)			
	Concentración Nominal (ng/mL)	Concentración Media \pm SD (ng/mL)	CV ¹ (%)	ER ² (%)	Concentración Nominal (ng/mL)	Concentración Media \pm SD (ng/mL)	CV ¹ (%)	ER ² (%)
EME	5	4,8 \pm 0,22	4,6	-4,0	5	5,2 \pm 0,39	7,5	4,0
	10	11,2 \pm 2,0	14,4	11,9	35	35,7 \pm 5,3	14,9	2,0
	300	314 \pm 11	3,6	4,8	150	160 \pm 13	8,0	6,9
	800	806 \pm 18	2,2	0,7	350	322 \pm 30	9,2	-11,3
					750	711 \pm 44	6,2	-5,2
BE	5	5,4 \pm 0,52	9,6	8,0	5	4,9 \pm 0,70	14,3	-2,0
	10	10,7 \pm 0,9	8,8	6,8	35	39,5 \pm 4,5	11,3	12,8
	300	318 \pm 15	4,6	5,9	150	168 \pm 7	4,2	12
	800	817 \pm 21	2,5	2,2	350	357 \pm 27	7,5	2,0
					750	728 \pm 44	6,0	-2,9
COC	5	4,6 \pm 0,33	7,2	-8,0	5	5,1 \pm 0,75	14,7	2,0
	10	9,5 \pm 1,0	13,1	-4,5	35	35,1 \pm 5,3	15,0	0,4
	300	313 \pm 14	4,5	4,4	150	156 \pm 14	9,2	3,9
	800	814 \pm 32	4,0	1,7	350	322 \pm 27	8,5	-8,0
					750	710 \pm 77	10,8	-5,4
CE	5	5,1 \pm 0,45	8,8	2,0	5	4,4 \pm 0,60	13,6	-12,0
	10	9,5 \pm 1,3	13,6	-4,9	35	36,4 \pm 4,6	12,6	4,1
	300	320 \pm 18	5,5	6,8	150	163 \pm 7,8	4,7	9,1
	800	817 \pm 45	5,5	2,1	350	331 \pm 27	8,1	-5,5
					750	715 \pm 48	6,7	-4,7

Media y desviación estándar.

(¹) Coeficiente de variación (%).

(²) Error relativo (%) = [(concentración media calculada – concentración nominal/concentración nominal) \times 100].

EME ecgonina metil ester, BE benzoilecgonina, COC cocaína, CE cocaetileno.

La recuperación relativa de los analitos fue del 89-106% (Tabla 5), reflejando una buena eficiencia del método, superando incluso los resultados de recuperación observados en estudios previos. Fiorentin *et al.* (2017) reportaron recuperaciones del 65-79% para BE, mientras que Concheiro *et al.* (2010) informaron

una recuperación para BE y EME del 25% y 18% respectivamente. El método propuesto por nuestro grupo ofrece una mejor capacidad de retención y recuperación de los analitos en esta matriz biológica. Esta elevada recuperación, asegura que el método es preciso y fiable para su uso en aplicaciones forenses y clínicas.

Tabla 5. Recuperación (%) evaluada a tres concentraciones (n=3).

Compuesto	Concentración Nominal (ng/mL)	Recuperación ± S.D. (%)	CV ¹ (%)
Ecgonina metil ester	5	98 ± 8	8,2
	10	100 ± 10	10,0
	300	96 ± 12	12,8
	800	106 ± 10	10,0
Benzoilecgonina	5	95 ± 4	4,2
	10	105 ± 7	7,0
	300	89 ± 4	4,8
	800	96 ± 4	4,2
Cocaína	5	103 ± 7	6,8
	10	104 ± 6	6,0
	300	99 ± 11	11,4
	800	100 ± 5	5,3
Cocaetileno	5	91 ± 2	2,2
	10	102 ± 12	12,0
	300	101 ± 9	9,3
	800	104 ± 4	4,1

Media y desviación estándar.

⁽¹⁾ Coeficiente de variación (%).

En cuanto a la estabilidad, los analitos resultaron ser estables durante tres ciclos de congelado y descongelado (Tabla 6), un aspecto crucial en el manejo de muestras biológicas que pueden estar sujetas a variaciones de temperatura durante el almacena-

miento o el transporte. Este resultado coincide con lo reportado por Montesano *et al.* (2015), quienes evaluaron la estabilidad de la cocaína y sus metabolitos en fluido oral bajo diferentes condiciones de almacenamiento.

Tabla 6. Estabilidad evaluada a 4 concentraciones (n=3).

Compuesto	Tres ciclos descongelado/congelado (-20°C)			
	Concentración Nominal (ng/mL)	Concentración Media ± SD (ng/mL)	CV ¹ (%)	ER ² (%)
Ecgonina metil ester	35	33 ± 3,0	9,3	-6,7
	150	150 ± 6,0	4,1	0,4
	350	345 ± 15	7,5	-1,4
	750	759 ± 29	8,4	1,2
Benzoilecgonina	35	36 ± 5,0	2,2	2,8
	150	152 ± 26	5,7	1,3
	350	359 ± 10	4,3	2,6
	750	763 ± 5,7	7,0	1,7
Cocaína	35	35 ± 3,7	10,9	-1,5
	150	153 ± 6,5	4,3	2,0
	350	338 ± 8,5	5,7	-3,4
	750	767 ± 11	9,6	2,3
Cocaetileno	35	38 ± 1,8	4,8	7,3
	150	166 ± 14	8,9	11,0
	350	341 ± 12	3,4	-2,6
	750	775 ± 21	5,1	3,3

Media y desviación estándar.
⁽¹⁾ Coeficiente de variación (%).
⁽²⁾ Error relativo (%) = [(concentración media calculada – concentración nominal/concentración nominal) ×100].

Aplicación en Muestras Reales

En el presente estudio, se analizaron 13 muestras de fluido oral previamente clasificadas como positivas para cocaína mediante una prueba inicial o de screening, las cuales fueron cuantificadas utilizando el método propuesto. Las muestras fueron sometidas a los criterios de confirmación establecidos por la WADA (2023). La distribución de los resultados obtenidos fue la siguiente: BE en 12 muestras (rango de concentración: 23,7 – 356,3 ng/mL), EME en 7 muestras (rango de concentración: 6,5 - 54,9 ng/

mL), COC en 5 muestras (rango de concentración: 13,2 – 42,2 ng/mL) y CE en 2 muestras (6,4 ng/mL y 8,1 ng/mL). En una muestra no se logró identificar la presencia de BE, COC, EME ni CE. Este resultado podría estar relacionado con una mala interpretación o con la especificidad de la prueba de detección inicial. En la *Tabla 7* se presentan los valores de BE, COC, EME y CE en las muestras analizadas, y en la *Figura 2* un cromatograma con los iones monitoreados de EME, BE, COC y CE para una muestra real (muestra #1).

Tabla 7. Aplicación en muestras reales.

Muestra #	EME (ng/mL)	BE (ng/mL)	COC (ng/mL)	CE (ng/mL)
1	19,2	297,7	28,8	8,1
2	54,9	356,3	42,2	6,4
3	ND	ND	ND	ND
4	ND	62,9	13,9	ND
5	ND	65,0	ND	ND
6	ND	189,7	13,3	ND
7	ND	132,1	13,2	6,5
8	10,2	37,3	ND	ND
9	15,6	34,8	ND	ND
10	12,2	48,6	ND	ND
11	ND	39,8	ND	ND
12	10,2	23,7	ND	ND
13	6,5	42,4	ND	ND

ND no detectable.
EME ecgonina metil ester, **BE** benzoilecgonina, **COC** cocaína, **CE** cocaetileno.

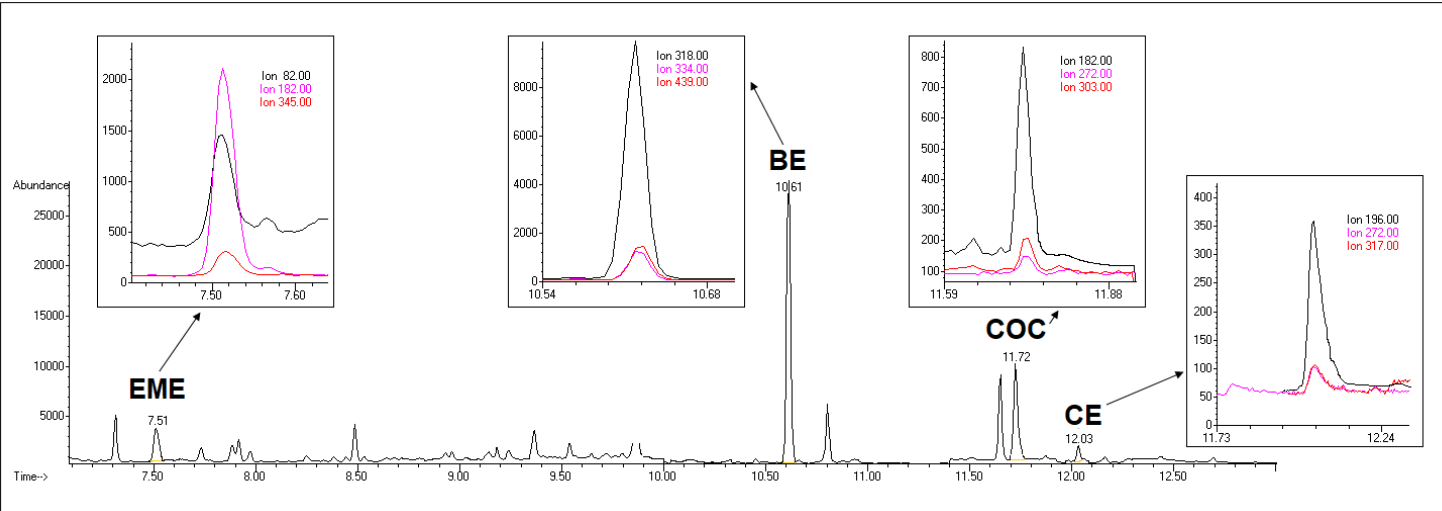


Figura 2. Cromatograma de una muestra de fluido oral (Muestra #1) con resultado positivo en la prueba inicial o screening identificada. **EME** ecgonina metil ester, **BE** benzoilecgonina, **COC** cocaína, **CE** cocaetileno.

CONCLUSIÓN

La determinación de COC y sus metabolitos en FO es una herramienta clave para el monitoreo del consumo reciente de esta droga. El método desarrollado en este estudio, basado en la cuantificación de EME, BE, COC y CE, demuestra ser altamente sensible y específico,

con un LC de 5 ng/mL, alineándose con los valores de corte establecidos por entidades internacionales como la SAMHSA y la EWDTs. Entre las principales ventajas del método destaca su capacidad para detectar bajas concentraciones de metabolitos con un pequeño volumen de muestra, lo cual es crucial en entornos forenses y clínicos, donde se re-

quiere sensibilidad y especificidad en la detección de consumos recientes. Además, la recuperación elevada y la estabilidad de los analitos en las condiciones de análisis optimizan la confiabilidad del método, superando incluso los resultados de estudios previos.

En comparación con otras publicaciones, el presente método no solo ofrece una mayor sensibilidad, sino que también simplifica el procesamiento de las muestras mediante la combinación de HFP y PFPA como agentes derivatizantes, facilitando su implementación en laboratorios toxicológicos. La alta selectividad y ausencia de interferencias, sumadas a la simplicidad en la recolección de FO como matriz biológica, refuerzan su valor para aplicaciones en controles por conducir bajo la influencia de drogas, monitoreo laboral y contextos forenses.

En resumen, el método propuesto ofrece un equilibrio ideal entre sensibilidad, precisión y simplicidad, consolidándose como una herramienta eficaz y robusta para el análisis toxicológico de COC y sus metabolitos en FO. Estas propiedades lo convierten en una alternativa competitiva frente a otros métodos disponibles, destacando su potencial para aplicaciones forenses, clínicas y laborales que requieren un enfoque confiable y eficiente.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la contribución de la investigación a los bioquímicos Ainchil Lorenzano, Jeremías A.; Carreras, Laura J.; Colazo Buttazzoni, Paula C.; Mongelós Gibelli, Diego A.; Stroia, Noelia G.

CONFLICTOS DE INTERESES

Los autores declaran que no poseen conflictos de intereses o relaciones personales que hayan podido influir sobre lo enunciado en este trabajo.

REFERENCIAS

- Álvarez-Freire I, Cabarcos-Fernández P, Rubio NC, Moreda-Piñeiro A, Tabernero-Duque MJ, Sánchez-Sellero I, Bermejo-Barrera P, Bermejo-Barrera AM. 2023. Detection of coca alkaloids in oral fluid from coca leaf (tea) consumers: using solid phase extraction to improve validation parameters and widen the detection window. *Analytical Methods*. 23;15(45): 6177-6183. <https://doi.org/10.1039/D3AY01298K>
- Barroso M, Gallardo E, Queiroz JA. 2009. Bioanalytical methods for the determination of cocaine and metabolites in human biological samples. *Bioanalysis*. 1(5): 977-1000. <https://doi.org/10.4155/bio.09.72>
- Bassotti E, Merone GM, D'Urso A, Savini F, Locatelli M, Tartaglia A, Dossetto P, D'Ovidio C, de Grazia U. 2020. A new LC-MS/MS confirmation method for the determination of 17 drugs of abuse in oral fluid and its application to real samples. *Forensic Science International*. 312: 110330. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2020.110330>
- Bosker WM, Huestis MA. 2009. Oral fluid testing for drugs of abuse. *Clinical Chemistry*. 55(11): 1910-1931. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.108670>
- Cámpora P, Bermejo AM, Tabernero MJ, Fernández P. 2003. Quantitation of cocaine and its major metabolites in human saliva using gas chromatography-positive chemical ionization-mass spectrometry (GC-PCI-MS). *Journal of Analytical Toxicology* 27(5): 270-4. <https://doi.org/10.1093/jat/27.5.270>
- Clauwaert K, Decaestecker T, Mortier K, Lambert W, Deforce D, Van Peteghem C, Van Boclaer J. 2004. The determination of cocaine, benzoylecgonine, and cocaethylene in small-volume oral fluid samples by liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*. 28(8): 655-9. <https://doi.org/10.1093/jat/28.8.655>
- Cone EJ, Kumor K, Thompson LK, Sherer M. (1988). Correlation of saliva cocaine levels with plasma levels and with pharmacologic effects after intravenous cocaine administration in human subjects. *Journal of Analytical Toxicology*. 12(4), 200-206. <https://doi.org/10.1093/jat/12.4.200>
- Cone EJ, Oyler J, Darwin WD. (1997). Cocaine Disposition in Saliva Following Intravenous, Intranasal, and Smoked Administration. *Journal of Analytical Toxicology*. 21(6), 465-475. <https://doi.org/10.1093/jat/21.6.465>
- Desrosiers BA y Huestis MA. 2019. Oral Fluid Drug Testing: Analytical Approaches, Issues and Interpretation of Results. *Journal of Analytical Toxicology*. 43(6): 415-443. <https://doi.org/10.1093/jat/bkz048>
- Drummer OH. 2008. Introduction and review of collection techniques and applications of drug testing of oral fluid. *Therapeutic Drug Monitoring*. 30(2): 203-6. <https://doi.org/10.1097/ftd.0b013e3181679015>
- Ellefsen KN, Concheiro M, Pirard S, Gorelick DA, Huestis MA. 2016. Cocaine and benzoylecgonine oral fluid on-site screening and confirmation. *Drug Testing and Analysis*. 8(3-4): 296-303. <https://doi.org/10.1002/dta.1966>

[EWDTS] European Workplace Drug Testing Society European. 2022. Guidelines for Workplace Drug Testing in Oral Fluid, Version 3.0.

Fabresse N, Aouad H, Knapp A, Mayer C, Etting I, Larabi IA, Alvarez JC. 2019. Development and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous detection of 10 illicit drugs in oral fluid collected with FLOQSwabs™ and application to real samples. *Drug Testing and Analysis*. 11(6): 824-832. <https://doi.org/10.1002/dta.2563>

Fernández N, Cabanillas LM, Olivera NM, Quiroga PN. 2019. Optimization and validation of simultaneous analyses of ecgonine, cocaine, and seven metabolites in human urine by gas chromatography-mass spectrometry using a one-step solid-phase extraction. *Drug Testing and Analysis*. 11(2): 361-373. <https://doi.org/10.1002/dta.2547>

Fiorentin TR, D'Avila FB, Comiran E, Zamboni A, Scherer JN, Pechansky F, Borges PEM, Fröhlich PE, Limberger RP. 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: 60-66. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2017.04.003>

[FDA] Food and Drug Administration. 2020. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Maryland: Department of Health And Human Services, Food and Drug Administration.

Gallardo E, Rosado T, Barroso M. 2023. The potential of oral fluid in drug monitoring: an update. *Bioanalysis*, 15(12): 657–660. <https://doi.org/10.4155/bio-2023-0122>

Montesano C, Simeoni MC, Curini R, Sergi M, Sterzo CL, Compagnone D. 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, 3647–3658. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-8583-8>

Roque Bravo R, Faria AC, Brito-da-Costa AM, Carmo H, Mladěnka P, Dias da Silva D, Remião F. 2022 Cocaine: an updated overview on chemistry, detection, bio-kinetics, and pharmacotoxicological aspects including abuse pattern. *Toxins (Basel)*. 114(4): 278. <https://doi.org/10.3390/toxins14040278>

[SAMHSA] Substance Abuse and Mental Health Servi-

ces Administration. Department of Health and Human Services. 2023. Mandatory guidelines for federal workplace drug testing programs, oral fluid. Fed Regist. 42 CFR Chapter I.

Scheidweiler KB, Spargo EA, Kelly TL, Cone EJ, Barnes AJ, Huestis MA. 2010. Pharmacokinetics of cocaine and metabolites in human oral fluid and correlation with plasma concentrations after controlled administration. *Therapeutic Drug Monitoring*32(5): 628–37. <https://doi.org/10.1097/ftd.0b013e3181f2b729>

[SWGTOX] Scientific Working Group for Forensic Toxicology. 2019. Standard practices for method validation in forensic toxicology. ANSI/ASB Standard 036, First Edition.

[UCT] United Chemical Technologies. 2023. Solid phase extraction applications manual. Bristol, PA.

[UNODC] United Nations Office on Drugs and Crime. 2009. Guidance for the validation of analytical methodology and calibration of equipment used for testing of illicit drugs in seized materials and biological specimens, United Nations publication. Sales no. E.09.XI.16.

[UNODC] United Nations Office on Drugs and Crime. 2014. Guidelines for testing drugs under international control in hair, sweat and oral fluid. United Nations publication. ST/NAR/30/Rev.3.

[UNODC] United Nations Office on Drugs and Crime. 2023. Informe Mundial sobre Drogas 2023. Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito.

Verstraete AG. 2004. Detection times of drugs of abuse in blood, urine, and oral fluid. *Therapeutic Drug Monitoring*. 26(2)200-5. <https://doi.org/10.1097/00007691-200404000-00020>

Wille SM, Baumgartner MR, Fazio VD, Samyn N, Kraemer T. 2014. Trends in drug testing in oral fluid and hair as alternative matrices. *Bioanalysis*. 6(17): 2193-209. <https://doi.org/10.4155/bio.14.194>

[WADA] Word Anti-Doping Agency. 2023. Minimum criteria for chromatographic-mass spectrometric confirmation of the identity of analytes for doping control purposes.

Xu YQ, Crumb WJ Jr, Clarkson CW. 1994. Cocaethylene, a metabolite of cocaine and ethanol, is a potent blocker of cardiac sodium channels. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 271(1): 319-25.