



TESIS DOCTORAL

**EL PELO COMO MATRIZ BIOLÓGICA ALTERNATIVA Y
SU USO EN LA DETERMINACIÓN DE LA EXPOSICIÓN
INTRAÚTERO A DROGAS ILÍCITAS Y FÁRMACOS**

Elena Lendoiro Belío

DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA Y CIENCIAS
FORENSES

FACULTADE DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2015





UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
Facultad de Medicina y Odontología
Departamento de Anatomía Patológica y Ciencias
Forenses

EL PELO COMO MATRIZ BIOLÓGICA ALTERNATIVA Y SU USO EN LA DETERMINACIÓN DE LA EXPOSICIÓN INTRAÚTERO A DROGAS ILÍCITAS Y FÁRMACOS

Elena Lendoiro Belío

Memoria para optar al grado de Doctora con Mención Internacional por la
Universidad de Santiago de Compostela

Santiago de Compostela, Noviembre 2015



UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
Facultad de Medicina y Odontología
Departamento de Anatomía Patológica y Ciencias
Forenses

Dña. ANA DE CASTRO RÍOS, Dña. MARTA CONCEIRO GUISÁN, y D. ÓSCAR QUINTELA JORGE, Doctores en Farmacia,

Como directores de la Tesis Doctoral titulada “El pelo como matriz biológica alternativa y su uso en la determinación de la exposición intraútero a drogas ilícitas y fármacos”, presentada por la Licenciada Dña. Elena Lendoiro Belío, alumna del Programa de Doctorado Ciencias Forenses y Patología, para optar al grado de Doctora con Mención Internacional, AUTORIZAN la presentación de la Tesis indicada, considerando que reúne los requisitos exigidos en el artículo 34 del reglamento de Estudios de Doctorado y que como directores de la misma no incurren en las causas de abstención establecidas en la Ley 30/1992.

Santiago de Compostela, a 9 de noviembre de 2015.

Fdo. Ana de Castro Ríos

Fdo. Marta Concheiro Guisán

Fdo. Óscar Quintela Jorge



UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
Facultad de Medicina y Odontología
Departamento de Anatomía Patológica y Ciencias
Forenses

Dña. ANA DE CASTRO RÍOS, Dña. MARTA CONCHEIRO GUISÁN y D. ÓSCAR QUINTELA JORGE, como directores de la Tesis Doctoral titulada “El pelo como matriz biológica alternativa y su uso en la determinación de la exposición intraútero a drogas ilícitas y fármacos”, por la presente

DECLARAN,

Que la Tesis presentada por Dña. Elena Lendoiro Belío es idónea para ser presentada, de acuerdo con el artículo 41 del Reglamento de Estudios de Doctorado de la Universidad de Santiago de Compostela, por la modalidad de compendio de ARTÍCULOS, en los que el investigador en formación tuvo participación en el peso de la investigación y su contribución fue decisiva para llevar a cabo este trabajo.

Y que está en conocimiento de los coautores, tanto doctores como no doctores, participantes en los artículos, que ninguno de los trabajos reunidos en esta Tesis serán presentados por ninguno de ellos en otra Tesis Doctoral, lo que firmamos bajo nuestra responsabilidad.

Santiago de Compostela, a 9 de noviembre de 2015.

Fdo. Ana de Castro Ríos

Fdo. Marta Concheiro Guisán

Fdo. Óscar Quintela Jorge



UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
Facultad de Medicina y Odontología
Departamento de Anatomía Patológica y Ciencias
Forenses

Dña. ANGELINES CRUZ LANDEIRA, Catedrática de Toxicología de la Universidad de Santiago de Compostela,

Como tutora de la Tesis Doctoral titulada “El pelo como matriz biológica alternativa y su uso en la determinación de la exposición intraútero a drogas ilícitas y fármacos”, presentada por la Licenciada Dña. Elena Lendoiro Belío para optar al grado de Doctora con Mención Internacional, CERTIFICA que la Tesis ha sido realizada en el Departamento de Anatomía Patológica y Ciencias Forenses y AUTORIZA la presentación de la Tesis indicada, considerando que reúne los requisitos exigidos en el artículo 34 del reglamento de Estudios de Doctorado. Además DECLARA que la presente Tesis es idónea para ser presentada, de acuerdo con el artículo 41 del Reglamento de Estudios de Doctorado de la Universidad de Santiago de Compostela, por la modalidad de compendio de ARTÍCULOS.

Santiago de Compostela, a 9 de noviembre de 2015.

Fdo. Angelines Cruz Landeira

AGRADECIMIENTOS

Muchas gracias a toda la gente que me ha apoyado en estos años, ha sido un largo camino, pero lleno de grandes momentos y personas.

En primer lugar tengo que agradecer el tiempo y la dedicación de cada uno de mis tres directores: Óscar Quintela Jorge, Marta Concheiro Guisán y Ana de Castro Ríos. Me habéis guiado por este camino y transmitido la pasión por la Toxicología. Gracias por ello, pero sobre todo tengo que daros las gracias por ser mis amigos.

Gracias también a mi tutora la profesora Angelines Cruz Landeira, que siempre me ha ayudado de forma generosa y con cariño. Sin ti esta Tesis no sería lo que es.

Indudablemente, también tengo que agradecer al profesor Manuel López-Rivadulla, “el jefe”, por su apoyo y confianza en mí.

Thanks to Marilyn Huestis and all the people from the National Institute on Drug Abuse (NIDA) for giving me the opportunity to work and learn with them, and for their warm welcome during my stage in the USA.

Mi agradecimiento también a la Xunta de Galicia, por otorgarme una beca predoctoral que financió tres años de mi Tesis Doctoral, y al Plan Nacional sobre Drogas por darme la posibilidad de realizar una estancia predoctoral en el NIDA, Estados Unidos.

A todos mis compañeros de laboratorio, los que siguen y los que ya no están, estos años no serían lo mismo sin nuestros momentos de café y esas “discusiones” constructivas. Gracias por ello y por toda vuestra ayuda.

A mis amigas de Betanzos (aunque ninguna seamos de Betanzos) y las que he conocido en estos años en Santiago, “*gracias por estar ao meu carón*”. ¡Mi vida sería mucho más aburrida sin vosotras!

Y por supuesto, gracias a mi familia, por su apoyo incondicional. Aunque suena a tópico nadie podría desear una familia mejor. Sabemos que tenemos una

familia que ¡¡¡es la BOMBA!!!, estaremos un poco locos, pero os quiero familia, no os cambio por nada.

Muchas gracias también a mi “pequeña familia”, mi hermano y mis padres. Siempre os he tenido cerca, dándome ese cariño y amor incondicional que sólo unos padres (y un hermano pequeño más alto que yo) pueden dar. Esta Tesis también es vuestra.

Y por último, pero no menos importante, a Miguel por sus correcciones, sus sinónimos y todas sus ayudas. Gracias por estar a mi lado y por tu amor.

Gracias a todos.

A mis padres

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	15
RESUMEN.....	19
SUMMARY.....	23
1. INTRODUCCIÓN.....	25
1.1. Aspectos generales.....	27
1.1.1. Epidemiología del consumo de drogas.....	27
1.1.2. Matrices biológicas clásicas y alternativas en Toxicología.....	34
1.2. El pelo como matriz biológica.....	41
1.2.1. Formación y estructura.....	41
1.2.2. Incorporación de las drogas y fármacos al pelo.....	45
1.2.3. Protocolos generales de análisis.....	52
1.2.3.1. Recogida de la muestra y almacenamiento.....	53
1.2.3.2. Segmentación del mechón.....	55
1.2.3.3. Eliminación de la contaminación externa.....	57
1.2.3.4. Extracción de los analitos de la matriz.....	62
1.2.3.5. Procesos de purificación.....	66
1.2.3.6. Análisis instrumental.....	68
1.3. Aplicaciones del análisis de pelo en el ámbito de la Toxicología Clínica y Forense.....	71
Bibliografía.....	79
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	99

3. PUBLICACIONES.....	105
3.1. Artículo 1: Target screening and confirmation of 35 licit and illicit drugs and metabolites in hair by LC-MSMS.....	107
3.2. Artículo 2: Hair analysis of amphetamine-type-stimulant (ATS) drugs, including synthetic cathinones and piperazines, by LC-MSMS.....	119
3.3. Artículo 3: Hair analysis interpretation of an unusual case of alleged scopolamine-facilitated sexual assault.....	145
3.4. Artículo 4: Maternal hair analysis for the detection of illicit drugs, medicines and alcohol exposure during pregnancy.....	153
4. DISCUSIÓN.....	167
4.1. Desarrollo de metodologías analíticas en pelo.....	169
4.2. Interpretación de los resultados en pelo.....	187
4.2.1. Efecto de la contaminación externa.....	187
4.2.2. Efecto de la variabilidad interindividual en el ratio de crecimiento del pelo.....	193
4.2.3. Efecto del color del pelo.....	194
4.2.4. Efecto de los tratamientos cosméticos.....	195
4.2.5. Correlación dosis/concentración en pelo.....	199
4.3. Aplicaciones de los análisis de pelo: Exposición a drogas intraútero.....	203
Bibliografía.....	225
5. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS.....	245

ABREVIATURAS

A

ACN: acetonitrilo

AEME: anhidroecgoninametiléster

B

BE: benzoilecgonina

C

CV: coeficiente de variación

D

DCM: diclorometano

E

EDADES: Encuesta Domiciliaria sobre Alcohol y Drogas en España

EMCDDA: *European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction*

ELISA: ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas

ESI: ionización por electrospray

ESTUDES: Encuesta Estatal sobre el uso de drogas en Enseñanzas
Secundarias

EtG: etilglucurónido

F

FAEEs: ésteres etílicos de los ácidos grasos

FPIA: inmunoensayo de polarización fluorescente

G

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

GC-MSMS: cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
en tándem

GHB: gammahidroxibutirato

GTFCh: *Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie*

M

mCPP: 1-(3-clorofenil)piperazina

MDA: metilendioxiánfetamina

MDEA: metilendioxiétilanfetamina

MDMA: metilendioxi metanfetamina

MDPV: 3,4-metilendioxi pirovalerona

MeOH: metanol

MIP: impresión molecular polimérica

MRM: monitorización por reacción múltiple

N

NPS: nuevas drogas sintéticas

L

LC-MSMS: cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem

LLE: extracción líquido-líquido

LOD: límite de detección

LOQ: límite de cuantificación

LSD: dietilamida de ácido lisérgico

O

OED: Observatorio Español sobre Drogas

Q

QC: control de calidad

R

RIA: radioinmunoensayo

S

SAMHSA: *Substance Abuse and Mental Health Services Administration*

SFTA: *Société Française de Toxicologie Analytique*

SoHT: *Society of Hair Testing*

SPE: extracción en fase sólida

SPME: microextracción en fase sólida

T

TFMPP: 3-trifluorometilfenilpiperazina

THC: Δ^9 -tetrahidrocannabinol

THCCOOH: carboxi- Δ^9 -tetrahidrocannabinol

U

UNODC: Oficina de Naciones Unidas sobre Drogas y Crimen

6

6-AM: 6-monoacetilmorfina

7

7-AF: 7-aminoflunitrazepam

RESUMEN

RESUMEN

El uso de matrices biológicas alternativas en el ámbito de la Toxicología Clínica y Forense se ha incrementado de forma significativa en los últimos años. Estas matrices complementan la información obtenida con el análisis de las matrices biológicas tradicionales (sangre y orina), y presentan una toma de muestra menos invasiva y más sencilla. El pelo es una matriz biológica alternativa muy útil debido a su amplia ventana de detección, de meses o incluso años, lo que permite realizar el estudio retrospectivo del consumo y establecer el perfil cronológico del mismo. Sin embargo, se requieren métodos analíticos suficientemente sensibles para su análisis toxicológico, ya que las concentraciones encontradas en esta matriz biológica suelen ser bajas (del orden de pg/mg). Por ello, uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral ha sido el desarrollo y validación de métodos multianalito que permitan la determinación simultánea de varios grupos de sustancias en pelo. Se ha desarrollado y validado un método de *screening* que permite la determinación simultánea de las principales drogas de abuso (opioides, cocaína y su principal metabolito, cannabis, anfetaminas, dietilamida de ácido lisérgico (LSD) y ketamina) y fármacos de uso común (benzodiazepinas, antidepresivos e hipnóticos) mediante la técnica de cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MSMS). Cabe destacar la inclusión del Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC) en esta metodología, empleando el mismo procedimiento de extracción y la misma técnica analítica que los utilizados para la determinación del resto de sustancias. También se ha desarrollado y validado un método analítico para la determinación simultánea de anfetaminas clásicas y drogas emergentes con efectos estimulantes mediante LC-MSMS, incluyendo además dos fármacos que producen como metabolito la piperazina sintética 1-(3-clorofenil)piperazina (mCPP), por lo que es posible distinguir entre el uso clínico e ilícito de esta sustancia. En ambos métodos se han obtenido límites de cuantificación (LOQ) al menos iguales a los recomendados por la *Society of Hair Testing* (SoHT).

Otro de los objetivos de esta Tesis Doctoral fue la evaluación de diferentes factores que pueden influir en la interpretación de los resultados analíticos en pelo. Entre estos factores, se ha estudiado especialmente el efecto de la

contaminación externa y de los tratamientos cosméticos en diferentes casos reales.

Por último, se ha evaluado la utilidad del pelo como matriz biológica para el estudio de la exposición fetal a drogas de abuso y fármacos. El análisis del pelo materno presentó mayor sensibilidad para la detección de la exposición intraútero que la entrevista materna (a excepción del alcohol), ya que esta matriz permite la identificación objetiva del consumo por parte de la madre. Asimismo, el cabello materno permitió identificar un mayor número de casos positivos en comparación con otras matrices biológicas (meconio, placenta y cordón umbilical), debido a su amplia ventana de detección que permite estudiar la exposición durante todo el embarazo.

SUMMARY

The use of alternative biological matrices in the field of the Clinical and Forensic Toxicology has significantly increased in the last years. These matrices complement the information obtained with the analysis of the traditional ones (urine and blood), and their sample collection is easier and less invasive. Hair is a very useful alternative biological matrix due to its long window of detection, months or even years, which allows performing retrospective study of drug consumption and its chronological profile. However, sensitive analytical methodologies are required for its toxicological analysis, due to the low concentrations found in this matrix (around pg/mg). Thus, one of the aims of this Doctoral Thesis was the development and validation of multianalyte methods that allow the simultaneous determination of several groups of substances in hair. A screening method was developed and validated for the main drugs of abuse (opioids, cocaine and its main metabolite, cannabis, amphetamines, LSD and ketamine) and commonly used medicines (benzodiazepines, antidepressants and hypnotics) by LC-MSMS. It should be pointed out the inclusion of THC in this methodology, using the same extraction procedure and detection technique as those used for the determination of the rest of substances. Also an analytical method was developed and validated for the determination of classical amphetamines and stimulant new psychoactive substances (synthetic cathinones and piperazines) by LC-MSMS. Two medicines, which produce mCPP (piperazine) were also included in this methodology, to distinguish between the clinical and illicit use of mCPP. LOQ values obtained in both methods were at least equal to those recommended by SoHT.

Another aim of this Doctoral Thesis was the evaluation of different factors that may influence interpretation of hair analytical results. Among these factors, the effect of external contamination and cosmetic treatments were particularly studied in different real cases.

Finally, the usefulness of hair as a biological matrix for the study of *in utero* drug exposure to drugs of abuse and medicines was evaluated. Hair analysis showed a better sensitivity for the detection of *in utero* exposure than the

maternal interview (except for alcohol), as this matrix allows an objective identification of maternal consumption. Also, maternal hair identified more positive cases in comparison with other biological matrices (meconium, placenta and umbilical cord), due to its long window of detection that allows studying the exposure throughout the pregnancy.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ASPECTOS GENERALES

1.1.1. Epidemiología del consumo de drogas

El consumo de drogas ha estado presente a lo largo de la historia de la humanidad, y continua siendo un grave problema. A nivel mundial, la UNODC (*United Nation Office on Drugs and Crime*) determinó en su “Informe mundial sobre las drogas” de 2014 [1] que el uso de drogas ilícitas parece haberse estabilizado en los últimos años en los países desarrollados, aunque continúa en aumento en varios países en desarrollo. Se estima que unos 243 millones de personas del total de la población mundial adulta (entre 15 y 64 años) han consumido drogas ilegales al menos una vez en el último año, es decir, un 5,2% del total de la población mundial en esa franja de edad. De todas ellas, se ha observado un aumento de prevalencia en el consumo de cannabis (2,7-4,9% de la población mundial) y opioides (0,6-0,8%) desde el año 2009, mientras el resto de sustancias permanecen con una prevalencia estable o en ligero descenso (0,3-1,2% para los estimulantes tipo anfetamina, 0,28-0,43% para los opioides y 0,30-0,45% para la cocaína).

En ese mismo informe se estima, además, que entre un 10% a un 15% de los consumidores adultos de drogas ilícitas a nivel mundial (0,34-0,83% de la población adulta mundial) se podrían clasificar como consumidores problemáticos. Los consumidores problemáticos son usuarios frecuentes y dependientes, que han sufrido las consecuencias sociales y de salud derivadas del consumo de drogas, que tienden a ser consumidores crónicos, y presentan mayor morbilidad y mortalidad. Además se encuentran estigmatizados y marginados socialmente en mayor medida que el resto de los consumidores. Los opioides son el grupo drogas ilegales que más consumidores problemáticos generan a nivel mundial, pese a no ser el grupo más empleado.

A nivel europeo, la prevalencia de consumo de las distintas drogas de abuso varía en relación a las observadas a nivel mundial. En el Informe Anual de 2015 de la EMCDDA (*European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction*) [2], destaca el cannabis como la droga ilegal que presentó mayor prevalencia de consumo durante el último año en la población adulta (5,7%), seguido de la cocaína (1,0%), el éxtasis (0,6%) y las anfetaminas (0,5%). Sin embargo, y al

igual que a nivel mundial, la droga asociada a un mayor número de consumidores problemáticos fueron los derivados opioides (0,4% de consumidores problemáticos).

En España, la prevalencia de consumo en la población adulta en el último año sigue un patrón similar al observado a nivel europeo, siendo el cannabis la droga con mayor prevalencia (9,2%), seguida de cocaína (2,2%), éxtasis (0,7%), anfetaminas (0,6%) y opioides (0,1%) [3]. Sin embargo, la prevalencia de consumo de cannabis y cocaína en España es significativamente superior a la encontrada a nivel europeo. La prevalencia en la población adulta durante el último año en España es la mayor de toda Europa para el consumo de cocaína, y figura como el segundo país europeo con mayor prevalencia de consumo de cannabis, por detrás de Italia [2]. A pesar de ello, se observa una estabilización, e incluso un descenso, tanto del consumo de cocaína como de cannabis, así como de sus problemas asociados, tras muchos años de aumento continuado en relación a los valores de prevalencia obtenidos en encuestas realizadas con anterioridad [3].

En el último informe del OED (Observatorio Español sobre Drogas) disponible del año 2013 [3] se exponen los resultados bianuales de varias encuestas (Encuesta Domiciliaria sobre Alcohol y Drogas en España (EDADES), Encuesta Estatal Sobre el Uso de Drogas en Enseñanzas Secundarias (ESTUDES) y Encuestas Estatales a Personas Admitidas a Tratamiento por Heroína o Cocaína) e indicadores sobre el uso de drogas en España (registro del número de tratamientos, urgencias y mortalidad, datos sobre las infecciones por VIH y las conductas de riesgo en consumidores de drogas, e indicadores sobre control y la oferta de drogas). En los resultados de este informe destaca el ligero aumento del consumo de las sustancias legales (tabaco, alcohol e hipnosedantes) y la disminución de las ilegales. Entre las drogas ilegales, el cannabis continúa siendo la droga más consumida en España, aunque con una tendencia descendente o de cierta estabilización, con valores de prevalencia de consumo diario del 1,9%. La prevalencia de consumo alguna vez en la vida también muestra una estabilización con valores del 29,0% en 2003 y del 30,4% en 2013. Además, a partir de 2002 se ha observado un aumento en la percepción del riesgo ante el consumo de esta droga, tanto entre los

estudiantes de 14 a 18 años, como en la población adulta, y ha disminuido la percepción de la disponibilidad del cannabis, sobre todo entre los estudiantes. La prevalencia de consumo sigue siendo mayor entre los hombres, con una mayor proporción que las mujeres en todos los grupos de edad, aunque estas diferencias relativas se reducen en los últimos años entre los jóvenes. El cannabis causa un 2,2% de consumo problemático entre los consumidores adultos y un 3,9% entre los jóvenes (15-18 años).

La cocaína como la droga ilegal que genera un mayor número de problemas en España. Si bien cabe resaltar que hasta 2004-2005 todos los indicadores mostraban de forma consistente un aumento en su consumo, en los últimos años han aparecido algunas evidencias que podrían indicar una disminución en la prevalencia anual de consumo entre la población de 15-64 años (2,7% en 2003 a 2,1% en 2013). La prevalencia de consumo continúa siendo unas 3,5 veces mayor entre los hombres comparado con las mujeres. No obstante, en este informe se destaca un cambio en la forma de consumo, con un incremento muy acusado a partir del 2007 del consumo de la cocaína fumada (conocida como cocaína-base o base), tradicionalmente relacionada con los usuarios de heroína, en sustitución de la cocaína en polvo.

La tendencia que sigue la heroína muestra una estabilización en los últimos años, tanto en la prevalencia como en los problemas relacionados con la misma y el número de consumidores problemáticos. Si bien a partir del año 2003 se observó un ligero repunte en la prevalencia (0,9% de consumidores alguna vez en la vida), los valores han vuelto a estabilizarse en los últimos años entorno al 0,6% de consumidores alguna vez en la vida. Además, la proporción de urgencias hospitalarias relacionadas directamente con el uso de drogas ilegales en las que se menciona la heroína se estabilizó entorno a un 21% y la prevalencia de consumo en los últimos 12 meses en la población entre 15 y 64 años ha permanecido estable en el 0,1% desde 1999. Por otra parte, continúa descendiendo el uso de la vía inyectada como principal vía de consumo de esta droga, siendo sustituida por la vía pulmonar, de modo que el porcentaje de tratados por primera vez en la vida por consumo de heroína por vía intravenosa como vía principal ha descendido de un 50,3% en 1991 a un 12,8% en 2007. Este descenso ha repercutido en una gran disminución en el

número de nuevos diagnósticos de VIH entre los consumidores de drogas inyectables. A pesar de estos datos, una proporción muy alta de los usuarios de drogas por vía intravenosa están infectados por VIH (20-30%), por el virus de la hepatitis B (20-35%), o por el virus de la hepatitis C (65-90%) [4].

Los estimulantes tipo anfetamina incluyen a varias sustancias relacionadas estructuralmente que presentan efectos estimulantes sobre el sistema nervioso central (anfetamina, metanfetamina, 3,4-metilendioxfanfetamina, 3,4-metilendioximetanfetamina, N-metildietanolamina, etc). Estas sustancias muestran una prevalencia de consumo, tanto en la población adulta como entre los estudiantes, que desciende lentamente desde 2000-2001. Además, son consumidas de forma bastante esporádica, por lo que los problemas originados por su consumo son escasos, y tanto el número de urgencias hospitalarias como el de muertes se han mantenido estables desde 2000. De hecho, la prevalencia de consumo en la población adulta en los últimos 30 días se encuentra en un 0,3% (en 2011).

Dentro del grupo de los denominados alucinógenos se incluyen una serie de sustancias con propiedades propiamente alucinógenas, como el LSD (dietilamida de ácido lisérgico), y otras sustancias con propiedades disociativas, como la ketamina. La prevalencia de consumo de estas sustancias es muy baja (2,9% de la población entre 15-64 años los había probado alguna vez en la vida, pero sólo el 0,2% los habían consumido en el último mes según el informe del OED de 2013) y parece estabilizada o en descenso. La prevalencia anual de consumo se mantiene estable para la población adulta desde 1999, en torno a un 0,6%.

Destaca también el consumo de las drogas legales (tabaco, alcohol y medicamentos hipnosedantes), debido a que son fácilmente accesibles. El tabaco ha mantenido una prevalencia estable hasta el 2003, año en que estos valores comenzaron a descender. Un 47,8% de la población adulta había fumado en los últimos 12 meses según los resultados obtenidos en la encuesta de 2003, mientras que en 2013 este valor fue del 40,7%. Este descenso también se observa en la prevalencia de consumo en la población adulta en los últimos 30 días (42,9% en 2003 a 38,3% en 2013), y en el consumo diario

(36,7% en 2003 a 30,8% en 2013) [3]. La edad media de inicio del consumo se encuentra entorno a los 16,5 años, y la edad media de inicio en el consumo diario está en los 18,6 años. En función del sexo, los datos de prevalencia continúan siendo más altos para los hombres que para las mujeres en la población adulta, sin embargo, en los jóvenes de 15-24 años las diferencias intersexuales se reducen mucho (28,7% en hombres y 24,8% en mujeres). Si bien, los hombres fuman más cigarrillos de media que las mujeres, 14,6 y 12,3, respectivamente.

El alcohol es la sustancia que ha consumido alguna vez en la vida un mayor porcentaje de la población entre 15 y 64 años, ya que se estima que un 90,9% lo han probado alguna vez, un 76,6% lo han consumido en el último año, y un 62,3% en el último mes. La edad de inicio de su consumo es muy similar a la observada para el tabaco, ya que los jóvenes inician el consumo a los 16,7 años. Si bien todos los grupos de edad realizan fundamentalmente un consumo de fin de semana, esa diferencia en el consumo es especialmente relevante en el caso de los jóvenes de 15-34 años. La prevalencia del consumo diario en el último mes mostró estabilidad hasta el 2005 y, posteriormente, se observó un descenso en el consumo (14,9% en 2005 y 9,8% en 2013); sin embargo, se observó una diferencia significativa entre la prevalencia en los hombres (15,3%) y en las mujeres (5,0%). El porcentaje de intoxicaciones etílicas entre la población adulta en los últimos 12 meses fue del 19,3%, siendo mucho mayor entre los hombres de 15 a 34 años (41,3%). En relación al *binge drinking* o consumo de alcohol en “forma de atracón” (5 o más bebidas en hombres y 4 o más en mujeres en un intervalo de 2 horas), fue realizado por 15,5% de la población entre 15 a 64 años en el último mes, principalmente en fin de semana, obteniéndose la mayor prevalencia entre el grupo de adultos jóvenes de 15 a 29 años. Además, se estima que un 4,9% de la población de 15 a 64 años tiene un consumo problemático de alcohol y un 0,4% una posible dependencia [3].

Otras sustancias incluidas dentro de las drogas legales son los medicamentos hipnosedantes, tanto tranquilizantes como somníferos, siendo los más habituales los pertenecientes al grupo farmacológico de las benzodiazepinas. Un 22,2% de la población entre 15 y 64 años los han consumido alguna vez en

la vida, principalmente en forma de tranquilizantes, mientras que en 2005 este porcentaje era del 8,7% [3]. Pese al ascenso de su prevalencia en los últimos años, en la mayoría de los casos se adquieren bajo prescripción médica. La prevalencia anual de consumo observada en 2011 en la población adulta fue de un 11,4%, el doble de lo registrado en 2005; no obstante, sólo un 1,2% se trataba de consumo sin preinscripción médica. El consumo sin receta de estos medicamentos suele estar relacionado con los consumidores de cocaína y/o heroína, de tal forma que en una encuesta realizada en 2003-2004 se observó que un 25,6% de los admitidos a tratamiento por consumo de cocaína y un 47,0% de los admitidos a tratamiento por consumo de heroína, o heroína y cocaína, habían consumido algún hipnosedante en el mes previo a su ingreso [4]. Estas sustancias son mayoritariamente consumidas por mujeres, duplicando el porcentaje de hombres que las consumen (16,0% y 8,5%, respectivamente en el último año) y siendo el único grupo de drogas en el que la prevalencia de consumo es mayor en las mujeres que en los hombres. La mayor prevalencia de consumo en el último año se observa entre las mujeres entre 35 y 64 años (19,8%) [5].

Por último, cabe destacar que el informe EDADES [5] publicado con los datos recogidos entre los años 2011-2012, se incluye por primera vez preguntas relacionadas con las nuevas drogas emergentes, cuya expansión se encuentra fuertemente relacionada con su comercio por Internet. La venta de estos productos se realiza mayoritariamente a través de tiendas online, aunque también es posible encontrarlos en ciertos establecimientos denominados *smart shops* (tiendas dedicadas a la venta de parafernalia relacionada con las drogas). Dentro de las drogas emergentes se incluyen múltiples sustancias con gran diversidad química y estructural, que han aparecido en el mercado en los últimos años como sustitutos “legales” a los compuestos psicoactivos tradicionales controlados por las autoridades, como el cannabis, las anfetaminas, la cocaína, el LSD o los opiáceos [6]. Estas sustancias pueden presentarse al consumidor en forma de polvo o sobre preparados herbales que también pueden presentar alguna actividad psicoactiva. Destacan entre los más conocidos los cannabinoides sintéticos, las catinonas sintéticas y las piperazinas sintéticas. Los cannabinoides sintéticos son moléculas inicialmente

diseñadas como potenciales medicamentos por su actuación en los receptores CB1 y CB2, sobre los que ejerce su efecto el THC (Δ^9 -tetrahidrocannabinol), principal componente activo del cannabis. Estos compuestos se venden como inciensos o ambientadores, que contienen productos “naturales” y “no ilegales”, pero con efectos psicotrópicos similares a los producidos por el cannabis. Las catinonas sintéticas son derivados de la catinona, sustancia presente de forma natural en la planta *Catha edulis*, y con actividad estimulante tipo anfetamina. Estos compuestos suelen venderse en forma de “sales de baño”, y en el envase se suele indicar que no son aptas para el consumo humano. También se han detectado preparados con compuestos análogos a la psilocina y a las piperazinas con efectos alucinógenos [7]. La aparición de estos productos en Europa data de finales del año 2008, cuando se detectó la venta de preparaciones herbales con efectos psicoactivos denominadas *Spice* en varias páginas de Internet, pero no fue hasta el año 2009 cuando el equipo de Auwärter et al. [8] determinaron que los efectos psicoactivos de estas mezclas herbales eran atribuibles a los cannabinoides sintéticos. A partir de entonces el EMCDDA comenzó a realizar el control y monitorización de la venta y consumo de estas nuevas sustancias [9].

En la última encuesta EDADES [3] se pregunta por el consumo de 11 tipos diferentes de estas nuevas sustancias entre la población adulta alguna vez en la vida. Se incluyen: setas mágicas, ketamina, GHB (gammahidroxibutirato), salvia, *Spice*, *Nexus*, mefedrona, piperazinas, *legal highs*, *research chemicals* y esteroides anabolizantes. La prevalencia de consumo varía entre un 1,9% para las setas mágicas y un 0,0% para los *legal highs* y las piperazinas, alguna vez en la vida. En conjunto, la prevalencia de estas sustancias es de un 3,0%, pero cabe destacar que un 74,1% de los encuestados nunca habían oído hablar de ellas. El 69,2% de los consumidores de estas nuevas sustancias son consumidores también de otras drogas ilegales. Además, un 78% realiza un policonsumo experimental de las nuevas drogas, habiendo probado 5 o más de estas sustancias [3].

El policonsumo es un factor importante que debe tenerse en cuenta al estudiar la prevalencia de las diferentes drogas, ya que en estos casos una misma persona consume varias sustancias psicoactivas, tanto legales como ilegales,

1.1. Aspectos generales

de manera simultánea durante el mismo periodo de tiempo. El alcohol y el cannabis son las sustancias que se consumen en mayor medida en forma de policonsumo. El alcohol está presente en el 90% de los policonsumos, y se asocia con una mayor prevalencia de consumo de otras drogas cuando se realiza en forma de *binge drinking*, mientras que el cannabis está presente en el 90% de los policonsumos de sustancias ilegales [3]. En la Tabla 1 se reflejan los porcentajes de consumo de otras drogas en consumidores habituales de cannabis, cocaína, éxtasis o heroína entre las personas de 15 a 64 años.

TABLA 1. Porcentaje de policonsumo en consumidores de cannabis, cocaína, éxtasis y heroína en los últimos 12 meses en la población de 15 a 64 años (2011, España) [5].

	Consumidores de cannabis	Consumidores de cocaína	Consumidores de éxtasis	Consumidores de heroína
Alcohol	94,4	98,2	97,2	94,5
Tabaco	84,0	87,8	87,7	100,0
Hipnosedantes	13,6	19,3	18,2	73,8
Cannabis	100,0	81,5	84,7	90,3
Cocaína	19,2	100,0	65,0	56,7
Éxtasis	6,0	19,6	100,0	24,7
Anfetaminas	5,0	18,0	51,4	37,1
Heroína	0,9	2,4	3,5	100,0
Alucinógenos	3,7	9,9	29,7	24,7

1.1.2. Matrices biológicas clásicas y alternativas en Toxicología

Debido a que cada matriz biológica proporciona una información diferente, es necesario seleccionar correctamente la matriz a analizar en función del propósito para el que se realiza dicho análisis [10]. Tradicionalmente, matrices biológicas como la sangre y la orina se han empleado en la realización de los análisis de rutina debido a su disponibilidad y

características. A estas dos matrices biológicas se las conoce por ello como matrices biológicas clásicas.

La sangre (y por similitud el plasma y el suero) permite establecer una correlación entre la concentración hallada para una sustancia con los efectos o síntomas producidos sobre el individuo en el momento de la toma de la muestra. No obstante, la vida media de la mayoría de las sustancias en sangre es inferior a las 24 horas, lo que limita su utilidad cuando la toma de muestra se efectúa con retraso o se requiere conocer un consumo pasado. Además, la toma de muestra es invasiva y por ello requiere personal especializado para su recolección, cuando se realiza fuera del ámbito hospitalario. Numerosos métodos analíticos emplean sangre o alguno de sus derivados (plasma o suero) para la determinación de las principales drogas de abuso [11-15], fármacos o alcohol [16-18].

La orina es producida continuamente por el riñón como un ultrafiltrado de la sangre, y mediante su producción son eliminados el exceso de agua y productos de desecho producidos por el cuerpo. La composición y cantidad diaria producida varían considerablemente en función de la cantidad de líquidos ingeridos, la dieta, el estado de salud, el uso de ciertos medicamentos y las condiciones ambientales. La orina es la muestra más utilizada para el cribado o *screening* en los análisis toxicológicos, en preferencia a la sangre debido a sus características: las concentraciones de los compuestos diana y sus productos de biotransformación (metabolitos) son mayores; el volumen de muestra disponible suele ser mayor; la toma de muestra no resulta cruenta; y su ventana de detección es superior (días en lugar de horas). Además, existen numerosos sistemas de automatización disponibles en el mercado para la realización de inmunoensayos que permiten la detección cualitativa de las principales familias de las drogas de abuso, utilizando esta matriz biológica, de manera rápida y con poca manipulación de la muestra. Sin embargo, las concentraciones encontradas en orina no pueden correlacionarse con el efecto producido sobre el individuo, permitiendo simplemente identificar la exposición a la/s sustancia/s. Hay que tener en cuenta que su adulteración es sencilla y, por ello, la toma de muestra debe ser realizada bajo supervisión, lo que conlleva una invasión de la intimidad del individuo [19-21]. Por todo lo anterior,

habitualmente los análisis de *screening* cualitativos se realizan en las muestras de orina y los cuantitativos de confirmación en sangre.

En las últimas décadas otras matrices, denominadas matrices biológicas alternativas, han aportado una nueva herramienta para la interpretación de los resultados toxicológicos. En general, estas matrices alternativas presentan como ventaja sobre las matrices clásicas una toma de muestra menos invasiva y más sencilla, aportando además información no suministrada por las matrices clásicas, debido a sus diferentes ventanas de detección. Como desventaja se debe destacar las bajas concentraciones que suelen presentar en ellas los compuestos y sus metabolitos, por lo que requieren el empleo de equipos analíticos con una alta sensibilidad para su análisis. Las principales matrices alternativas son el pelo, el fluido oral, el sudor y el meconio; pero también pueden incluirse en este grupo matrices menos utilizadas como los dientes, las uñas, la placenta, el cordón umbilical, la vernix caseosa, etc [22].

El pelo fue la primera matriz alternativa en ser empleada en el campo de la Toxicología, siendo Baumgartner el primero en utilizarla en 1979 [23] para la determinación del abuso de opiáceos a través del análisis de pelo de ratones a tratamiento con morfina y de personas con consumo habitual de heroína. Desde entonces el número de métodos analíticos desarrollados y sus aplicaciones en Toxicología se ha extendido, hasta convertir a este espécimen en la matriz alternativa más utilizada. La principal aportación que supone la utilización del pelo en el campo de la Toxicología, frente a las matrices tradicionales, es su amplia ventana de detección, ya que las drogas, una vez incorporadas al pelo, no son eliminadas por el lavado del cabello y, por tanto, permanecen en el interior del mismo meses o incluso años. Consecuentemente, la ventana de detección de esta matriz biológica sólo se ve limitada por la longitud del mechón de pelo a analizar. Esta característica otorga la posibilidad de realizar estudios del patrón cronológico de consumo, al analizar diferentes segmentos del pelo del mismo individuo. Además, la toma de muestra es sencilla, ya que no requiere personal médico para su realización, y es no invasiva, pudiendo ser fácilmente supervisada para evitar la manipulación o adulteración de la muestra. Siempre que fuese necesario recoger una segunda muestra de características similares a la inicial, ésta

puede ser obtenida del mismo sujeto sin ningún problema. Sin embargo, en aquellos casos en los que la muestra de cabello no estuviera disponible para su recolección, debido por ejemplo a la calvicie, es posible el empleo de otro tipo de pelo corporal, como el púbico, de axilas, brazos, piernas y barba. Por último, otra ventaja del uso del pelo como matriz biológica es que tanto su almacenaje y como su transporte se realiza de una forma sencilla, sin necesidad de ninguna medida de conservación especial.

A nivel analítico, cabe destacar que los niveles de las drogas y sus metabolitos en el pelo pueden ser muy bajos (del orden de los pg/mg), por lo que es necesario el uso de métodos muy sensibles para su análisis. En general, las drogas sin metabolizar se detectan en mayor proporción que sus metabolitos. La interpretación de los resultados obtenidos es compleja, y la posibilidad de un falso positivo es elevada si no se realiza una adecuada descontaminación externa de la muestra.

El pelo, a diferencia de la orina, no permite la determinación de un consumo reciente; sin embargo, en la práctica, estas dos matrices son complementarias en relación a la información toxicológica que proporcionan [22,24,25]. La morfología, la incorporación de las drogas al pelo, los procedimientos para la eliminación de la contaminación externa, etc serán objeto de una descripción en mayor profundidad en secciones posteriores de esta Tesis Doctoral.

El fluido oral es una matriz biológica alternativa cuyo uso ha ido ganando relevancia en los últimos años, sobre todo por su empleo en el análisis de muestras de conductores para determinar la presencia de drogas o medicamentos. El fluido oral también puede ser utilizado en casos de determinación del consumo de drogas en el lugar de trabajo y en Toxicología Clínica para la monitorización de fármacos [26].

El término “fluido oral” engloba todo fluido producido en la cavidad oral, fundamentalmente compuesto por la mezcla de las secreciones de las tres glándulas salivares mayoritarias (submandibular, parótida y sublingual), así como las secreciones de otras glándulas menores, restos de la mucosa oral y otros fluidos presentes en la boca [22]. La mayoría de las drogas y fármacos pasan desde la sangre hacia el fluido oral por difusión pasiva y, por ello,

representan la fracción libre no ionizada del plasma; es decir, las sustancias que mayoritariamente se encuentran en fluido oral se corresponden con las moléculas más apolares, lo que generalmente equivale a una menor presencia de metabolitos polares [27]. Para algunas sustancias es posible establecer una correlación entre la concentración encontrada en el fluido oral, con la concentración de la fracción libre de esa sustancia en el plasma [28-32]. Sin embargo, la ingesta por vía oral, intranasal o fumada puede ocasionar una contaminación de la cavidad oral con las sustancias consumidas y producir concentraciones elevadas en el fluido oral, lo que alterará la correlación entre la concentración de dichas sustancias en el fluido oral y en el plasma, y sus efectos sobre el individuo. En esta matriz, a diferencia de la sangre, la toma de muestra es un proceso incruento y no invasivo, y además es posible realizarla bajo la observación directa del sujeto sin intromisión en su intimidad. La ventana de detección es comparable a la de la sangre, por lo que permite detectar un consumo reciente de las sustancias [33-35].

Para su análisis se requieren métodos analíticos con alta sensibilidad debido a que las concentraciones de las drogas y metabolitos suelen ser bajas, el volumen de muestra es limitado y en ciertas ocasiones es necesario reanalizar una misma muestra. Debe tenerse en cuenta también durante la toma de muestra que algunas drogas, medicamentos o situaciones patológicas pueden inhibir la secreción de fluido oral de los individuos y, por tanto, la cantidad del espécimen para la realización del análisis puede ser escaso [24].

Otra matriz alternativa empleada en el campo de la Toxicología es el sudor. El sudor es un líquido acuoso, claro e hipotónico, producido por dos tipos de glándulas, ecrinas y apocrinas, localizadas en la epidermis. La función primaria del sudor es la termorregulación corporal y, por tanto, la cantidad producida dependerá en gran medida de las condiciones medioambientales. Su componente principal en más de un 99% es agua, con una alta concentración de cloruro sódico. La fracción libre no ionizada de las drogas puede ser excretada en el sudor, principalmente por un mecanismo de difusión pasiva. Mediante el uso de parches semipermeables (que permiten el intercambio de oxígeno, dióxido de carbono y agua, pero retienen las drogas) es posible acumular el sudor producido por un individuo en un determinado periodo de

tiempo (generalmente entre 1-14 días), y estimar su consumo de drogas en esa franja temporal [22]. Por ello, la ventana de detección del sudor es mayor a la obtenida por el análisis de plasma u orina. Además, la toma de muestra es poco invasiva y no interfiere con la privacidad del individuo sujeto a dicho análisis. El parche permite una rápida aplicación y retirada, sin necesidad de personal médico, y sus características lo hacen difícilmente manipulable o adulterable. Sin embargo, debido a que no es posible determinar el volumen de sudor acumulado en el parche durante el periodo de recogida de muestra, los análisis solo permiten obtener resultados cualitativos. Los analitos suelen encontrarse en muy bajas concentraciones (del orden de ng/parche), por lo que las determinaciones analíticas deben realizarse con equipos de elevada sensibilidad [24,36]. Por todas estas características, el empleo del sudor como matriz biológica alternativa se reduce a la monitorización cualitativa del consumo de drogas durante un periodo de tiempo determinado, como por ejemplo en casos de monitorización de la abstinencia.

El meconio puede definirse como la primera materia fecal del neonato, y se ha convertido en la matriz de referencia para la detección de la exposición a drogas por parte del neonato durante el embarazo. El meconio está compuesto principalmente por agua, mucopolisacáridos, sales y ácidos biliares, células epiteliales y residuos de la ingestión del líquido amniótico por parte del feto [37]. Su formación comienza en torno a la semana 12 de gestación y se acumula en el intestino del feto hasta el nacimiento. Durante el tercer trimestre (semana 28-40) su formación aumenta, produciéndose el 75% del meconio en las últimas 8 semanas del embarazo [38]. Debido a esto, el meconio refleja principalmente la exposición durante el último trimestre del embarazo, siendo su ventana de detección mayor a la proporcionada por la orina, y algo mayor a la del pelo del neonato [39]. El meconio es excretado por el neonato varias veces al día en los primeros 5 días tras el parto, y la toma de muestra es sencilla y no invasiva. En algunas ocasiones, el feto excreta el meconio intraútero, haciendo imposible su recolección. Desde el punto de vista analítico es una matriz compleja con numerosas interferencias y, por ello, se requieren métodos analíticos muy sensibles para su determinación.

1.1. Aspectos generales

Las matrices biológicas alternativas son una herramienta muy útil en el campo de la Toxicología debido a que amplían y/o complementan la información aportada por las matrices clásicas al ampliar la ventana de detección y/o al permitir una toma de muestra no invasiva. En la Figura 1 se pueden observar las diferentes ventanas de detección de las matrices biológicas citadas anteriormente.

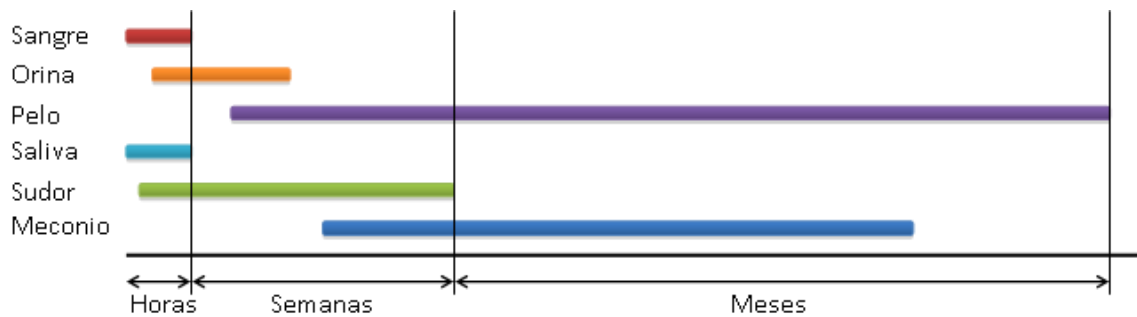


FIGURA 1. Comparación de la ventana de detección de las diferentes matrices biológicas.

1.2. EL PELO COMO MATRIZ BIOLÓGICA

1.2.1. Formación y estructura

El pelo es un anexo de la piel característico de los mamíferos, que está formado fundamentalmente por proteínas (65-95%, mayoritariamente queratina), agua (15-35%), lípidos (1-9%) y minerales (< 1%) [40]. Realiza numerosas funciones como son la termorregulación corporal, la protección frente a traumas externos y frente a la radiación electromagnética, la captación de información sensorial y la dispersión de los productos secretados por las glándulas anexas [41]. En función de su localización anatómica varía considerablemente en tamaño y forma, así como en color, textura y cantidad entre los diferentes individuos. A pesar de ello, su estructura básica es la misma [42].

El pelo es un tejido sólido muy complejo que se origina en los folículos pilosos. Estos folículos están anclados a unos 3-4 mm de la superficie de la epidermis, y se encuentran vascularizados por una densa red de capilares que los rodean [43]. La base de los folículos pilosos está formada por la papila dérmica, en donde proliferan las células germinativas (queratinocitos y melanocitos). Esta proliferación es una de las más rápidas que se producen en el cuerpo humano en comparación con otros tejidos. La elevada proliferación de las células germinativas en la papila dérmica obliga a la migración hacia la superficie del resto de las células formadas con anterioridad, que comienzan su diferenciación al ir ascendiendo, hasta la formación del pelo maduro. Esta diferenciación se caracteriza fundamentalmente por un proceso de queratinización, es decir, por la formación de puentes disulfuro y la deshidratación celular, para finalmente formar el tallo piloso que emerge al exterior [44].

El tallo piloso no es una fibra homogénea, sino que está compuesto por tres capas de células concéntricas que se denominan (desde el interior hacia el exterior) médula, corteza y cutícula (Figura 2). La médula es la capa central y la que proporciona el diámetro final al pelo en función de su tamaño. Puede llegar a no estar presente en aquellos cabellos de menor diámetro, mientras que en otros casos, como por ejemplo en la barba, forma la capa más compleja,

llegando a constituir una doble médula. Las células que forman la médula están queratinizadas y deshidratadas, pero pobremente unidas, y presentan grandes espacios rellenos de aire entre ellas. A continuación, formando la capa intermedia, se encuentra la corteza, que está fuertemente adherida a la médula y la rodea. La corteza es la capa que compone la mayor parte del tallo piloso, y está compuesta por largas células queratinizadas que, a su vez, se unen en largas filas (de aproximadamente 100 μm de largo) gracias a un cemento especial denominado tegumento. Entre las células de la corteza existen pequeños espacios que se encuentran rellenos de aire, denominados fusi. Es en las células de la corteza donde se acumulan los gránulos de pigmentos que proporcionan al pelo su color, el cual varía en función del tipo, cantidad y distribución de dichos pigmentos. La melanina es el principal pigmento del pelo y se forma en unas células especiales denominados melanocitos. La última capa que conforma el tallo piloso es la cutícula. Ésta recubre a las anteriores y está fuertemente adherida a la corteza. Consta tan sólo de 5 a 7 capas de células alargadas, cuya función es la de anclar el tallo piloso al folículo y proteger las fibras interiores de las agresiones externas. A pesar de ello, esta capa puede ser fácilmente penetrada por disoluciones acuosas y puede ser dañada por diversos productos químicos, el calor, la luz ultravioleta, el oxígeno o ciertas agresiones mecánicas [45].

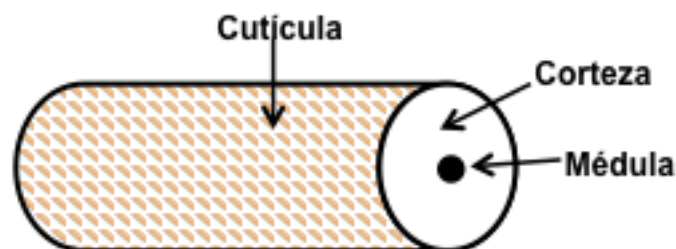


FIGURA 2. Sección de las capas concéntricas (médula, corteza y cutícula) que forman el tallo piloso.

Esta estructura básica común varía en función de la zona anatómica donde se localiza el pelo, lo que origina diferentes tipos según su distribución por el cuerpo humano. Estos tipos de pelo se diferencian en su longitud, textura, diámetro y forma, y se clasifican como vello, pelo intermedio y pelo terminal. El pelo terminal es grueso, largo y pigmentado, y crece en el cuero cabelludo,

barba, pestañas, cejas, axilas y zona púbica. El pelo intermedio se caracteriza por tener una longitud y diámetro intermedios, y crece en brazos y piernas. El vello es muy fino, corto, no pigmentado y de pequeño diámetro. Este tipo de pelo se encuentra localizado en aquellas zonas que aparentemente se encuentran sin pelo, como los párpados, la frente o el cuero cabelludo sin pelo [47].

El tipo de pelo presente en las diferentes regiones anatómicas puede variar, así como modular su velocidad de crecimiento, en función de los cambios hormonales sufridos durante la pubertad [46]. Además, diversas hormonas y/o fármacos (estrógenos, testosterona y dihidrotestosterona, hormonas tiroideas, glucocorticoides, retinoides, prolactina, hormona del crecimiento, anticonceptivos orales, finasterida y minoxidilo) pueden actuar sobre el tipo y la velocidad de crecimiento del pelo [42]. Por ejemplo, los folículos localizados en la zona púbica, axila o sien cambian el tipo de pelo durante la pubertad, de un pelo tipo vello a un pelo tipo pelo terminal, aumentando considerablemente su grosor. Además, el aumento de la testosterona producida en los hombres durante la pubertad actúa en los receptores androgénicos presentes en la papila dérmica de los folículos pilosos de la zona de la barba, orejas, nariz, pecho y abdomen, aumentando el tamaño de los folículos y transformando el pelo tipo vello en pelo terminal [42,46]. Paradójicamente, la testosterona también puede causar miniaturización de los folículos del cuero cabelludo, originando alopecia androgénica [42].

Los folículos pilosos se encuentran asociados a tres tipos de glándulas: sebáceas, apocrinas y sudoríparas. Cada una de ellas presenta una distribución anatómica característica y una función diferente. Las glándulas sebáceas se distribuyen por toda la superficie corporal, a excepción de las palmas de las manos y las plantas de los pies, aunque están mayoritariamente localizadas en el cuero cabelludo y la cara. Estas glándulas secretan una sustancia cerosa denominada sebo. Están situadas bajo la superficie de la piel y vierten el sebo directamente hacia el folículo piloso, bañando el pelo en formación justo antes de su salida hacia el exterior. Como excepción, las glándulas sebáceas de la barba vierten además de en el conducto del folículo piloso, directamente sobre la superficie de la piel. Las glándulas apocrinas se

localizan en las axilas, las areolas mamarias, los párpados y la región perineal. Estas glándulas secretan una sustancia oleosa, incolora e inodora, que al descomponerse por acción bacteriana es responsable del olor corporal. Vierten esta secreción directamente hacia el folículo piloso, aunque también vierten parte hacia la superficie de la piel. Las glándulas sudoríparas se distribuyen por toda la superficie corporal. Están situadas en la dermis y asociadas al folículo piloso, pero no conectadas con él, sino que vierten el sudor que producen directamente hacia la superficie de la piel [45].

Crecimiento del pelo

El crecimiento del pelo no se realiza de forma continuada en el tiempo, sino que presenta un crecimiento asincrónico, es decir, el crecimiento se desarrolla en ciclos. Además, el pelo humano se caracteriza por un crecimiento en mosaico (a diferencia de otros animales), lo que implica que cada folículo piloso realiza su ciclo de crecimiento de manera independiente al ciclo de los folículos pilosos de su alrededor [45]. Tradicionalmente, el ciclo de crecimiento del pelo se dividía en tres fases, anágena o fase de crecimiento activo, catágena o fase de regresión y telógena o fase de inactividad, pero en los últimos años varios estudios han incluido en el ciclo una cuarta fase denominada exógena o fase de caída [47-51].

La fase anágena se caracteriza por un crecimiento activo en las células de la papila dérmica, que origina un aumento de la proliferación de las células germinativas de la base del folículo piloso y su diferenciación para la formación de la fibra capilar. Esta es la fase más larga de todo el ciclo, aunque la duración de la misma es variable entre las diferentes localizaciones anatómicas, y entre individuos. De forma genérica, esta fase dura entre 4 a 8 años en el caso del cuero cabelludo, y sobre 6 meses en el resto del cuerpo. La longitud final del pelo formado durante esta fase también será diferente en función de la parte del cuerpo donde se produzca. Seguidamente, el pelo entra en la fase catágena o de regresión, que se caracteriza por una parada en el crecimiento, es decir, en la división celular, y en la diferenciación de los queratinocitos. Además, cesa la producción de pigmentos por parte de los melanocitos. Esta

reducción en la proliferación es seguida por una apoptosis en el epitelio proximal del folículo piloso, seguida de la degeneración del propio folículo piloso. La duración de esta fase es de unas dos semanas. A continuación, el pelo entra en la fase telógena y detiene por completo su crecimiento, al no existir ya proliferación de los queratinocitos. En esta fase se acorta el folículo piloso pero éste continúa adherido al epitelio en fase de inactividad. La duración de esta fase es de unas 10 semanas en el cuero cabelludo, y de entre 2 a 6 años en el resto del cuerpo [40,52,53]. Finalmente el pelo entra en la fase exógena o de caída, en esta fase el folículo piloso recibe señales que inician de forma activa la caída de la fibra capilar. Esta fase termina cuando la fibra capilar es liberada [48,49].

1.2.2. Incorporación de las drogas y fármacos al pelo

La incorporación de las diferentes drogas y fármacos al pelo puede ser explicada a través de un modelo complejo, en el que se acepta la existencia de tres mecanismos distintos que influyen en la incorporación [54] (Figura 3). Estos mecanismos son:

1. Incorporación desde la sangre que nutre la papila dérmica hacia el interior de la fibra capilar en crecimiento. La papila dérmica es un tejido con una alta proliferación celular y, por tanto, se encuentra altamente irrigado, de forma que las drogas presentes en la sangre difunden, fundamentalmente por difusión pasiva, a través de la membrana celular, incorporando las drogas presentes en la sangre en el interior de los queratinocitos y melanocitos en formación.

Debido a que la incorporación se realiza por difusión pasiva, hay dos factores que influyen en ella. En primer lugar, está la liposolubilidad de las moléculas, ya que al aumentar su lipofilia pueden penetrar con mayor facilidad las membranas y, por tanto, difundir a favor de gradiente hacia el interior celular. En segundo lugar influye el pKa de las moléculas y el pH celular, ya que aquellas moléculas no ionizadas difundirán con mayor facilidad a través de la membrana, y dado que el pH intracelular de los

queratinocitos y de los melanocitos es más ácido que el del plasma (de 3 a 6 en los queratinocitos y melanocitos, frente a 7,3 del plasma), las moléculas básicas penetrarán con mayor facilidad en el interior celular [44,55]. Una vez en el interior, estos compuestos se unen a los diferentes componentes que conforman las células durante la queratogénesis, de modo que permanecen retenidas en su interior. La melanina es uno de los componentes a los que se adhieren con mayor afinidad [43]. Sin embargo, este no es el único mecanismo posible, ya que en animales albinos también se ha observado incorporación de drogas o medicamentos en el pelo, si bien en mucha menor medida. Otro mecanismo de incorporación propuesto es la unión a los aminoácidos con grupos sulfhidrilo, como la cisteína, ya que este tipo de aminoácidos son muy abundantes en el pelo, al ser los encargados de formar las uniones de los puentes disulfuro [56]. Es este paso desde la sangre hacia los folículos pilosos el que permite obtener un perfil cronológico del consumo de drogas, mediante el análisis de segmentos contiguos y sucesivos de un mechón de pelo.

2. Incorporación desde el sudor y las secreciones sebáceas que bañan el pelo durante su formación. Debido a que el pelo es muy poroso, este puede aumentar hasta un 18% de su peso al absorber líquidos y, por tanto, las sustancias presentes en el sudor y en las secreciones sebáceas pueden ser transferidas hacia el pelo y retenidas en él. La fracción libre y no ionizada de las drogas difunde desde la sangre al sudor. La diferencia de pH existente entre el sudor y la sangre (5,8 y 7,4 respectivamente), favorece la difusión pasiva de las moléculas básicas no ionizadas desde la sangre hacia el sudor donde se ionizan, impidiendo su difusión de nuevo hacia la sangre [57]. La gran variabilidad interindividual en la producción de estas dos secreciones puede explicar la gran dispersión de concentraciones encontradas en individuos que han recibido la misma dosis, así como la dispersión de las drogas por una larga zona del tallo piloso, que no se corresponde con las dosis y tiempos administrados [40]. Sin embargo, como estas secreciones se transfieren al pelo cuando éste ya está formando, su

unión suele ser más débil y, por tanto, pueden eliminarse (al menos en parte) en los procesos de lavado previos a la realización de los análisis. Los distintos lavados realizados en los diferentes laboratorios pueden explicar las diferencias encontradas cuando se realiza una comparación de resultados inter-laboratorio.

3. Exposición pasiva a las drogas que se encuentran en el ambiente. Esta exposición puede llevarse a cabo a través de la suspensión de las drogas en el ambiente, del humo producido al fumarlas, del contacto con las manos contaminadas, etc. Como el pelo es una matriz porosa, si se ve expuesto a ambientes con elevadas concentraciones de contaminantes, éstos pueden incorporarse a sus capas más externas. Esta exposición no indica consumo activo, y es por ello que las proporciones entre los compuestos y sus metabolitos suelen presentar unos valores diferentes a los encontrados en aquellos casos en los que si se produce dicho consumo activo y, por tanto, si ha existido incorporación desde la sangre [55]. Esta exposición también debe ser eliminada (al igual que el sudor y las secreciones sebáceas) mediante la realización de procedimientos de lavado previos a la realización de los análisis, para minimizar su aportación y evitar resultados falsos positivos.

La disposición de las drogas incorporadas al pelo dependerá, por lo tanto, de una combinación entre la velocidad a la que crece y el tiempo que permanece cada folículo en cada una de las fases del ciclo de crecimiento. Estos dos factores varían, a su vez, en función de diferencias interindividuales como la raza, el sexo y la edad, del tipo de pelo del que se trata y de la localización anatómica del mismo. Debido a esta gran variabilidad, el pelo de la región del vértex posterior fue seleccionado como el indicado para la realización de los análisis de drogas, ya que en esta zona la cantidad de folículos en fase anágena es mayor y el ratio de crecimiento es más estable. Diferentes estudios han observado que la velocidad de crecimiento en esta zona varía entre 0,6 a 1,4 cm al mes; y aproximadamente el 85% del pelo se encuentra en fase

1.2. El pelo como matriz biológica

anágena, mientras que 15% restante está en una de las otras dos fases [43-58]. Como simplificación, se estableció que la velocidad de crecimiento del pelo en esta región es de 1 cm al mes [46].

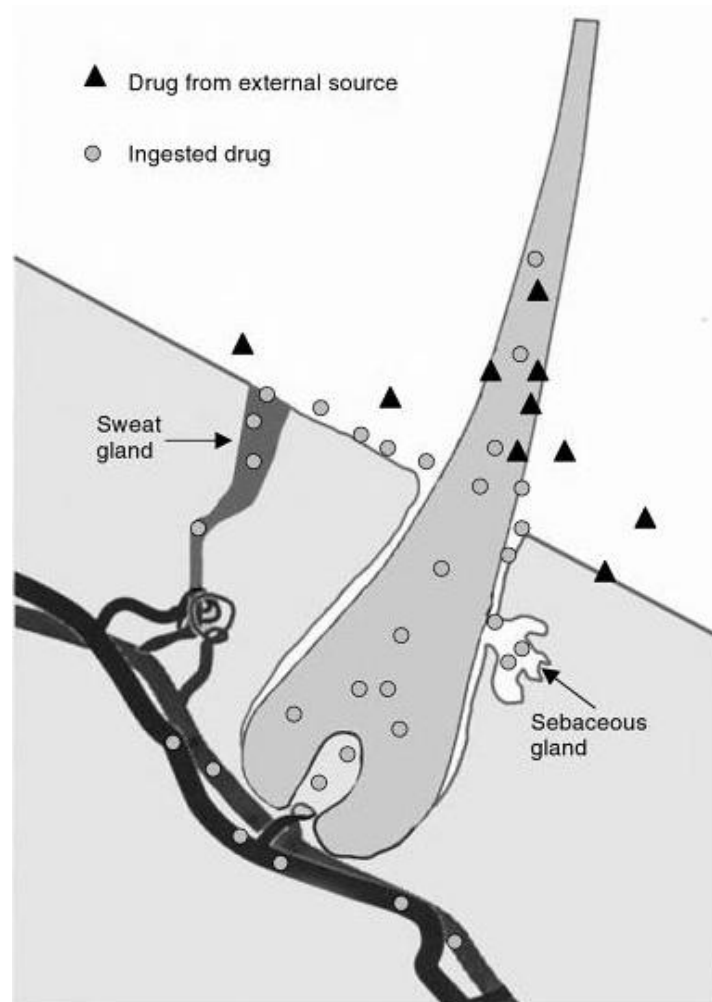


FIGURA 3. Modelo de incorporación de las drogas al pelo mediante tres mecanismos: incorporación a través de la sangre que nutre la papila dérmica, incorporación a través del sudor y del sebo que bañan la fibra capilar e incorporación a través de la exposición pasiva al ambiente (polvos, vapores o humos con drogas). Modificado de Kronstrand et al. [55].

Estabilidad de las drogas y fármacos incorporados al pelo

Las sustancias incorporadas al interior del pelo desde los capilares que irrigan la papila dérmica permanecen en su interior de forma estable y permanente. Por ello, el tiempo durante el cual estas sustancias pueden ser detectadas en pelo está sólo limitado por la propia longitud disponible de pelo para la realización del análisis. Prueba de esta estabilidad es el hallazgo de compuestos como la cocaína y la nicotina en los restos de pelo conservados en varias momias egipcias y precolombinas (de hasta 3000 años de antigüedad) [59-62].

Aunque puede afirmarse que las condiciones normales de higiene, como los lavados diarios con champú, no interfieren en la estabilidad de las drogas incorporadas al pelo en el momento de su formación ni en su eliminación [63]; se ha observado que las concentraciones encontradas a lo largo de un mechón de pelo disminuyen ligeramente al aumentar la longitud del pelo, es decir, al aumentar su edad. Por ejemplo, al analizar varios segmentos consecutivos del pelo de un mismo individuo con un tratamiento crónico pautado a dosis constante, puede apreciarse como las concentraciones halladas en los sucesivos segmentos disminuyen ligeramente al aumentar la distancia desde la raíz, es decir, al aumentar el tiempo que ha transcurrido desde la formación y, por tanto, desde la incorporación de las drogas al pelo [44]. Este fenómeno se produce, fundamentalmente, porque con el paso del tiempo la cutícula se vuelve más susceptible a los daños mecánicos que actúan sobre ella, lo que finalmente origina un aumento en su permeabilidad, y por tanto, los compuestos son más fácilmente eliminados del interior de la fibra capilar.

Otro fenómeno que debe tenerse en cuenta al analizar cabellos de gran longitud, y por tanto, que han sufrido numerosas agresiones externas desde su formación, es que pueden haberse modificado las relaciones entre las concentraciones de la droga y las de sus metabolitos. Este cambio en las proporciones se relaciona con que los compuestos más polares son eliminados más lentamente del interior del pelo que los menos polares, y la proporción metabolito/droga puede verse aumentada al incrementarse el tiempo de permanencia de los compuestos polares en el pelo. Además, aquellos

metabolitos que pueden ser formados por hidrólisis química (como la benzoilecgonina en el caso de la cocaína, y la 6-monoacetilmorfina en el caso de la heroína) pueden seguir produciéndose una vez incorporadas las sustancias al pelo por degradación hidrolítica del compuesto inicial [44]. Aunque todas estas modificaciones en el contenido y relación de las drogas y sus metabolitos deben tenerse en cuenta en la interpretación de los resultados analíticos cuando se analizan mechones muy largos, en la práctica son poco significativas.

Existen ciertos tratamientos cosméticos y ciertas agresiones externas prolongadas que dañan la estructura de la matriz del pelo de manera mucho más significativa que los procesos descritos anteriormente, debido a que alteran la estructura más internamente, e incluso afectan al contenido de pigmento del interior de la fibra. Por ello, pueden causar una pérdida mayor en el contenido de las drogas incorporadas en su interior que sí modifica sustancialmente los resultados cuantitativos obtenidos en la determinación analítica.

Las exposiciones prolongadas a los fenómenos atmosféricos, como pueden ser la radiación solar, la lluvia, el viento, el agua o la contaminación atmosférica, pueden causar un daño en la cutícula y una alteración en la concentración de los pigmentos del interior del pelo y, por tanto, en las concentraciones de drogas o fármacos de su interior unidos a ellos [44]. No obstante, este efecto es mucho más significativo en aquellos pelos que han sido tratados previamente con tratamientos cosméticos agresivos como tintes, mechas o permanentes, ya que éstos degradan en mayor medida la matriz del pelo [43]. Las bases fuertes que se usan en los tratamientos cosméticos producen un elevado daño en la matriz del pelo que puede originar tanto una pérdida de las drogas que previamente habían sido incorporadas al interior del pelo a través de la sangre, como una posible incorporación hacia el interior del pelo en los cabellos expuestos a una contaminación externa ambiental.

El objetivo de la realización de tintes o mechas en un cabello es lograr la degradación total o parcial del pigmento del pelo para lograr una variación en la coloración natural. Habitualmente, los productos utilizados para la realización

de estos tratamientos contienen peróxido de hidrógeno (H_2O_2), agente básico que actúa sobre las escamas de la cutícula, separándolas, para favorecer la entrada de los demás elementos de la composición del producto. Las concentraciones de H_2O_2 varían dependiendo del tratamiento, siendo menores en los tintes que en las aplicaciones de mechas, pero pudiendo llegar a contener hasta un 12% de este compuesto en la fórmula aplicada al cabello. Además, como el H_2O_2 es un potente oxidante, no sólo actúa sobre la cutícula, sino que también ataca al pigmento contenido en el interior del pelo, eliminándolo en parte para lograr la decoloración deseada. En el caso de los tintes, los pigmentos naturales son sustituidos por pigmentos exógenos que colorean nuevamente el cabello del tono deseado. Todo este proceso agresivo afecta y altera la estructura y estabilidad de la fibra de pelo [64]. En el caso de los tratamientos cosméticos conocidos como permanentes, lo que se busca es una modificación de la estructura del pelo para obtener una nueva apariencia. Estos tratamientos se basan en la rotura de los puentes disulfuro, para luego restaurarlos en una nueva posición y lograr la nueva forma deseada. La rotura de los puentes se realiza con mercaptanos y la neutralización posterior con H_2O_2 al 2%. En este caso también se usan componentes muy reactivos que afectan a la estructura y composición del pelo y, por tanto, a la cantidad de drogas incorporadas en el mismo [65]. En general, las mechas causan un mayor descenso en las concentraciones que los tintes, seguramente porque son un tratamiento mucho más agresivo y ocasionan un mayor daño en el pelo. Se han encontrado disminuciones del 40 al 60% entre las porciones de pelo tratadas cosméticamente (tinte o mechas) con respecto a las que no lo fueron, en pelos de adictos a opiáceos, cocaína, cannabis y nicotina [64]. En otros trabajos donde se analizaron cabellos de adictos a opiáceos y cocaína, las disminuciones encontradas fueron mayores (65-80%), probablemente debido a que el tratamiento empleado para la decoloración fue más agresivo [66,67]. Las disminuciones en las concentraciones encontradas en el pelo tras la aplicación de un tratamiento cosmético han sido sistemáticamente recogidas por diversos autores [64,66-77].

Además de las disminuciones en el contenido, también pueden producirse cambios en las relaciones entre las drogas y sus metabolitos debido,

fundamentalmente, al uso de bases fuertes que pueden hidrolizarlas [65]. Por tanto, puede decirse que más que el tipo de tratamiento cosmético en sí, lo que origina un cambio en las concentraciones de las drogas del interior del pelo es el grado de daño que ha sufrido la fibra de pelo con la realización de ese tratamiento cosmético. Además del daño en la fibra, debe tenerse en cuenta también que se ha perdido parte o la totalidad de la melanina contenida en dicha fibra y, por ello, los compuestos que se encontraban unidos a ella probablemente han sido también eliminados [64].

1.2.3. Protocolos generales de análisis

En el año 2012 la *Society of Hair Testing* (SoHT) estableció una guía de buenas prácticas para aquellos laboratorios que realicen análisis toxicológicos de pelo [78]. Ya con anterioridad la propia SoHT, así como varios autores, habían publicado artículos y guías con sugerencias sobre el correcto tratamiento de las muestras de pelo y diversas consideraciones sobre su análisis [44,79-81]. La necesidad de estas guías se debe a que el análisis de una muestra de pelo requiere, a diferencia de otras matrices biológicas, un proceso de pretratamiento de la muestra muy complejo, incluyendo una correcta toma de muestra, una serie de medidas destinadas a la minimización de la posible contaminación externa, una adecuada extracción de los analitos incorporados en la matriz sólida y el uso de métodos instrumentales suficientemente sensibles para conseguir detectar y cuantificar correctamente las bajas concentraciones de analitos encontradas en esta matriz.

Previamente a la realización propiamente dicha del análisis del pelo, es necesario realizar un estudio del caso y una correcta documentación del mismo. Deben, por tanto, registrarse las posibles sustancias que se han consumido, el tipo de pelo disponible para el análisis, la fecha del posible consumo y la fecha de recogida de la muestra, la longitud del mechón, color, tratamientos cosméticos realizados, y cualquier otro tipo de información que se considere de relevancia para el caso. Con estos datos deben estudiarse las diferentes opciones disponibles entre las que figuran: decidir que tipo o tipos de análisis deben realizarse, el pelo de elección que debe recogerse (en caso de

que el cabello no esté disponible pueden utilizarse el pelo del pubis, axila, pecho, brazos, piernas, barba, etc), la cantidad mínima de pelo necesaria para realizar todos los análisis necesarios, la necesidad de segmentar el pelo para estudiar el patrón cronológico de consumo, etc [44].

De forma genérica, los pasos necesarios para el análisis toxicológico del pelo son:

1. Recogida de la muestra y almacenamiento.
2. Segmentación del mechón.
3. Eliminación de la contaminación externa.
4. Extracción de los analitos de la matriz.
5. Procesos de purificación.
6. Análisis instrumental.

1.2.3.1. Recogida de la muestra y almacenamiento

La recogida de muestras de pelo puede realizarse de diferentes regiones anatómicas como el cuero cabelludo, pubis, axila, o cualquier otra zona corporal con pelo. Sin embargo, siempre que esté disponible, se seleccionará preferentemente el cabello como la muestra de elección para el análisis rutinario de drogas, alcohol o medicamentos. La recogida del cabello debe realizarse en la parte posterior de la cabeza conocida como vértex posterior, debido a que es en esta zona donde existe menor variabilidad tanto entre el ratio de crecimiento de los folículos pilosos (con un 85% en fase anágena) como por razones de edad o sexo, y por tanto, la muestra obtenida en esta zona es más reproducible [44].

Cuando se analiza el pelo procedente de otras regiones anatómicas debe tenerse en cuenta que el ratio de crecimiento es diferente al ratio aplicado en la interpretación de los casos de cabello (1 cm/mes). Asimismo, las concentraciones encontradas y la relación entre sus metabolitos podrán también ser diferentes, y por ello, los *cut-offs* empleados serán distintos a los empleados en cabello [78]. Además, debe tenerse en cuenta durante la toma de muestra que cuando se recoge pelo de zonas íntimas, como el pubis, es

necesario garantizar la privacidad del donante, mientras se asegura la integridad del proceso de toma de muestra manteniendo la cadena de custodia.

La toma de muestra debe ser preferentemente realizada por personal especializado, en una instalación libre de sustancias contaminantes y usando guantes durante toda la manipulación de la muestra, para evitar la contaminación de ésta. Sin embargo, es posible que en casos excepcionales personal no cualificado realice la toma de muestra, siempre y cuando siga un protocolo escrito de recolección donde se indiquen detalladamente los pasos a seguir.

La cantidad de pelo recogida debe ajustarse al número de determinaciones toxicológicas requeridas y a la cantidad de pelo necesario para cada metodología analítica. En general, se recomienda un mechón del diámetro de un lápiz [22,44,78-81]. Para ello, es necesario fijar el mechón con una goma o un hilo, marcando de este modo la zona del mechón más próxima a la cabeza y alineando las fibras del pelo. El mechón debe ser cortado lo más cerca posible al cuero cabelludo. Cuando se desea realizar el análisis por segmentos, por ejemplo, para realizar un estudio del patrón cronológico de consumo, debe tenerse en cuenta que podrá ser necesario recoger un mechón de mayor grosor. En caso de que fuera necesario, es posible recoger varios mechones de un mismo individuo para tener una muestra gemelar de la muestra analizada. En aquellos casos donde la cantidad de pelo disponible sea limitada, el pelo sea muy fino o no se quiera dejar calvas evidentes en la cabeza de una persona, es posible y está aceptado el recoger pequeños mechones de múltiples localizaciones en la zona del vértex posterior [78]. Como ocurre con cualquier otra muestra toxicológica, la muestra recogida debe ser identificada de forma inequívoca y la cadena de custodia debe mantenerse durante todo el proceso.

El pelo no requiere condiciones especiales de almacenamiento. Las muestras deben ser conservadas a temperatura ambiente, introducidas simplemente en un sobre de papel, en papel de aluminio, o bien en un tubo de cristal o plástico. Es aconsejable almacenarlas en un lugar seco y oscuro, evitando la luz directa del sol, y no es recomendable guardarlas en la nevera o el congelador.

Existen ciertas recomendaciones especiales para la toma de muestra en casos postmortem y casos de sumisión química. Para los casos postmortem es aconsejable que la recogida del cabello se realice al comienzo de la autopsia y que se tomen dos mechones de cabello, uno arrancado de raíz y otro cortado, para obtener también la información sobre las drogas consumidas más próximas a la muerte del individuo. En los casos de sumisión química, es necesario que la toma de muestra se realice como mínimo unas 4-6 semanas después del incidente de sumisión, de modo que las posibles sustancias que se hayan podido incorporar a la fibra capilar en formación en el momento del incidente sean ya detectadas en el cabello recogido. También es aconsejable que la persona víctima de sumisión química no se realice ningún tratamiento cosmético o se corte el pelo antes de que las investigaciones toxicológicas concluyan. Por último, es recomendable recoger una segunda muestra de cabello y analizarla cuando los resultados de la primera son positivos, para corroborar el resultado del primer análisis [78].

1.2.3.2. Segmentación del mechón

La segmentación del mechón de pelo permite realizar un estudio del patrón cronológico de consumo, para obtener información sobre el uso de las sustancias a lo largo del tiempo. Sin embargo, no en todos los casos es necesario realizar la segmentación del mechón de pelo, bien porque la naturaleza del caso a estudio no lo aconseja o bien porque el cabello es muy corto (menor a 1 cm).

La segmentación del cabello se basa en la admisión de dos premisas: el ratio de crecimiento medio del cabello de un individuo es de 1 cm/mes, y la toma de muestra se realiza cortando el pelo lo más próximo posible al cuero cabelludo [82]. Por ello, deben seguirse una serie de recomendaciones durante la toma de muestra y durante el propio proceso de segmentación para realizarla de manera adecuada.

Durante la toma de muestra es fundamental evitar que las fibras de pelo se desalineen durante el corte. Cuando el mechón de pelo se sujeta para ser

cortado forma un cono, y puede producirse el desalineado de las fibras de pelo; además, debe tenerse cuidado con el ángulo de las tijeras que se use durante el corte, ya que si es demasiado oblicuo dejará muestra residual en el cuero cabelludo. El desalineado es muy difícil de evitar completamente, aunque la toma de mechones de diámetro menor favorece un correcto alineamiento de las fibras, y por ello, es aconsejable cuando se va a realizar la segmentación recoger varios mechones de diámetro pequeño en lugar de un solo mechón de gran diámetro. Kintz [83] aconseja no recoger más de 60 fibras de pelo por mechón. Además, el proceso de eliminación de la contaminación externa debe realizarse siempre después de la segmentación para que el mechón no se desalinee durante el mismo.

El proceso de segmentación debe realizarse con la ayuda de una regla o papel milimetrado que permita medir correctamente la longitud el segmento. Pragst et al. [44] recomiendan efectuar segmentos de longitud creciente en el análisis de un mechón. Esto se debe a que la concentración de las sustancias en un segmento de pelo de un mechón decrece proporcionalmente con el incremento de su distancia desde la raíz. Como ejemplo, recomienda que un mechón de 45 cm sea segmentado del siguiente modo (desde la zona proximal a la distal): 4 segmentos de 0,5 cm, 3 segmentos de 1 cm, 2 segmentos de 2 cm, 2 segmentos de 3 cm, 2 segmentos de 5 cm y 2 segmentos de 10 cm.

No hay en la bibliografía científica relacionada ningún caso de segmentación de otro tipo de pelo corporal diferente al cabello, y la segmentación del pelo corporal no es aconsejable [83]. Esto se debe a que el pelo corporal recogido de un mismo donante en una misma zona tiene diferentes longitudes y el ratio de crecimiento, así como el ratio de pelo en fase telógena/anágena, es muy variable con respecto al encontrado en el cabello.

En los últimos años han aparecido en la literatura varios métodos de análisis mediante la segmentación de una sola fibra de pelo [84-86], para evitar los problemas de toma de muestra de un mechón con fibras en diferentes estadios de crecimiento. Sin embargo, aunque el análisis de una sola fibra de pelo simplifica el proceso de segmentación, requiere analizar varios cabellos de un mismo individuo para evitar falsos negativos debido a que éstos se encuentran

en distintas fases de crecimiento e instrumental analítico extremadamente sensible.

1.2.3.3. Eliminación de la contaminación externa

La contaminación externa se compone de una combinación de contaminantes de origen exógeno y contaminantes de origen endógeno que recubren la parte externa de la fibra pilosa. Los contaminantes exógenos engloban restos de drogas a los que se expone pasivamente el pelo en contacto con ambientes contaminados. Mientras que los contaminantes endógenos son segregados por las glándulas sebáceas y las glándulas sudoríparas, y bañan la parte externa de la fibra pilosa en formación [78]. La eliminación de esta contaminación externa es un paso previo a realizar antes de cualquier análisis de pelo, tanto para evitar resultados falsos positivos por la posible existencia de contaminantes exógenos, como para evitar interferencias en la interpretación de los resultados que puedan causar los contaminantes endógenos. En la práctica, no es posible diferenciar entre ambos componentes de la contaminación externa [78].

La eliminación de la contaminación externa se realiza mediante la aplicación de lavados sucesivos en el mechón de pelo o segmento con uno o varios disolventes durante un tiempo determinado. Además de eliminar la contaminación externa propiamente dicha, estos procesos de lavado del pelo también eliminan restos de productos cosméticos como champús, ceras, lacas, etc, que pueden interferir en la posterior determinación analítica de los compuestos de interés, al disminuir la relación señal/ruido del cromatograma obtenido [44].

Las recomendaciones generales de la SoHT en relación a la eliminación de la contaminación externa, son [78]:

- Realizar siempre un procedimiento de lavado del pelo antes del análisis.
- El procedimiento de lavado debe realizarse con disolventes orgánicos y acuosos.

- El laboratorio debe investigar el grado de eliminación de la contaminación externa que produce su método de lavado.
- Aquellos cabellos que estén altamente impregnados de fluidos biológicos pueden requerir pasos adicionales de lavado.

Por tanto, y siguiendo estos criterios, se han desarrollado numerosas metodologías para la eliminación de la contaminación externa [87-92], probando la importancia de su realización, para evitar resultados falsos positivos. En la mayoría de estas metodologías se incluyen tanto disolventes orgánicos como acuosos. Sin embargo, está generalmente aceptado que los disolventes orgánicos como el diclorometano y la acetona tan sólo eliminan la contaminación superficial de la fibra de pelo, mientras que las disoluciones acuosas y el metanol también extraen parte de las drogas incorporadas en el pelo [44,78].

Una vez eliminada la contaminación externa es importante comprobar que el método de lavado ha sido efectivo y la concentración encontrada se corresponde con la cantidad de droga que había sido incorporada en el interior del pelo desde la sangre. Para ello, se han establecido varios criterios [93]:

- Análisis del último lavado y su comparación con los niveles de analitos detectados en el análisis del pelo. Los disolventes utilizados para la eliminación de la contaminación externa deben ser analizados para comprobar que en el último lavado no se detectan cantidades de analitos significativas. Sin embargo, es posible la detección de pequeñas cantidades que puede deberse tanto a que la secuencia o protocolo de lavado empleado no ha sido completamente efectivo en la eliminación de la contaminación externa, como a que durante el procedimiento de lavado el disolvente o los disolventes empleados han sido capaces de extraer parte de los compuestos incorporados en el interior de la fibra capilar. Por ello, es necesario utilizar algún criterio que nos permita diferenciar si esas pequeñas cantidades de analitos se pueden atribuir a la contaminación externa o no. Baumgartner et al. [94] publicó que la concentración de la droga en el pelo después del

lavado debía exceder la concentración encontrada en el último lavado al menos en 10 veces. Tsanaclis et al. [95] sugirió el uso del mismo criterio, mediante la aplicación de un ratio entre el área del analito encontrada en el último lavado (W) frente al área del analito encontrada en el interior de la fibra capilar (H). Cuando este ratio W/H es menor a 0,1 se considera que la contaminación externa ha sido totalmente eliminada y los compuestos encontrados en el interior del pelo (H) corresponden a un consumo sistémico de drogas. Si el ratio W/H tiene un valor de 0,5 se considera que los analitos detectados en el último lavado corresponden a contaminación externa, y por tanto, se descarta la incorporación desde la sangre. Finalmente, si el ratio W/H está entre 0,1 a 0,5, entonces se considera un posible uso activo de drogas con una combinación de un cierto nivel de contaminación externa del pelo.

Cairns et al. [96] estableció también un "criterio de lavado" para poder asegurar la correcta eliminación de la contaminación externa. Para ello sugirió someter el mechón de pelo a analizar a lavados sucesivos de isopropanol y tampón fosfato; y estableció que la cantidad encontrada en el interior del pelo menos la cantidad encontrada en el último lavado, previamente multiplicada por 5, debía ser menor al nivel de corte establecido para ese compuesto (500 pg/mg para la cocaína y anfetaminas, y 200 pg/mg para los opiáceos).

- Detección de metabolitos. La detección de metabolitos de origen endógeno, es decir, que requieren una metabolización enzimática para su formación, y por tanto, han sido metabolizados e incorporados desde la sangre hacia el interior de la fibra capilar, permite establecer que la presencia de algunas drogas en el pelo se debe a la incorporación activa desde la sangre y no a una posible contaminación externa. Un ejemplo del uso de metabolitos endógenos con este fin es la utilización de norcocaína, cocaetileno y/o anhidroecgoninametiléster (AEME) para identificar el consumo activo de la cocaína. La norcocaína se forma por una desmetilación

enzimática de la cocaína, el cocaetilo se forma por una reesterificación tras el consumo conjunto de cocaína y etanol, y la AEME se produce específicamente como resultado del consumo de la cocaína fumada [97-99]. Otros ejemplos de metabolitos endógenos son la normorfina para el caso del consumo de heroína [100], y el carboxi- Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THCCOOH) en el caso del cannabis [101]. También son metabolitos con formación exclusivamente endógena por N-dealquilación la anfetamina y la metilendioxianfetamina (MDA) obtenidos de la metilendioximetanfetamina (MDMA) y la metilendioxietilanfetamina (MDEA) [102]; sin embargo, en este caso estos metabolitos también son usados como drogas por sí mismos, y por ello no es posible utilizarlos como criterio para descartar una posible contaminación externa al detectar su presencia tras un análisis de pelo.

También es posible usar ratios entre la droga y metabolitos no formados enzimáticamente. Estos metabolitos no enzimáticos, originados por procesos químicos de hidrólisis, pueden estar en la propia contaminación externa a la que se vea expuesta el pelo. Los metabolitos no enzimáticos se incorporan desde la sangre hacia el interior de la fibra capilar dependiendo de sus características fisicoquímicas y por tanto, las concentraciones de los diferentes metabolitos estarán relacionadas con la concentración de la droga incorporada. Para la cocaína, por ejemplo, el metabolito mayoritario en pelo es la benzoilecgonina (BE), que se forma por hidrólisis y por tanto no es un metabolito enzimático. Sin embargo, se ha visto que la incorporación endógena de cocaína y BE permite establecer que un ratio BE/cocaína mayor de 0,05 se corresponde con un consumo activo, mientras que un ratio menor se correspondería con una probable contaminación externa [103,104]. De igual modo, un ratio entre morfina y 6-monoacetilmorfina (6-AM) con valores entre 0,21 y 0,74 se considera consumo activo de heroína [105] pese a que la heroína se hidroliza fácilmente en su metabolito 6-AM de forma no específica. La SAMHSA (*Substance Abuse and Mental Health Services Administration*) recomienda también el uso de estos ratios

entre metabolitos y principio activo, concretamente establece un ratio de BE/cocaína mayor de 0,05 para asegurar el consumo de cocaína, y un ratio 6-AM/morfina mayor de 1,3 para probar el consumo de heroína [106].

- Uso de *cut-offs* o niveles de corte. El establecimiento de niveles de concentración a partir de los cuáles es posible asegurar de forma inequívoca que el compuesto ha sido consumido de forma activa. Varias organizaciones internacionales han establecido *cut-offs* para diferenciar el consumo crónico de una posible contaminación externa cuando se realiza un análisis de pelo. En la Tabla 2 se observan los *cut-offs* establecidos por la SoHT en 2012 para el consumo crónico [78]. Asimismo otras asociaciones científicas, como la sociedad americana SAMSHA, la asociación alemana GTFCh (*Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie*) y la sociedad francesa SFTA (*Société Française de Toxicologie Analytique*), han establecido sus propios niveles de corte para la realización de análisis de pelo.

Sin embargo, cuando el objetivo del análisis de pelo es la determinación de una exposición única por el consumo de una determinada sustancia, los *cut-offs* empleados deben ser menores. Las concentraciones en pelo de la mayoría de los compuestos tras una exposición única están en el rango de unos pocos pg/mg.

Durante la interpretación de los resultados de un análisis de pelo todos estos criterios deben tenerse en consideración para minimizar la aportación de la contaminación externa a la correcta interpretación del resultado analítico obtenido.

TABLA 2. Concentraciones (ng/mg) establecidas como *cut-offs* por la *Society of Hair Testing* en 2012 para consumo crónico de las principales drogas de abuso en pelo [78].

Grupo	Compuesto	Metodología <i>Screening</i>	Metodología Confirmación
		<i>Cut-off</i> (ng/mg)	<i>Cut-off</i> (ng/mg)
Anfetaminas	Anfetamina	0,2	0,2
	Metanfetamina		0,2
	MDA		0,2
	MDMA		0,2
Cannabinoides	THC	0,1	0,05
	THCCOOH	-	0,0002
Cocaínicos	Cocaína	0,5	0,5
	BE, EME, CEt, NC	-	0,05
Opiáceos	Morfina	0,2	0,2
	Codeína		0,2
	6-AM		0,2
Metadona	Metadona	0,2	0,2
	EDDP	-	0,05
Buprenorfina	Buprenorfina	0,01	0,01
	Norbuprenorfina	-	0,01

BE: benzoilecgonina; CEt: cocaetileno; EDDP: 2-ethylidene-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidine; EME: ecgoninametiléster; MDA: metilendioxianfetamina; MDMA: metilendioximetanfetamina; NC: norcocaína; THC: Δ^9 -tetrahidrocannabinol; THCCOOH: carboxi-THC; 6-AM: 6-monoacetilmorfina.

1.2.3.4. Extracción de los analitos de la matriz

El pelo es una matriz sólida y, debido a ello, las drogas que han sido incorporadas desde la sangre hacia su interior se encuentran firmemente unidas a las proteínas, a la melanina y/o a los lípidos que forman su estructura. Por ello es necesario realizar previamente al análisis un procedimiento de

extracción de estos analitos de la matriz sólida, que libere las drogas y permita su análisis. La eficacia de esta extracción dependerá de diversos factores como son: el estado de conservación de la matriz, la estructura química de los analitos, la polaridad del disolvente empleado, y la duración y forma de extracción [107]. El proceso de extracción incluye un primer paso de homogenización de la muestra y un segundo paso de extracción mediante la solubilización los analitos con un disolvente que penetre en el interior de la fibra pilosa, o mediante la digestión de la matriz del pelo [44].

La homogenización puede efectuarse mediante el corte del pelo en pequeños fragmentos de 1-3 mm o por pulverización del mismo hasta obtener un polvo fino. Estas acciones aumentan la superficie de contacto entre el pelo y el disolvente usado en la extracción de los analitos y, por tanto, maximizan la extracción de los mismos. Durante este proceso se suele perder una pequeña cantidad del pelo, que dependerá de la habilidad del operario así como de las características del pelo (se perderá más cantidad de pelo en caso de que presente mucha electricidad estática). En general, al pulverizar se pierde mucho menos pelo y la superficie de contacto entre el pelo y el disolvente es mucho mayor, por tanto, la cantidad de compuesto extraído también será mayor. No obstante, también pueden extraerse más sustancias interferentes del interior del pelo y, consecuentemente, disminuir la relación señal/ruido analítica. Varias publicaciones han recomendado la pulverización del pelo como el sistema con mayor recuperación en comparación con aquellas técnicas que emplean el pelo sólo cortado [108-110].

Una vez homogeneizado el pelo, se realiza la extracción por solubilización o digestión. Se ha observado que la completa digestión de la matriz permite obtener una mejor recuperación de los analitos [110], pero las técnicas empleadas para ello suelen ser más agresivas y los extractos obtenidos tienen más impurezas e interferentes. Para la elección entre uno u otro sistema, deben tenerse en cuenta una serie de parámetros fisicoquímicos tanto de las propias sustancias a extraer (estructura de las moléculas) como de los disolventes empleados para ello (polaridad). Se debe tratar de maximizar la cantidad de droga extraída del pelo, manteniendo su estabilidad química, y la de sus metabolitos [44,111]. Asimismo, debe optimizarse el tiempo empleado

en dicho proceso para lograr la máxima extracción en el mínimo tiempo posible. También debe tenerse en consideración que, en aquellos métodos analíticos en los que se pretendan determinar un amplio número de sustancias con diferente naturaleza química, será necesario alcanzar un compromiso entre las características óptimas de extracción de cada uno de los analitos y el procedimiento de extracción seleccionado, para maximizar la extracción sin afectar a la estabilidad química de los compuestos.

La extracción de los analitos suelen hacerse con:

- Disolventes orgánicos: la extracción con este tipo de disolventes es compatible con la mayoría de sustancias, ya que el disolvente penetra en el interior del pelo y los compuestos son extraídos hacia el exterior por difusión. La alta compatibilidad de los disolventes orgánicos con sustancias químicamente muy diversas permite su uso en la extracción en métodos multianalito. Debido a esta alta inespecificidad, los extractos obtenidos suelen ser muy “sucios” y requieren otros procesos de purificación posteriores. Debe tenerse en cuenta que la recuperación obtenida mediante estos disolventes suele ser incompleta y menor que la obtenida por otros medios. Podemos encontrar numerosos trabajos que emplean disolventes orgánicos en la extracción de drogas y fármacos [112-122].
- Tampones ácidos: su uso favorece la extracción de compuestos básicos, tales como cocaína, metadona, opiáceos, anfetaminas y algunos fármacos [123-126]. Se utilizan fundamentalmente disoluciones acuosas de ácido clorhídrico (0,01-0,5 M) o disoluciones de tampón fosfato (pH 6,4-7,6) [127]. La principal ventaja del empleo de este tipo de disoluciones ácidas frente a los disolventes orgánicos es que el extracto obtenido es mucho más limpio y, por tanto, con menos interferentes a nivel analítico. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que el empleo de este tipo de disoluciones conlleva la hidrólisis parcial de la cocaína en su metabolito BE, así como la hidrólisis de la 6-AM en morfina.

- Tampones básicos: este tipo de disoluciones a pH básico (generalmente disoluciones acuosas de NaOH) permiten la completa digestión de la matriz sólida del pelo. Esto permite obtener una mayor recuperación de la extracción, pero no todas las sustancias son estables a pH básicos, ya que por ejemplo, la cocaína se hidroliza espontánea y completamente a BE bajo estas condiciones [127]. Por tanto, su aplicabilidad se ve reducida a sustancias como las anfetaminas [128,129], THC y metabolitos [130,131], nicotina y metabolitos [132-134] y fármacos como anabolizantes [135] y antidepresivos [136].
- Digestión enzimática: se emplean enzimas que permiten la rotura de los puentes de hidrógeno y los puentes disulfuro, como pueden ser β -glucuronidasa, la pronasa o la proteinasa K, que liberan las sustancias retenidas en dichas estructuras. Se ha empleado este tipo de digestión tanto para la determinación de drogas [137-139] como de fármacos [140] en pelo, ya que su uso es adecuado para todo tipo de sustancias. Como inconveniente cabe destacar su elevado coste y que pueden desnaturalizar (bajo ciertas condiciones) los anticuerpos empleados en la determinación de los compuestos por técnicas de inmunoensayo [141].

La solubilización o la digestión del pelo suele realizarse acompañada de una incubación con calor de los extractos o bien de una extracción con ultrasonidos. La incubación con calor causa una mayor solubilización de los compuestos en el disolvente y la ultrasonificación causa una alta degradación de la estructura del pelo y por ello, favorecen el proceso de extracción.

Asimismo, se ha observado que no todos los disolventes orgánicos penetran de igual modo que las disoluciones acuosas en el interior de la fibra pilosa. La extracción utilizando metanol como disolvente orgánico (acompañada de ultrasonificación o no) ha demostrado que permite una solubilización de las moléculas, con una recuperación similar a la obtenida con las disoluciones acuosas [110].

Un error común durante el desarrollo de un procedimiento de extracción de los analitos de la matriz es el uso de un tiempo de extracción demasiado corto que no permita la total recuperación de las sustancias presentes en la muestra de pelo, especialmente en el caso de la solubilización de los analitos con disolventes orgánicos. Musshoff et al. [127] observaron que los compuestos menos polares (heroína y 6-AM) eran extraídos más rápido que los compuestos más polares (morfina y codeína) (Figura 4). Debido a esto, es aconsejable realizar siempre las pruebas de extracción con muestras de pelo de consumidores, y también es recomendable utilizar como control, una vez desarrollado el método, y debido a las variaciones individuales, una segunda extracción de la muestra que se está analizando, utilizando el mismo procedimiento para comprobar la total recuperación de los analitos de la matriz.

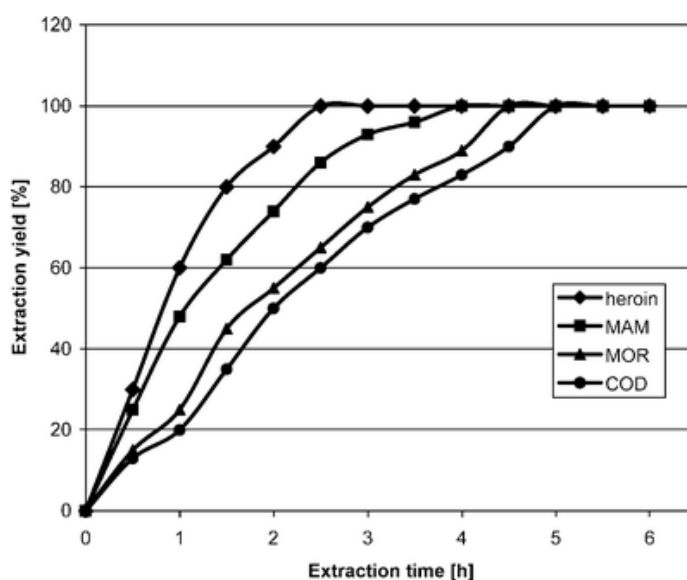


FIGURA 4. Porcentaje de recuperación de opiáceos extraídos en un cabello sometido a una extracción con metanol y baño de ultrasonidos a 50°C a diferentes tiempos (modificado de Musshoff et al. [127]).

1.2.3.5. Procesos de purificación

Debido a que el pelo es una matriz compleja, los extractos obtenidos después de la extracción de los analitos de la matriz del pelo deben ser sometidos a un proceso de purificación que elimine los interferentes y concentre las sustancias para su posterior análisis. Aunque es posible encontrar en la bibliografía algunos trabajos en los que el extracto metanólico

es directamente inyectado en el cromatógrafo de líquidos acoplado a espectrometría de masas en tándem (LC-MSMS) o el cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas en tándem (GC-MSMS) [113,142-144], en general, es recomendable hacer un paso previo de limpieza y concentración de los compuestos para eliminar impurezas e interferentes.

El proceso de purificación al que se someten los extractos es similar al que se emplea para la determinación de drogas en sangre u orina. Los métodos más empleadas para este fin son la extracción líquido-líquido (LLE) y la extracción en fase sólida (SPE). La selectividad del proceso de purificación afecta al resultado final del análisis, ya que una técnica selectiva proporciona extractos más limpios, aumentando la detectabilidad de los compuestos. Asimismo, es importante que estas técnicas proporcionen una buena recuperación de los analitos de interés y una baja recuperación de sus interferentes y, por lo tanto, se debe encontrar una solución de compromiso entre la selectividad y la intensidad de la limpieza del procedimiento.

Generalmente, los métodos SPE son los más usados debido a que producen extractos más limpios, tienen una mayor selectividad y reproducibilidad, y evitan la formación de emulsiones, comparados con los métodos de LLE [145]. Además, las extracciones con técnicas SPE permiten su automatización. Sin embargo, como desventaja cabe destacar que los cartuchos de extracción empleados en SPE encarecen el análisis. Wada et al. [146] y Vogliardi et al. [147] publicaron en 2010 y 2015, respectivamente, extensas revisiones bibliográficas con los principales métodos de extracción empleados para los diferentes tipos de sustancias.

También es posible encontrar publicaciones que emplean otro tipo de técnicas para la purificación de los extractos, como pueden ser la microextracción en fase sólida (SPME) y la impresión molecular polimérica (MIP). La SPME fue inventada por Zang et al. [148], y admite su acoplamiento directo con un GC-MSMS. Esta técnica permite la miniaturización y automatización de la extracción, así como la preconcentración y purificación de los compuestos en un solo paso. La SPME emplea una fibra de sílice fundida y recubierta por una fase estacionaria polimérica, que se introduce en un vial de espacio de cabeza

donde se encuentra la muestra a analizar. Los compuestos forman un equilibrio entre la muestra, la fase de vapor y la fibra de sílice y, bajo unas determinadas condiciones de tiempo y temperatura, los compuestos en la fase de vapor son adsorbidos a la fibra de sílice. Posteriormente, las altas temperaturas del propio GC producen la desorción de los mismos [149]. Se han publicado diversos trabajos para la detección de cannabinoides, metadona, anfetaminas, y otras drogas y medicamentos empleando esta técnica [149-157]. La técnica MIP permite una extracción selectiva de los compuestos de interés, a diferencia de la purificación con SPE, que se basa en interacciones no selectivas y, por tanto, se produce la co-extracción de sustancias interferentes junto con los analitos de interés. Esta técnica se basa en el desarrollo de materiales poliméricos que poseen cavidades de unión con un tamaño, forma y funcionalidad complementarias a la molécula de interés o molécula plantilla, actuando, por tanto, como anticuerpos sintéticos [158]. En los últimos años se han desarrollado metodologías para la determinación de cocaína y sus metabolitos [159], ketamina y norketamina [160], LSD [161], nicotina [162] y diazepam [163] en pelo empleando como técnica de purificación la extracción con MIP.

1.2.3.6. Análisis instrumental

El análisis de pelo requiere el empleo de técnicas instrumentales que permitan determinar las sustancias de manera inequívoca, cuantificarlas con una adecuada precisión y exactitud, y con suficiente sensibilidad para alcanzar concentraciones en el rango de los picogramo por miligramo de pelo. Por ello, las dos metodologías de elección en el análisis cuantitativo de pelo son la cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas y la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas en tándem. Sin embargo, es frecuente el uso de técnicas inmunoquímicas como método de barrido o *screening*.

Las técnicas inmunoquímicas que se basan en la reacción entre un antígeno (el compuesto a determinar) y un anticuerpo, permiten un análisis rápido y a bajo coste de un gran número de muestras. Sin embargo, presentan una

sensibilidad y especificidad limitadas, que reducen su campo de aplicación al *screening* toxicológico, y requieren siempre una confirmación de los resultados positivos por técnicas con mayor especificidad como GC-MS o LC-MSMS. El primer análisis de pelo se realizó empleando la técnica inmunoquímica de radioinmunoensayo o RIA [23], pero en los últimos años se han desarrollado otro tipo de ensayos inmunoquímicos como ELISA (ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas) o FPIA (inmunoensayo de polarización fluorescente) [164-172].

La mayoría de los métodos utilizados en el análisis del pelo emplean la espectrometría de masas como sistema de detección, ya que presenta un alto grado de sensibilidad y fiabilidad. La detección se realiza mediante la relación masa/carga de los compuestos, lo que convierte a este detector en un identificador prácticamente inequívoco de las moléculas. El acoplamiento de esta técnica de detección a la cromatografía de gases se produjo a finales de los años 50 del siglo pasado [173]. GC-MS es una técnica robusta, sensible y selectiva, utilizada de forma rutinaria en los laboratorios de Toxicología. La fragmentación de los compuestos utilizando impacto electrónico como sistema de ionización, produce espectros de masas característicos de los compuestos, permitiendo la creación de librerías y la realización de *screening* sistemático [174]. Sin embargo, las sustancias poco volátiles o con baja estabilidad térmica presentan serias dificultades para su análisis mediante esta técnica, y requieren procedimientos de derivatización para mejorar sus características cromatográficas, proporcionarles mayor volatilidad y estabilidad térmica, así como incrementar la especificidad del espectro de masas. El empleo de la técnica de LC-MSMS es una alternativa para compuestos polares y termolábiles, sin el paso previo de la derivatización, siendo por tanto un análisis más rápido y barato. Las aplicaciones de la LC-MSMS en la Toxicología Forense han sido múltiples, desde anfetaminas, cocaína, THC, opiáceos, LSD, benzodiazepinas, neurolépticos, etc, tanto para la identificación como la cuantificación de estas sustancias [90,115,116,121,125,129,140,159,175,176]. Además, en los últimos años los avances técnicos han permitido el empleo de LC-MSMS para la realización del *screening* toxicológico [177]. Como inconveniente, cabe destacar el alto precio de los equipos empleados de LC-

1.2. El pelo como matriz biológica

MSMS, por lo que no están disponibles en todos los laboratorios de Toxicología.

1.3. APLICACIONES DEL ANÁLISIS DE PELO EN EL ÁMBITO DE LA TOXICOLOGÍA CLÍNICA Y FORENSE

El análisis de pelo es una importante herramienta en el campo de la Toxicología, tanto clínica como forense, debido a sus características diferenciadoras en relación con las demás muestras disponibles, como orina, sangre, fluido oral, sudor, meconio, etc. Como se indicó previamente, las drogas o medicamentos incorporados en la estructura del pelo permanecen en su interior inalterados durante un largo periodo de tiempo y, por ello, la ventana de detección empleando esta matriz se amplía en gran medida. Esto permite un estudio retrospectivo del historial de consumo de drogas y medicamentos. En los últimos años, se han ido incrementando los campos en los que es posible aplicar el análisis de pelo para obtener información que con las matrices biológicas tradicionales no sería posible conseguir.

El análisis de pelo puede realizarse mediante segmentación o no del mechón a estudio. Sin segmentación de la muestra puede establecerse si un individuo ha consumido o no durante el periodo de tiempo correspondiente con la longitud del mechón analizado, pero no el perfil cronológico de dicho consumo. La cronicidad del consumo se determina empleando los criterios de *cut-off* establecidos por la SoHT [78], en función de las concentraciones encontradas. Si los valores de concentración son superiores a dicho *cut-off* se determina un consumo crónico y si son inferiores, puede establecerse un consumo esporádico. La monitorización del consumo de drogas utilizando pelo es mucho más sencilla que empleando las matrices biológicas tradicionales (sangre y/u orina), ya que en el caso del pelo sólo se requiere una toma de muestra y un análisis, mientras que en el caso de la sangre y de la orina deben tomarse 2-3 muestras por semana. Las matrices tradicionales presentan una menor ventana de detección que el pelo y, por ello, los consumos esporádicos (consumos con días de abstinencia entre los mismos) pueden proporcionar resultados negativos en los controles.

La segmentación del mechón proporciona mayor información sobre el perfil de consumo. El análisis por segmentos implica efectuar una toma de muestra adecuada, siguiendo los criterios previamente señalados para ello, resaltando

la importancia de alinear correctamente las fibras de pelo durante la toma de muestra e indicar la zona más próxima al cuero cabelludo, para diferenciar la zona proximal de la zona distal del mechón. El análisis de segmentos amplía los campos de aplicación de esta matriz biológica, destacando:

- **Tratamientos de desintoxicación:** En los tratamientos de desintoxicación es necesario realizar un control de seguimiento del tratamiento, lo que implica el análisis de muestras biológicas. El pelo permite que la toma de muestra sea mucho menos invasiva y la periodicidad de los análisis menor que con las matrices biológicas tradicionales, debido a su amplia ventana de detección. Es preferible la realización de un análisis por segmentos, ya que éste permite confirmar el historial de consumo previo, así como el comienzo y mantenimiento del periodo de abstinencia. El perfil esperable en este tipo de análisis, siempre que se haya cumplido correctamente la abstinencia, implica la detección en los segmentos distales del consumo previo y una disminución significativa en las concentraciones encontradas en los segmentos proximales tras el comienzo de la abstinencia. Sin embargo, debe tenerse en cuenta en la interpretación de estos resultados que es posible detectar concentraciones elevadas durante varios meses tras la abstinencia, debido a la diferencia de crecimiento y la distinta fase en la que se encuentran cada una de las fibras del mechón analizado.
- **Control laboral:** La realización de pruebas de drogas y alcohol en el ámbito laboral permite evitar o, al menos, reducir en parte los accidentes en el trabajo, además de aumentar la productividad. En Europa, a diferencia de lo que ocurre en EEUU, no existe una legislación específica para el control del consumo de drogas y alcohol en el lugar de trabajo [178]; si bien, en algunos países europeos y también algunas compañías privadas han establecido criterios para el control de los trabajadores. La muestra de elección en el control del consumo de drogas en este campo es la orina, aunque en los últimos años también se han introducido los controles con fluido oral para minimizar la intromisión en la intimidad de los trabajadores. El pelo se emplea, sobre todo, para el control en la selección previa de personal, en pruebas

aleatorias de consumo y en la prueba de contraanálisis tras un positivo en orina o fluido oral [179,180]. En los dos primeros casos puede emplearse el análisis de un solo segmento para obtener información sobre la presencia o no de consumo y la cronicidad del mismo; mientras que en las pruebas de contraanálisis suele realizarse un análisis por segmentos para validar o no la reclamación del primer análisis y probar la abstinencia durante un cierto periodo de tiempo.

- Control de consumo abusivo de alcohol: El consumo de alcohol está ampliamente aceptado en la mayoría de sociedades, pero causa un gran número de patologías y problemas asociados. El etanol es una sustancia volátil que, como tal, no se incorpora al pelo; por ello, su determinación en esta matriz biológica requiere el uso de otros marcadores de su consumo como los metabolitos minoritarios etilglucurónido (EtG) y ésteres etílicos de los ácidos grasos (FAEEs) [181]. La SoHT ha establecido unos niveles de *cut-off* para estas sustancias en pelo [182], que permiten diferenciar entre individuos con un consumo excesivo y un consumo social, y entre consumidores sociales y abstemios. También ha establecido unos criterios para el análisis, indicando la segmentación del mechón en 2 segmentos de 0-3 cm y de 3-6 cm para una mejor interpretación de los resultados. En general, la presencia de EtG implica un consumo de alcohol, pero su ausencia no puede descartar el consumo. El análisis de los FAEEs sólo permite diferenciar entre consumo excesivo y consumo social. Las concentraciones de estos marcadores en pelo, no obstante, se pueden ver modificadas por tratamientos cosméticos [72,74,76,77,183], que pueden afectar a la interpretación del caso; por ello la SoHT aconseja no usar los resultados de pelo para los marcadores de alcohol de manera aislada, sino en conjunto con los demás factores que intervienen en el caso.
- Control anti-doping: El control del uso de sustancias dopantes en los deportistas se realiza de forma rutinaria en orina. Sin embargo, el empleo del pelo puede resultar de utilidad para determinar aquellas sustancias que se encuentran permanentemente prohibidas, dentro y fuera de la competición, como es el caso de los esteroides

anabolizantes, los cuales incrementan la masa muscular, la fuerza y agresividad, y mejoran la recuperación de los atletas. El uso de segmentos y la amplia ventana de detección de esta muestra permite determinar el historial de uso y la frecuencia. Además, permite diferenciar entre el uso de la nandrolona y otros 19 noresteroides, que en orina presentan el mismo patrón metabólico y, por ello, no permite diferenciarlos [184]. La SoHT estableció un consenso para el uso del pelo como matriz de análisis de agentes dopantes en 1999 [185], en el que se especifica que la toma de muestra y las determinaciones analíticas empleadas deben cumplir los mismos criterios de exigencia que un análisis de orina. Asimismo, en caso de un resultado positivo en orina, un resultado negativo en pelo no puede excluir el positivo previo; pero en caso de un resultado negativo en orina y otro positivo en pelo, el resultado en pelo establecerá la exposición a la sustancia o sustancias durante un periodo de tiempo previo a la toma de muestra de orina.

- Exposición a drogas intraútero: La exposición a drogas, tabaco y/o alcohol durante el embarazo puede causar problemas obstétricos (aumento de abortos y partos prematuros), en el feto (malformaciones y aumento de la mortalidad perinatal), en el neonato (aumento de la mortalidad y morbilidad, alteración de los parámetros neonatales y síndrome de abstinencia) y en su desarrollo posterior (retrasos en el progreso físico y psicológico, dificultades en el aprendizaje e hiperactividad) [186,187]. Por ello, es importante efectuar la identificación de los neonatos expuestos a estas sustancias durante el embarazo lo antes posible, para mejorar el cuidado pre y neonatal, realizando una intervención médica y psicosocial temprana. La exposición se puede evaluar mediante la entrevista a la madre y el análisis de matrices biológicas. Mientras la entrevista materna presenta un carácter subjetivo que infravalora el número de casos, el análisis de matrices biológicas es una medida objetiva y directa de la exposición [188]. Dentro de las matrices biológicas, el meconio se ha establecido como la matriz de elección ya que se forma a partir del segundo trimestre de gestación y se acumula hasta el momento del parto, lo que

permite la determinación de la exposición especialmente el tercer trimestre [188,189]. Sin embargo, en algunos casos el meconio no está disponible para el análisis, ya que puede eliminarse en el útero o durante el parto, o bien después del alta hospitalaria. Además, el meconio refleja el consumo de los últimos meses del embarazo, cuando es en el primer trimestre donde se producen la mayoría de malformaciones; y al ser una matriz acumulativa no permite evaluar el patrón de consumo y su evolución durante la gestación. En cambio, el análisis del pelo materno presenta una ventana de detección similar o mayor a la del meconio, lo que permite evaluar el patrón de consumo durante todo el embarazo y la severidad del mismo. Además con la segmentación del mechón es posible diferenciar el consumo durante los distintos trimestres y su evolución.

- Restitución del permiso de conducción: El uso de drogas y/o alcohol durante la conducción origina un aumento de la mortalidad y morbilidad; así, en torno a un 40% de los conductores muertos en accidente de circulación durante el año 2010 en España mostraron un resultado positivo a estas sustancias en los análisis toxicológicos [190]. La retirada o denegación del permiso de conducción es una medida de intervención de las autoridades, aplicada sobre aquellos conductores reincidentes en el consumo de sustancias estupefacientes o sobre aquellas personas adictas no aptas para la conducción. En estos casos puede ser necesario demostrar abstinencia para obtener o restituir el permiso de conducción y, para ello, pueden emplearse controles médicos que comprueben que se es apto para la conducción y medidas de control analítico que verifiquen la abstinencia durante un determinado periodo de tiempo. La aplicación de estas medidas de control analítico para verificar la abstinencia no es muy habitual ni está regulado en la mayoría de los países de la Unión Europea [184], pero sí se emplea de forma sistemática en Alemania e Italia [191-193]. En estos dos países se regula el uso de la orina y el pelo para realizar el control analítico. La amplia ventana de detección de esta matriz permite el estudio del historial de consumo a largo plazo, a diferencia de la orina, lo que es una

ventaja al reducir el número y la frecuencia de los análisis. En Alemania se analiza el segmento proximal de 0-6 cm, mientras que en Italia segmentos de 0-3 cm y 3-6 cm son analizados para proporcionar una evidencia objetiva de la abstinencia.

- **Análisis postmortem:** El pelo se recoge habitualmente durante la realización de la autopsia y su análisis puede ser útil en el establecimiento de la causa de la muerte, evidenciando los antecedentes de uso de drogas y medicamentos. El análisis de segmentos es, por tanto, necesario para obtener el perfil cronológico de consumo. La determinación mediante el análisis de pelo de un historial de consumo crónico de una droga puede explicar daños y alternaciones fisiológicas observables durante la autopsia o el agravamiento de una enfermedad preexistente hasta causar la muerte [44]. También permite evidenciar el grado y los periodos de uso de drogas que causan tolerancia en consumidores habituales, y pueden originar una sobredosis tras un periodo de abstinencia (como los opioides). El establecimiento de periodos de abstinencia y del grado de tolerancia permite una mejor interpretación de las concentraciones en sangre y de la causa de la muerte. Asimismo, es posible evidenciar mediante el historial de consumo una intoxicación continuada. Además, en los casos postmortem también puede recogerse el pelo con la raíz, lo que proporciona información sobre un envenenamiento agudo [194]. El análisis de las raíces también puede proporcionar información en casos de descomposición avanzada en los que otras matrices no están disponibles. La toma de muestra en casos postmortem debe realizarse bajo unas condiciones especiales como se indicó anteriormente.
- **Sumisión química:** Se denomina sumisión química a la administración a una persona de sustancias psicoactivas que modifican o anulan su voluntad con fines delictivos (generalmente agresión sexual, pero también robos e incapacitaciones) [195]. Sin embargo, también se considera sumisión química al aprovechamiento por parte del agresor de la víctima que ha consumido voluntariamente sustancias incapacitantes [196]. Las principales características de las sustancias empleadas son

solubilidad en medio acuoso, sabor y olor poco apreciables, acción rápida a dosis bajas, vida media corta y efecto de sedación y amnesia [196]. Las más empleadas son fármacos (benzodiazepinas, hipnóticos, sedantes o anestésicos), drogas de abuso (cannabis, éxtasis, LSD, etc) y, muy frecuentemente, alcohol [197]. En este tipo de agresiones, las sustancias empleadas para cometer el delito se administran como dosis única y se eliminan rápidamente del organismo por su vida media corta, además, la víctima suele tardar horas o incluso días en ser consciente de la agresión y, por tanto, en realizar la denuncia. Debido a esto, frecuentemente las matrices biológicas tradicionales, sangre u orina, no están disponibles o no son adecuadas para realizar los análisis toxicológicos. Por ello, la amplia ventana de detección del pelo y el análisis por segmentos del mismo es una herramienta útil en la determinación de la presencia de sustancias psicoactivas en el periodo de la agresión [198]. El pelo se analiza cortándolo en varios segmentos de 2 cm cada uno, correspondientes al momento de la sumisión química y a los meses previos, lo que permite diferenciar el uso de la sustancia como una sola exposición del uso crónico de la misma [184]. Es aconsejable realizar la toma de muestra entre 4 a 6 semanas después de la agresión, y debe tenerse especial cuidado en mantener correctamente alineadas las fibras del mechón de pelo durante la toma de muestra y la segmentación. Sin embargo, la determinación de resultados negativos en el segmento de la muestra de pelo correspondiente al momento de la agresión, no puede descartar la administración de sustancias psicoactivas en dicho periodo.

- Control de adherencia terapéutica a un tratamiento: El incumplimiento terapéutico de un tratamiento farmacológico causa un aumento de la mortalidad y morbilidad de los pacientes. Aunque la sangre suele ser la matriz biológica de elección para determinar la adherencia terapéutica, es posible el uso del pelo en aquellos casos en los que sea necesario un estudio retrospectivo de la adherencia [199]. El análisis de segmentos permite establecer el patrón de consumo y, por tanto, en aquellos casos en los que se observe una fluctuación en las concentraciones de los

1.3. Aplicaciones del análisis de pelo

segmentos consecutivos analizados, podrá establecerse una falta de adherencia al tratamiento.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] United Nations Office on Drugs and Crime. World Drug Report 2014. United Nations publication. Disponible en: https://www.unodc.org/documents/wdr2014/World_Drug_Report_2014_web.pdf [Consultada 30 Octubre 2015].
- [2] Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías. Informe anual 2015. Disponible en: www.emcdda.europa.eu/...cfm/att_228272_ES_TDAT14001ESN.pdf [Consultada 30 Octubre 2015].
- [3] Observatorio Español sobre Drogas. Encuesta domiciliaria sobre alcohol y drogas en España (EDADES) 2013. Disponible en: http://www.pnsd.msssi.gob.es/profesionales/publicaciones/catalogo/catalogoPNSD/publicaciones/pdf/Informe_y_Estadisticas_OEDT_2013.pdf [Consultada 30 Octubre 2015].
- [4] Observatorio Español sobre Drogas. Encuesta domiciliaria sobre alcohol y drogas en España” (EDADES) 2009. Disponible en: <http://www.pnsd.msssi.gob.es/profesionales/sistemasInformacion/informesEstadisticas/pdf/oed-2009.pdf> [Consultada 30 Octubre 2015].
- [5] Observatorio Español sobre Drogas. Encuesta domiciliaria sobre alcohol y drogas en España (EDADES) 2011. Disponible en: <http://www.pnsd.msssi.gob.es/profesionales/sistemasInformacion/informesEstadisticas/pdf/oed2011.pdf> [Consultada 30 Octubre 2015].
- [6] Hillebrand J, Olszewski D, Sedefov R. Legal highs on the Internet. *Subst Use Misuse* (2010) 45:330-340.
- [7] Favretto D, Pascali JP, Tagliaro F. New challenges and innovation in forensic toxicology: Focus on the “New psychoactive substances”. *J Chromatogr A* (2013) 1287:84-95.
- [8] Auwärter V, Dresen S, Weinmann W, Müller M, Pütz M, Ferreirós N. “Spice” and other herbal blends: harmless incense or cannabinoid designer drug? *J Mass Spectrom* (2009) 44(5):832-837.
- [9] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. Thematic paper: Understanding the “Spice phenomenon” (2009). Disponible en:

- <http://www.emcdda.europa.eu/publications/thematic-papers/spice>
[Consultada 30 Octubre 2015].
- [10] Barroso M, Gallardo E. Hair analysis for forensic applications: is the future bright? *Bioanalysis* (2014) 6(1):1-3.
- [11] Nadulski T, Sporkert F, Schnelle M, Stadelmann AM, Roser P, Scheffter T, Pragst F. Simultaneous and sensitive analysis of THC, 11-OH-THC, THC-COOH, CBD, and CBN by GC-MS in plasma after oral application of small doses of THC and cannabis extract. *J Anal Toxicol* (2005) 29:782–789.
- [12] Rook EJ, Hillebrand MJ, Rosing H, van Ree JM, Beijnen JH. The quantitative analysis of heroin, methadone and their metabolites and the simultaneous detection of cocaine, acetylcodeine and their metabolites in human plasma by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* (2005) 824:213–221.
- [13] Wood M, De Boeck G, Samyn N, Morris M, Cooper DP, Maes RA, De Bruijn EA. Development of a rapid and sensitive method for the quantitation of amphetamines in human plasma and oral fluid by LC-MS-MS. *J Anal Toxicol* (2003) 27:78-87.
- [14] Duer WC, Spitz DJ, McFarland S. Relationships between concentrations of cocaine and its hydrolysates in peripheral blood, heart blood, vitreous humor and urine. *J Forensic Sci* (2006) 51:421-425.
- [15] Gunnar T, Mykkänen S, Ariniemi K, Lillsunde P. Validated semiquantitative/quantitative screening of 51 drugs in whole blood as silylated derivatives by gas chromatography-selected ion monitoring mass spectrometry and gas chromatography electron capture detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* (2004) 806:205–219.
- [16] Montenarh D, Hopf M, Maurer HH, Schmidt P, Ewald AH. Detection and quantification of benzodiazepines and Z-drugs in human whole blood, plasma, and serum samples as part of a comprehensive multi-analyte LC-MS/MS approach. *Anal Bioanal Chem* (2014) 406(3):803-818.
- [17] Kristoffersen L, Bugge A, Lundanes E, Slørdal L. Simultaneous determination of citalopram, fluoxetine, paroxetine and their metabolites in plasma and whole blood by high-performance liquid chromatography with

- ultraviolet and fluorescence detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* (1999) 734(2):229-246.
- [18] Ruz J, Fernandez A, Luque de Castro MD, Valcarcel M. Determination of ethanol in human fluids-I. Determination of ethanol in blood. *J Pharm Biomed Anal* (1986) 4(5):545-558.
- [19] Dinis-Oliveira RJ, Carvalho F, Duarte JA, Remiao F, Marques A, Santos A, Magalhaes T. Collection of biological samples in forensic toxicology. *Toxicol Mech Methods* (2010) 20(7):363-414.
- [20] Drummer OH. Forensic toxicology. *EXS* (2010) 100(2):579-603.
- [21] Maurer HH. Analytical toxicology. *EXS* (2010) 100(2):317-337.
- [22] Gallardo E, Queiroz JA. The role of alternative specimens in toxicological analysis. *Biomed Chromatogr* (2008) 22(8):795-821.
- [23] Baumgartner AM, Jones PF, Baumgartner WA, Black CT. Radioimmunoassay of hair for determining opiate-abuse histories. *J Nucl Med* (1979) 20(7):748-752.
- [24] Dolan K, Rouen D, Kimber J. An overview of the use of urine, hair, sweat and saliva to detect drug use. *Drug Alcohol Rev* (2004) 23(2):213-217.
- [25] United Nations International Drug Programme. Guidelines for testing drugs under international control in hair, sweat and saliva. United Nations publication (2001). Disponible en: <http://www.unodc.org/pdf/publications/st-nar-30.pdf> [Consultada 30 Octubre 2015].
- [26] Bosker WM, Huestis MA. Oral fluid testing for drugs of abuse. *Clin Chem* (2009) 55(11):1910-1931.
- [27] Spiehler V. Drugs in saliva. En: Moffat AC, Osselton MD, Widdop B, Watts J (eds.). *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*. Cuarta edición. London, UK: Pharmaceutical Press (2011):308-322.
- [28] Marchei E, Farre M, Pardo R, Garcia-Algar O, Pellegrini M, Pacifici R, Pichini S. Correlation between methylphenidate and ritalinic acid concentrations in oral fluid and plasma. *Clin Chem* (2010) 56(4):585-592.
- [29] Scheidweiler KB, Spargo EA, Kelly TL, Cone EJ, Barnes AJ, Huestis MA. Pharmacokinetics of cocaine and metabolites in human oral fluid and correlation with plasma concentrations after controlled administration. *Ther Drug Monit* (2010) 32(5):628-637.

- [30] Papaseit E, Marchei E, Farre M, Garcia-Algar O, Pacifici R, Pichini S. Concentrations of atomoxetine and its metabolites in plasma and oral fluid from paediatric patients with attention deficit/hyperactivity disorder. *Drug Test Anal* (2013) 5(6):446-452.
- [31] Hsu YC, Chen BG, Yang SC, Wang YS, Huang SP, Huang MH, Chen TJ, Liu HC, Lin DL, Liu RH, Jones AW. Methadone concentrations in blood, plasma, and oral fluid determined by isotope-dilution gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* (2013) 405(12):3921-3928.
- [32] Desrosiers NA, Barnes AJ, Hartman RL, Scheidweiler KB, Kolbrich-Spargo EA, Gorelick DA, Goodwin RS, Huestis MA. Oral fluid and plasma 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and metabolite correlation after controlled oral MDMA administration. *Anal Bioanal Chem* (2013) 405(12):4067-4076.
- [33] Kim I, Barnes AJ, Oyler JM, Schepers R, Joseph RE Jr, Cone EJ, Lafko D, Moolchan ET, Huestis MA. Plasma and oral fluid pharmacokinetics and pharmacodynamics after oral codeine administration. *Clin Chem* (2002) 48(9):1486-1496.
- [34] Schepers RJ, Oyler JM, Joseph RE Jr, Cone EJ, Moolchan ET, Huestis MA. Methamphetamine and amphetamine pharmacokinetics in oral fluid and plasma after controlled oral methamphetamine administration to human volunteers. *Clin Chem* (2003) 49(1):121-132.
- [35] Toennes SW, Steinmeyer S, Maurer HJ, Moeller MR, Kauert GF. Screening for drugs of abuse in oral fluid-correlation of analysis results with serum in forensic cases. *J Anal Toxicol* (2005) 29(1):22-27.
- [36] De Giovanni N, Fucci N. The current status of sweat testing for drugs of abuse: a review. *Curr Med Chem* (2013) 20(4):545-561.
- [37] Moore C, Negrusz A, Lewis D. Determination of drugs of abuse in meconium. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* (1998) 713(1):137-146.
- [38] Bakdash A, Burger P, Goecke TW, Fasching PA, Reulbach U, Bleich S, Hastedt M, Rothe M, Beckmann MW, Pragst F, Kornhuber J. Quantification of fatty acid ethyl esters (FAEE) and ethyl glucuronide (EtG) in meconium from newborns for detection of alcohol abuse in a maternal health evaluation study. *Anal Bioanal Chem* (2010) 396(7):2469-2477.

- [39] Huestis MA, Choo RE. Drug abuse's smallest victims: in utero drug exposure. *Forensic Sci Int* (2002) 128(1-2):20-30.
- [40] Kintz P. Hair analysis. En: Moffat AC, Osselton MD, Widdop B, Watts J (eds.). *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*. Cuarta edición. London, UK: Pharmaceutical Press (2011): 323-333.
- [41] Stenn KS, Paus R. Controls of Hair Follicle Cycling. *Physiol Rev* (2001) 81:449-494.
- [42] Paus R, Cotsarelis G. The biology of hair follicles. *Mechanisms of Disease. New Engl J Med* (1999) 341(7):491-497.
- [43] Balikova, M. Hair analysis for drugs of abuse. Plausibility of interpretation. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* (2005) 149(2):199-207.
- [44] Pragst F, Balikova MA. State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse. *Clin Chim Acta* (2006) 370(1-2):17-49.
- [45] Harkey MR. Anatomy and physiology of hair. *Forensic Sci Int* (1993) 63(1-3):9-18.
- [46] Rapaka R. *Membranes and Barriers: Targeted Drug Delivery*. Monografía National Institute on Drug of Abuse (1995). Disponible en: <https://archives.drugabuse.gov/pdf/monographs/154.pdf> [Consultada 30 Octubre 2015]
- [47] Stenn KS, Paus R. Controls of Hair Follicle Cycling. *Physiol Rev* (2001) 81(1):449-484.
- [48] Van Neste D, LeRoy T, Conil S. Exogen hair characterization in human scalp. *Skin Res and Technol* (2007) 13(4):436-443.
- [49] Higgins C, Westgate GE, Jahoda CA. From telogen to exogen: mechanisms underlying formation and subsequent loss of the hair club fiber. *J Invest Dermatol* (2009) 129(9):2100-2108.
- [50] Milner Y, Sudnik J, Filippi M, Kizoulis M, Kashgarian M, Stenn K. Exogen, shedding phase of the hair growth cycle: characterization of a mouse model. *J Invest Dermatol* (2002) 119(3):639-644.
- [51] Stenn K. Exogen is an active, separately controlled phase of the hair growth cycle. *J Am Acad Dermatol* (2005) 52(2):374-375.
- [52] Shimomura Y, Christiano AM. Biology and Genetics of Hair. *Annu Rev Genomics Hum Genet* (2010) 11:109-132.

- [53] Botchkarev VA, Paus R. Molecular Biology of Hair Morphogenesis: Development and Cycling. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* (2003) 298B (1):164-180.
- [54] Henderson GL. Mechanisms of drug incorporation into hair. *Forensic Sci Int* (1993) 63(1-3):19-29.
- [55] Kronstrand R, Scott K. Drug incorporation into hair. En: Kintz P (ed.) *Analytical and Practical Aspects of Drug Testing in Hair*. Boca Ratón, EEUU: Taylor and Francis (2007):1-23.
- [56] Kintz P. Value of hair analysis in postmortem toxicology. *Forensic Sci Int* (2004) 142(2-3):127-134.
- [57] Huestis MA, Oyler JM, Cone EJ, Wstadik AT, Schoendorfer D, Joseph RE Jr. Sweat testing for cocaine, codeine and metabolites by gas chromatography–mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* (1999) 733(1-2):247-264.
- [58] Cairns T, Kippenberger DJ, Gordon AM. Hair analysis for detection of drugs of abuse. En: Wong SHY, Sunshine I (eds.) *Handbook of Analytical Therapeutic Drug Monitoring and Toxicology*. Boca Ratón, EEUU: CRC Press (1996):237-251.
- [59] Cartmell LW, Aufderhide A, Weems C. Cocaine metabolites in pre-Columbian mummy hair. *J Okla State Med Assoc* (1991) 84(1):11-12.
- [60] Springfield AC, Cartmell LW, Aufderheide AC, Buikstra J, Ho J. Cocaine and metabolites in the hair of ancient Peruvian coca leaf chewers. *Forensic Sci Int* (1993) 63(1-3):269-275.
- [61] Rivera MA, Aufderheide AC, Cartmell LW, Torres CM, Langsjoen O. Antiquity of coca-leaf chewing in the south central Andes: a 3,000 year archaeological record of coca-leaf chewing from northern Chile. *J Psychoactive Drugs* (2005) 37(4):455-458.
- [62] Musshoff F, Rosendahl W, Madea B. Determination of nicotine in hair samples of pre-Columbian mummies. *Forensic Sci Int* (2009) 185(1-3):84-88.
- [63] Baumgartner WA, Hill VA, Bland WH. Hair analysis for drugs of abuse. *J Forensic Sci* (1989) 34:1433-1452.
- [64] Jurado C, Kintz P, Menendez M, Repetto M. Influence of the cosmetic treatment of hair on drug testing. *Int J Legal Med* (1997) 110(3):159-163.

- [65] Skopp G, Potsch L, Moeller MR. On cosmetically treated hair-aspects and pitfalls of interpretation. *Forensic Sci Int* (1997) 84(1-3):43-52.
- [66] Cirimele V, Kintz P, Mangin P. Drug concentrations in human hair after bleaching. *J Anal Toxicol* (1995) 19(5):331-332.
- [67] Yegles M, Marson Y, Wennig R. Influence of bleaching on stability of benzodiazepines in hair. *Forensic Sc Int* (2000) 107(1-3):87-92.
- [68] Baeck S, Han E, Chung H, Pyo M. Effects of repeated hair washing and a single hair dyeing on concentrations of methamphetamine and amphetamine in human hairs. *Forensic Sci Int* (2011) 206:77-80.
- [69] Martins LF, Yegles M, Thieme D, Wenning R. Influence of bleaching on the enantiomeric disposition of amphetamine-type-stimulants in hair. *Forensic Sci Int* (2008) 176:38-41.
- [70] Takayama N, Tanaka S, Kizu R, Hayakawa K. High performance liquid chromatography study on effects of permanent wave, dye and decolorant treatments on methamphetamine and amphetamine in hair. *Biomed Chromatogr* (1999) 13:257-314.
- [71] Pötsch L, Skopp G. Stability of opiates in hair fibers after exposure to cosmetic treatment. *Forensic Sci Int* (1996) 81:95-102.
- [72] Crunelle CL, Yegles M, De Doncker M, Dom G, Cappelle D, Maudens KE, van Nuijs ALN, Covaci A, Neels H. Influence of repeated permanent coloring and bleaching on ethyl glucuronide concentrations in hair from alcohol-dependent patients. *Forensic Sci Int* (2015) 247:18-22.
- [73] Cuypers E, Flinders B, Bosman IJ, Lusthof KJ, Van Asten AC, Tytgat J, Heeren RMA. Hydrogen peroxide reactions on cocaine in hair using imaging mass spectrometry. *Forensic Sci Int* (2014) 242:103-110.
- [74] Morini Luca, Zucchella A, Poletti A, Politi L, Groppi A. Effect of bleaching on ethyl glucuronide in hair: An in vitro experiment. *Forensic Sci Int* (2010) 198(1-3):23-27.
- [75] Pritchett JS, Phinney KW. Influence of chemical straightening on the stability of drugs of abuse in hair. *J Anal Toxicol* (2015) 39:13-16.
- [76] Ettlinger J, Kirchen L, Yegles M. Influence of thermal hair straightening on ethyl glucuronide content in hair. *Drug Test Anal* (2014) 6(1):74-77.
- [77] Kerekes I, Yegles M. Coloring, Bleaching, and Perming: Influence on EtG Content in Hair. *Ther Drug Monit* (2013) 35(4):527-529.

- [78] Cooper GAA, Kronstrand R, Kintz P. Society of Hair Testing guidelines for drug testing in hair. *Forensic Sci Int* (2012) 218(1-3):20-24.
- [79] Society of Hair Testing. Recommendations for hair testing in forensic cases. *Forensic Sci Int* (1997) 84:3–6.
- [80] Cone EJ. Legal, workplace, and treatment drug testing with alternate biological matrices on a global scale. *Forensic Sci Int* (2001) 121:7-15.
- [81] Society of Hair Testing. Recommendations for hair testing in forensic cases. *Forensic Sci Int* (2004) 145:83-84.
- [82] LeBeau MA, Montgomery MA, Brewer JD. The role of variations in growth rate and sample collection on interpreting results of segmental analyses of hair. *Forensic Sci Int* (2011) 210:110-116.
- [83] Kintz P. Issues About Axial Diffusion During Segmental Hair Analysis. *Ther Drug Monit* (2013) 35:408-410.
- [84] Thieme D, Baumer C, Sachs H, Teske J. Screening and long-term retrospection for psychoactive drugs in presumptive drug-facilitated crimes using segmented single hairs. *Drug Test Anal* (2013) 5(9-10):736-740.
- [85] Musshoff F, Arrey T, Strupat K. Determination of cocaine, cocaine metabolites and cannabinoids in single hairs by MALDI Fourier transform mass spectrometry-preliminary results. *Drug Test Anal* (2013) 5(5):361-365.
- [86] Wainhaus SB, Tzanani N, Dagan S, Miller ML, Amirav A. Fast analysis of drugs in a single hair. *J Am Soc Mass Spectrom* (1998) 9(12):1311-1320.
- [87] Blanka DL, Kidwell DA. Decontamination procedures for drugs of abuse in hair: are they sufficient? *Forensic Sci Int* (1995) 70:13-38.
- [88] Kintz P. Interlaboratory comparison of quantitative determination of drug in hair samples. *Forensic Sci Int* (1995) 70:105-109.
- [89] Jurado C, Giménez MP, Menéndez M, Repetto M. Simultaneous quantification of opiates, cocaine and cannabinoids in hair. *Forensic Sci Int* (1995) 70:165-174.
- [90] Paulsen RB, Wilkins DG, Slawson MH, Shaw K, Rollins DE. Effect of four laboratory decontamination procedures on the quantitative determination of cocaine and metabolites in hair by HPLC-MS. *J Anal Toxicol* (2001) 25:490-496.

- [91] Balikova MA, Habrdova V. Hair analysis for opiates: Evaluation of washing and incubation procedures. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* (2003) 789(1):93-100.
- [92] Schaffer M, Hill V, Cairns T. Hair analysis for cocaine: The requirement for effective wash procedures and effects of drug concentration and hair porosity in contamination and decontamination. *J Anal Toxicol* (2005) 29(5):319-326.
- [93] Kintz P, Villain M. Hair in Forensic Toxicology with a special focus on drug-facilitated crimes. En: Tobin DJ (ed.) *Hair in Toxicology. An important Bio-monitor*. Cambridge, UK: The Royal Society of Chemistry (2005):89-103.
- [94] Baumgartner WA, Hill VA. Hair analysis for drugs of abuse: decontamination issues. En: Sunshine I (ed.) *Recent Developments in Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology*. New York, EEUU: Marcel Dekker (1992):577-597.
- [95] Tsanaclis L, Wicks JFC. Differentiation between drug use and environmental contamination when testing for drugs in hair. *Forensic Sci Int* (2008) 176:19-22.
- [96] Cairns T, Hill V, Schaffer M, Thistle W. Removing and identifying drug contamination in the analysis of human hair. *Forensic Sci Int* (2004) 145(2-3): 97-108-
- [97] Cone EJ, Yousefnejad D, Darwin WD, Maguire T. Testing human hair for drugs of abuse: II. Identification of unique cocaine metabolites in hair of drug abusers and evaluation of decontamination procedures. *J Anal Toxicol* (1991) 15:250-255.
- [98] Cairns T, Hill V, Schaffer M, Thistle W. Levels of cocaine and its metabolites in washed hair of demonstrated cocaine users and workplace subjects. *Forensic Sci Int* (2004) 145:175-181.
- [99] Janzen K. Concerning norcocaine, ethylbenzoylecgonine, and the identification of cocaine use in human hair. *J Anal Toxicol* (1992) 16:402.
- [100] Hold KM, Wilkins DG, Rollins DE, Joseph RE Jr, Cone EJ. Simultaneous quantitation of cocaine, opiates, and their metabolites in human hair by positive ion Chemicals ionization gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr Sci* (1998) 36:125-130.

- [101] Uhl M, Sachs H. Cannabinoids in hair: strategy to prove marijuana/hashish consumption. *Forensic Sci Int* (2004) 145:143-147.
- [102] Rothe M, Pragst F, Spiegel K, Harrach T, Fischer K, Kunkel J. Hair concentrations and self-reported abuse history of 20 amphetamine and ecstasy users. *Forensic Sci Int* (1997) 89:111-128.
- [103] Stout PR, Ropero-Miller JD, Baylor MR, Mitchell JM. External contamination of hair with cocaine: evaluation of external cocaine contamination and development of performance-testing materials. *J Anal Toxicol* (2006) 30(8):490-500.
- [104] Cone EJ, Darwin WD, Wang WL. The occurrence of cocaine, heroin and metabolites in hair of drug abusers. *Forensic Sci Int* (1993) 63:55-68.
- [105] Pichini S, Pacifici R, Altieri I, Pellegrini M, Zuccaro P. Determination of opiates and cocaine in hair as trimethylsilyl derivatives using gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol* (1999) 23:343-348.
- [106] Bush DM. The U.S. mandatory guidelines for federal workplace drug testing programs: current status and future considerations. *Forensic Sci Int* (2008) 174(2-3):111-119.
- [107] Musshoff F, Madea B. New trends in hair analysis and scientific demands on validation and technical notes. *Forensic Sci Int* (2007) 165:204-215.
- [108] Albermann ME, Musshoff F, Aengenheister L, Madea B. Investigations on the influence of different grinding procedures on measured ethyl glucuronide concentrations in hair determined with an optimized and validated LC-MS/MS method. *Anal Bioanal Chem* (2012) 403(3):769-776.
- [109] Aqai P, Stolker AAM, Lasaroms JJP. Effect of sample pre-treatment on the determination of steroid esters in hair of bovine calves. *J Chromatogr A* (2009) 1216(46):8233-8239.
- [110] Eser HP, Pötsch L, Skopp G, Moeller MR. Influence of sample preparation on analytical results: drug analysis [GC/MS] on hair snippets versus hair powder using various extraction methods. *Forensic Sci Int* (1997) 84(1-3):271-279.
- [111] Chiarotti M. Overview on extraction procedures. *Forensic Sci Int* (1993) 63(1-3):161-170.

- [112] Belivanis S, Tzatzarakis MN, Vakonaki E, Kovatsi L, Mantsi M, Alegakis A, Kavvalakis MP, Vynias D, Tsatsakis AM. Buprenorphine and nor-buprenorphine levels in head hair samples from former heroin users under Suboxone treatment. *Drug Test Anal* (2014) 6(S1):93-100.
- [113] Kim J, In S, Park Y, Park M, Kim E, Lee S. Deposition of JWH-018, JWH-073 and their metabolites in hair and effect of hair pigmentation. *Anal Bioanal Chem* (2013) 405(30):9769-9778.
- [114] Pinho S, Oliveira A, Costa I, Gouveia CA, Carvalho F, Moreira RF, Dinis-Oliveira RJ. Simultaneous quantification of tramadol and O-desmethyltramadol in hair samples by gas chromatography-electron impact/mass spectrometry. *Biomed Chromatogr* (2013) 27(8):1003-1011.
- [115] Roth N, Moosmann B, Auwaerter V. Development and validation of an LC-MS/MS method for quantification of Δ^9 -tetrahydrocannabinolic acid A (THCA-A), THC, CBN and CBD in hair. *J Mass Spectrom* (2013) 48(2):227-233.
- [116] Kim J, Lee S, In S, Choi H, Chung H. Validation of a simultaneous analytical method for the detection of 27 benzodiazepines and metabolites and zolpidem in hair using LC-MS/MS and its application to human and rat hair. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* (2011) 879(13-14):878-886.
- [117] Barroso M, Dias M, Vieira DN, Lopez-Rivadulla M, Queiroz JA. Simultaneous quantitation of morphine, 6-acetylmorphine, codeine, 6-acetylcodeine and tramadol in hair using mixed-mode solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* (2010) 396(8):3059-3069.
- [118] Frison G, Favretto D, Vogliardi S, Terranova C, Ferrara SD. Quantification of Citalopram or Escitalopram and Their Demethylated Metabolites in Neonatal Hair Samples by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Ther Drug Monit* (2008) 30(4):467-473.
- [119] Rambaud L, Monteau F, Deceuninck Y, Bichon E, Andre F, Le Bizec B. Development and validation of a multi-residue method for the detection of a wide range of hormonal anabolic compounds in hair using gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta* (2007) 586(1-2):93-104.

- [120] Kim JY, Suh S III, Paeng K, In MK. Determination of dextromethorphan and its metabolite dextrorphan in human hair by gas chromatography-mass spectrometry. *Chromatographia* (2004) 60(11-12):703-707.
- [121] Scheidweiler KB, Huestis MA. Simultaneous Quantification of Opiates, Cocaine, and Metabolites in Hair by LC-APCI-MS/MS. *Anal Chem* (2004) 76(15):4358-4363.
- [122] Paterson S, McLachlan-Troup N, Cordero R, Dohnal M, Carman S. Qualitative screening for drugs of abuse in hair using GC-MS. *J Anal Toxicol* (2001) 25(3):203-208.
- [123] Bucelli F, Fratini A, Bavazzano P, Comodo N. Quantification of drugs of abuse and some stimulants in hair samples by liquid chromatography-electrospray ionization ion trap mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* (2009) 877(31):3931-3936.
- [124] Maublanc J, Dulaurent S, Morichon J, Lachatre G, Gaulier JM. Identification and quantification of 35 psychotropic drugs and metabolites in hair by LC-MS/MS: application in forensic toxicology. *Int J Legal Med* (2015) 129(2):259-268.
- [125] Miller EI, Wylie FM, Oliver JS. Simultaneous detection and quantification of amphetamines, diazepam and its metabolites, cocaine and its metabolites, and opiates in hair by LC-ESI-MS-MS using a single extraction method. *J Anal Toxicol* (2008) 32(7):457-469.
- [126] Romolo FS, Rotolo MC, Palmi I, Pacifici R, Lopez A. Optimized conditions for simultaneous determination of opiates, cocaine and benzoylecgonine in hair samples by GC-MS. *Forensic Sci Int* (2003) 138(1-3):17-26.
- [127] Musshoff F, Madea B. Analytical pitfalls in hair testing. *Anal Bioanal Chem* (2007) 388(7):1475-1494.
- [128] Jakobsson G, Kronstrand R. Segmental analysis of amphetamines in hair using a sensitive UHPLC-MS/MS method. *Drug Test Anal* (2014) 6(S1):22-29.
- [129] Elian AA, Hackett J, Donovan KT. Analysis of amphetamines and synthetic cathinones in hair samples using LC-tandem mass spectrometry and solid-phase extraction. *LCGC North America* (2014) 32(3):458-465.
- [130] Han E, Choi H, Lee S, Chung H, Song JM. A comparative study on the concentrations of 11-nor- Δ^9 -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid

- (THCCOOH) in head and pubic hair. *Forensic Sci Int* (2011) 212(1-3):238-241.
- [131] Sachs H, Dressler U. Detection of THCCOOH in hair by MSD-NCI after HPLC clean-up. *Forensic Sci Int* (2000) 107(1-3):239-247.
- [132] Chetiyankornkul T, Toriba A, Kizu R, Kimura K, Hayakawa K. Hair analysis of nicotine and cotinine for evaluating tobacco smoke exposure by liquid chromatography-mass spectrometry. *Biomed Chromatogr* (2004) 18(9):655-661.
- [133] Man CN, Ismail S, Harn GL, Lajis R, Awang R. Determination of hair nicotine by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* (2009) 877(3):339-342.
- [134] Segura J, Pichini S, Roig R, Ortuno J, Garcia O, Sunyer J, Gonzalez M, Puig C. Hair analysis of nicotine and cotinine for evaluating smoking intake and exposure during pregnancy: a pilot study. *Revista de Toxicología* (2000) 17(1):27-32.
- [135] Gambelunghe C, Somavilla M, Ferranti C, Rossi R, Aroni K, Manes N, Bacci M. Analysis of anabolic steroids in hair by GC/MS/MS. *Biomed Chromatogr* (2007) 21(4):369-375.
- [136] Pragst F, Rothe M, Hunger J, Thor S. Structural and concentration effects on the deposition of tricyclic antidepressants in human hair. *Forensic Sci Int* (1997) 84(1-3):225-236.
- [137] Poletti A, Cone EJ, Gorelick DA, Huestis MA. Incorporation of methamphetamine and amphetamine in human hair following controlled oral methamphetamine administration. *Anal Chim Acta* (2012) 726:35-43.
- [138] Miguez-Framil M, Moreda-Pineiro A, Bermejo-Barrera P, Lopez P, Tabernero MJ, Bermejo AM. Improvements on enzymatic hydrolysis of human hair for illicit drug determination by gas chromatography/mass spectrometry. *Anal Chem* (2007) 79(22):8564-8570.
- [139] Fernandez P, Leon M, Bouzas AM, Bermejo AM, Tabernero MJ. Use of high-performance liquid chromatography for the determination of cocaine and benzoylecgonine in human hair. *J Liq Chromatogr R T* (2003) 26(12):2003-2012.

- [140] Kronstrand R, Nystrom I, Josefsson M, Hodgins S. Segmental ion spray LC-MS-MS analysis of benzodiazepines in hair of psychiatric patients. *J Anal Toxicol* (2002) 26(7):479-484.
- [141] Boumba VA, Ziavrou KS, Vougiouklakis T. Hair as a biological indicator of drug use, drug abuse or chronic exposure to environmental toxicants. *Int J Toxicol* (2006) 25:143-163.
- [142] Kim J, Ji D, Kang S, Park M, Yang W, Kim E, Choi H, Lee S. Simultaneous determination of 18 abused opioids and metabolites in human hair using LC-MS/MS and illegal opioids abuse proven by hair analysis. *J Pharmaceut Biomed* (2014) 89:99-105.
- [143] Huang DK, Liu C, Huang MK, Chien C-S. Simultaneous determination of morphine, codeine, 6-acetylmorphine, cocaine and benzoylecgonine in hair by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Sp* (2009) 23(7):957-962.
- [144] Broecker S, Herre S, Pragst F. General unknown screening in hair by liquid chromatography-hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC-QTOF-MS). *Forensic Sci Int* (2012) 218(1-3):68-81.
- [145] Jurado C. Hair analysis for cocaine. Kintz P (ed.) *Analytical and Practical Aspects of Drug Testing in Hair*. Boca Ratón, EEUU: Taylor and Francis (2007):95-125.
- [146] Wada M, Ikeda R, Kuroda N, Nakashima K. Analytical methods for abused drugs in hair and their applications. *Anal Bioanal Chem* (2010) 397:1039-1067.
- [147] Vogliardi S, Tucci M, Stocchero G, Ferrara SD, Favretto D. Sample preparation methods for determination of drugs of abuse in hair samples: A review. *Anal Chim Acta* (2015) 857:1-27.
- [148] Zang Z, Zang JY, Pawliszyn J. Solid phase microextraction. *Anal Chem* (1994) 66:844A-853A.
- [149] Sporkert F, Pragst F. Use of headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) in hair analysis for organic compounds. *Forensic Sci Int* (2000) 107(1-3):129-148.
- [150] Musshoff F, Junker HP, Lachenmeier DW, Kroener L, Madea B. Fully automated determination of cannabinoids in hair samples using

- headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J Anal Toxicol* (2002) 26:554-560.
- [151] Nadulski T, Pragst F. Simple and sensitive determination of Delta (9)-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and cannabinol in hair by combined silylation, headspace solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* (2007) 846:78-85.
- [152] Strano-Rossi S, Chiarotti M. Solid-phase microextraction for cannabis analysis in hair and its possible application to other drugs. *J Anal Toxicol* (1999) 23:7-10.
- [153] Sporkert F, Pragst F. Determination of methadone and its metabolites EDDP and EMDP in human hair by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* (2000) 746(2):255-264.
- [154] Lucas ACS, Bermejo AM, Tabernero MJ, Fernández P, Strano-Rossi S. Use of solid-phase microextraction (SPME) for the determination of methadone and EDDP in human hair by CG-MS. *Forensic Sci Int* (2000) 107:225-232.
- [155] Koide I, Noguchi O, Okada K, Yokoyama A, Oda H, Yamamoto S, Kataoka H. Determination of amphetamine and methamphetamine in human hair by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* (1998) 707:99-104.
- [156] Musshoff F, Junker HP, Lachenmeier DW, Kroener L, Madea B. Fully Automated Determination of Amphetamines and Synthetic Designer Drugs in Hair Samples Using Headspace Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography- Mass Spectrometry. *J Chromatogr Sci* (2002) 40:359-364.
- [157] Gentili S, Torresi A, Marsili R, Chiarotti M, Macchia T. Simultaneous detection of amphetamine-like drugs with headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* (2002) 780:183-192.
- [158] Pichon V. Selective sample treatment using molecularly imprinted polymers. *J Chromatogr A* (2007) 1152(1-2):41-53.

- [159] Thibert V, Legeay P, Chapuis-Hugon F, Pichon V. Synthesis and characterization of molecularly imprinted polymers for the selective extraction of cocaine and its metabolite benzoylecgonine from hair extract before LC-MS analysis. *Talanta* (2012) 15(88):412-419.
- [160] Harun N, Anderson RA, Cormack PAG. Analysis of ketamine and norketamine in hair samples using molecularly imprinted solid-phase extraction (MISPE) and liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Anal Bioanal Chem* (2010) 396(7):2449-2459.
- [161] Chapuis-Hugon F, Cruz-Vera M, Savane R, Ali WH, Valcarcel M, Deveaux M, Pichon V. Selective sample pretreatment by molecularly imprinted polymer for the determination of LSD in biological fluids. *J Sep Sci* (2009) 32(19):3301-3309.
- [162] Yang J, Hu Y, Cai JB, Zhu XL, Su QD, Hu YQ, Liang FX. Selective hair analysis of nicotine by molecular imprinted solid-phase extraction: An application for evaluating tobacco smoke exposure. *Food Chem Toxicol* (2007) 45(6):896-903.
- [163] Ariffin MM, Miller EI, Cormack PAG, Anderson RA. Molecularly imprinted solid-phase extraction of diazepam and its metabolites from hair samples. *Anal Chem* (2007) 79(1):256-262.
- [164] Agius R, Nadulski T. Utility of ELISA screening for the monitoring of abstinence from illegal and legal drugs in hair and urine. *Drug Test Anal* (2014) 6(S1):101-109.
- [165] Cheong JC, Suh S III, Ko BJ, Lee J II, Kim JY, Suh YJ, In MK. Screening Method for the Detection of Methamphetamine in Hair Using Fluorescence Polarization Immunoassay. *J Anal Toxicol* (2013) 37(4):217-221.
- [166] Moore C, Marinetti L, Coulter C, Crompton K. Analysis of pain management drugs, specifically fentanyl, in hair: Application to forensic specimens. *Forensic Sci Int* (2008) 176(1):47-50.
- [167] Cirimele V, Etienne S, Villain M, Ludes B, Kintz P. Evaluation of the One-Step ELISA kit for the detection of buprenorphine in urine, blood and hair specimens. *Forensic Sci Int* (2004) 143:153-156.
- [168] Cooper G, Wilson L, Reid C, Baldwin D, Hand C, Spiehler V. Validation of the Cozart microplate ELISA for detection of opiates in hair. *J Anal Toxicol* (2003) 27:581-586.

- [169] Spiehler V. Hair analysis by immunological methods from the beginning to 2000. *Forensic Sci Int* (2000) 107:249-259.
- [170] Segura J, Stramesi C, Redon A, Ventura M, Sanchez CJ, Gonzalez G, San L, Montagna M. Immunological screening of drugs of abuse and gas chromatographic-mass spectrometric confirmation of opiates and cocaine in hair. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* (1999) 724:9-21.
- [171] Gamaleya N, Tagliaro F, Parshin A, Vrublevskii A, Bugari G, Dorizzi R, Ghielmi S, Marigo M. Immune response to opiates: new findings in heroin addicts investigated by means of an original enzyme immunoassay and morphine determination in hair. *Life Sci* (1993) 53(2):99-105.
- [172] Kintz P, Ludes B, Mangin P. Detection of drugs in human hair using Abbott ADx, with confirmation by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). *J Forensic Sci* (1992) 37(1):328-331.
- [173] Li DX, Gan L, Bronja A, Schmitz OJ. Gas chromatography coupled to atmospheric pressure ionization mass spectrometry (GC-API-MS): Review. *Anal Chim Acta* (2015) 891:43-61.
- [174] Bogusz MJ. Liquid chromatography-mass spectrometry as a routine method in forensic sciences: a proof of maturity. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* (2000) 748:3-19.
- [175] Klette KL, Horn CK, Stout PR, Anderson CJ. LC-mS analysis of human urine specimens for 2-oxo-3-hydroxy LSD: method validation for potential interferants and stability study of 2-oxo-3-hydroxy LSD under various storage conditions. *J Anal Toxicol* (2002) 26:193-200.
- [176] Weinmann W, Muller C, Vogt S, Frei A. LC-MS-MS analysis of the neuroleptics clozapine, flupentixol, haloperidol, penfluridol, thioridazine, and zuclopenthixol in hair obtained from psychiatric patients. *J Anal Toxicol* (2002) 26(5):303-307.
- [177] Thieme D, Sachs H. Improved screening capabilities in forensic toxicology by application of liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta* (2003) 492(1-2):171-186.
- [178] Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías. Legal status of drug testing in the workplace. Disponible en: <http://eldd.emcdda.europa.eu/html.cfm/index16901EN.html> [Consultada 30 Octubre 2015].

- [179] Caplan YH, Goldberg BA. Alternative specimens for workplace drug testing. *J Anal Toxicol* (2001) 25:396-399.
- [180] Agius R, Kintz P. Guidelines for European workplace drug and alcohol testing in hair. *Drug Test and Anal* (2010) 2:367-376.
- [181] Cabarcos P, Alvarez I, Tabernero MJ, Bermejo AM. Determination of direct alcohol markers: a review. *Anal Bioanal Chem* (2015) 407(17):4907-4925.
- [182] Kintz P. Consensus of the Society of Hair Testing on hair testing for chronic excessive alcohol consumption 2011. *Forensic Sci Int* (2012) 218(1-3):2.
- [183] Gareri J, Appenzeller B, Walasek P, Koren G. Impact of hair-care products on FAEE hair concentrations in substance abuse monitoring. *Anal Bioanal Chem* (2011) 400(1):183-188.
- [184] Kintz P, Villain M, Cirimele V. Hair analysis for drug detection. *Ther Drug Monit* (2006) 28(3):442-446.
- [185] Society of Hair Testing. Consensus of the Society Hair Testing on hair testing for doping agents. *Forensic Sci Int* (2000) 107:3.
- [186] Keegan J, Parva M, Finnegan M, Gerson A, Belden M. Addiction in pregnancy. *J Addict Dis* (2010) 29(2):175–191.
- [187] Shankaran S, Lester BM, Das A, Bauer CR, Bada HS, Lagasse L, Higgins R. Impact of maternal substance use during pregnancy on childhood outcome. *Semin Fetal Neonatal Med* (2007) 12(2):143-150.
- [188] Gray T, Huestis M. Bioanalytical procedures for monitoring in utero drug exposure. *Anal Bioanal Chem* (2007) 388:1455-1465.
- [189] Lozano J, Garcia-Algar O, Vall O, de la Torre R, Scaravelli G, Pichini S. Biological matrices for the evaluation of in utero exposure to drugs of abuse. *Ther Drug Monit* (2007) 29(6):711-734.
- [190] Gómez-Talegón T, Fierro I, González-Luque JC, Colás M, López-Rivadulla M, Álvarez FJ. Prevalence of psychoactive substances, alcohol, illicit drugs, and medicines, in Spanish drivers: A roadside study. *Forensic Sci Int* (2012) 223:106-113.
- [191] Tagliaro F, Valentini R, Manetto G, Crivellente F, Carli G, Marigo M. Hair analysis by using radioimmunoassay, high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis to investigate chronic

- exposure to heroin, cocaine and/or ecstasies in applicants for driving licenses. *Forensic Sci Int* (2000) 107(1-3):121-128.
- [192] Montagna M, Stramesi C, Vignali C, Groppi A, Polletini A. Simultaneous hair testing for opiates, cocaine, and metabolites by GC-MSMS: a survey of applicants for driving licenses with a history of drug use. *Forensic Sci Int* (2000) 107:157-167.
- [193] Sachs H. Hair analysis as a basic for driving ability examination. *Toxicorama* (1996) 6:11-17.
- [194] Nakahara Y, Kikura R, Yasuhara M, Mukai T. Hair analysis for Drug Abuse XIV. Identification of substances causing acute poisoning using hair root: I. Methamphetamine. *Forensic Sci Int* (1999) 84:157-164.
- [195] LeBeau MA. Guidance for improved detection of drugs used to facilitate crimes. *Ther Drug Monit* (2008) 30(2):229-233.
- [196] López-Rivadulla M, Cruz A, Quintela O, de Castro A, Concheiro M, Bermejo A, Jurado C. Sumisión química: antecedentes, situación actual, y perspectivas. protocolos de actuación para estudios multicéntricos. *Revista de Toxicología* (2005) 22(Suplemento).
- [197] Kintz P. Bioanalytical procedures for detection of chemical agents in hair in the case of drug-facilitated crimes. *Anal Bioanal Chem* (2007) 388(7):1467-1474.
- [198] Scott KS. The use of hair as a toxicological tool in DFC casework. *Sci Justice* (2009) 49(4):250-253.
- [199] Beumer JH, Bosman IJ, Maes RA. Hair as a biological specimen for therapeutic drug monitoring. *Int J Clin Pract* (2001) 55:353-357.

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El consumo de drogas representa un grave problema sanitario a nivel mundial. En nuestra sociedad este problema queda constatado por la elevada prevalencia de consumo tanto de las sustancias de abuso legales, fundamentalmente alcohol y tabaco, como para las drogas de abuso ilegales, como el cannabis y la cocaína. A estas sustancias de abuso clásicas se han unido en los últimos años nuevas drogas cuyo consumo y distribución no están regulados, pero que presentan efectos psicoactivos similares a los de las drogas tradicionales, por lo que son empleados como sustitutos “legales” de las mismas. También es bien conocido y frecuente el patrón de policonsumo entre los usuarios de sustancias de abuso, con el consiguiente consumo de varias de estas sustancias psicoactivas de forma simultánea durante el mismo periodo de tiempo. Todo ello genera la necesidad de disponer de métodos analíticos multianalito sensibles y específicos en los laboratorios de Toxicología que permitan la determinación de las principales drogas y fármacos de abuso tradicionales, pero también de estas sustancias emergentes, en las distintas matrices biológicas.

La utilización de las matrices biológicas alternativas ha aumentado considerablemente en los últimos años, ya que permiten complementar la información obtenida con el análisis de las matrices biológicas tradicionales (sangre y orina) al presentar unas ventanas de detección diferentes a las de estas matrices, y además posibilitan una toma de muestra menos invasiva y más sencilla. Entre las matrices alternativas destaca el pelo como una de las más utilizadas en el ámbito de la Toxicología Clínica y Forense, ya que permite realizar un estudio retrospectivo del consumo gracias a su amplia ventana de detección, de meses o incluso años. Asimismo, esta matriz biológica permite establecer el perfil cronológico de consumo mediante la segmentación de la muestra de pelo. Otras ventajas de la misma son su toma de muestra no invasiva, que no necesita ser realizada por personal sanitario, y que tampoco requiere medidas especiales para su almacenamiento y conservación. Sin embargo, los métodos analíticos necesarios para determinar drogas de abuso y fármacos en pelo deben ser lo suficientemente sensibles para detectar las bajas concentraciones de estas sustancias y sus metabolitos, generalmente del orden de los pg/mg.

En los últimos años se ha incrementado el uso del pelo en numerosos ámbitos, ya previamente destacados en la Introducción. Sin embargo, el análisis de muestras de pelo requiere de unas consideraciones especiales que afectan a todo el proceso, incluyendo la toma de muestra, la segmentación del mechón, la eliminación de la contaminación externa o la extracción de los analitos de la matriz sólida. Todas estas etapas son críticas para la obtención de unos resultados analíticos válidos y una correcta interpretación de los mismos.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, los objetivos de esta Tesis Doctoral han sido los siguientes:

1. Objetivos generales:

- a. Desarrollar métodos analíticos multianalito que permitan la determinación simultánea de varios grupos de sustancias de interés toxicológico, empleando la misma alícuota de pelo y con una sensibilidad adecuada para, como mínimo, satisfacer los *cut-offs* recomendados por la SoHT.
- b. Analizar los factores que influyen en la interpretación de los resultados en pelo.
- c. Explorar la aplicación del análisis de pelo a la detección de la exposición intraútero a sustancias de abuso, fármacos y alcohol.

2. Objetivos específicos:

- a. Desarrollar y validar un método de *screening* y confirmación para la determinación de las principales drogas de abuso (opioides, cocaína y su principal metabolito, cannabis, anfetaminas, LSD y ketamina) y fármacos de uso común (benzodiazepinas, antidepresivos e hipnóticos) mediante LC-MSMS.
- b. Desarrollar y validar un método de confirmación para la determinación de anfetaminas clásicas (anfetamina, metanfetamina, MDMA y MDA) y drogas emergentes con efectos estimulantes como catinonas y piperazinas sintéticas (metilona, mecedrona, mefedrona, 3,4-metilendioxiptovalerona o MDPV, 4-fluorometcatinona, 4-fluorometanfetamina, 1-(3-clorofenil)piperazina o mCPP, y 3-trifluorometilfenilpiperazina o

TFMPP), así como los fármacos trazodona y fenazona (para diferenciar consumo lícito de ilícito de mCPP, ya que ambos compuestos producen esta piperazina sintética como metabolito) mediante LC-MSMS

- c. Evaluar el efecto de la contaminación externa y de los tratamientos cosméticos en la interpretación de resultados de muestras de pelo de casos reales analizados en el periodo de desarrollo de esta Tesis Doctoral.
- d. Estudiar la utilidad del análisis de cabello materno para detectar la exposición a drogas y fármacos intraútero, en comparación con la entrevista materna, y con el análisis de otras muestras biológicas (meconio, placenta y cordón umbilical).
- e. Investigar la correlación entre los resultados analíticos de pelo materno con los parámetros clínicos neonatales.

3. PUBLICACIONES

ARTÍCULO 1

**Target screening and confirmation of 35 licit and illicit drugs
and metabolites in hair by LC-MSMS**

Elena Lendoiro, Óscar Quintela, Ana de Castro, Angelines Cruz,
Manuel López-Rivadulla, Marta Concheiro

Forensic Science International (2012) 217:207-215

DOI: [10.1016/j.forsciint.2011.11.006](https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2011.11.006)

ISSN: 0379-0738

Resumen: Se ha desarrollado y validado completamente un método de *screening* dirigido en 50 mg de pelo, empleando cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MSMS) para 35 compuestos (Δ 9-tetrahydrocannabinol (THC), morfina, 6-monoacetilmorfina, codeína, metadona, fentanilo, anfetamina, metanfetamina, 3,4-metilendioxfanfetamina, 3,4-metilendioximetanfetamina, benzoilecgonina, cocaína, dietilamida de ácido lisérgico, ketamina, escopolamina, alprazolam, bromazepam, clonazepam, diazepam, flunitrazepam, 7-aminoflunitrazepam, lorazepam, lormetazepam, nordiazepam, oxazepam, tetrazepam, triazolam, zolpidem, zopiclona, amitriptilina, citalopram, clomipramina, fluoxetina, paroxetina y venlafaxina). La descontaminación del pelo se realizó con diclorometano, y la incubación con 2 mL de acetonitrilo a 50°C durante toda la noche. El procedimiento de extracción se realizó en dos pasos, en primer lugar una extracción líquido-líquido con una mezcla de hexano:acetato de etilo (55:45, v:v), y en segundo lugar una extracción en fase sólida (con cartuchos Strata-X). La separación cromatográfica se realizó con una columna Atlantis T3 (2,1 mm x 100 mm, 3 μ m) y como fases móviles se emplearon acetonitrilo y formiato amónico a pH 3, con un tiempo total de análisis de 32 minutos, Se monitorizó una transición por compuesto en modo MRM. Para confirmar los resultados positivos, se realizó una segunda inyección monitorizando 2 transiciones. El método fue específico (sin interferencias endógenas, n= 9); el LOD fue 0,2-50 pg/mg y el LOQ 0,5-100 pg/mg; la linealidad osciló entre 0,5-100 a 2000-20000 pg/mg; la imprecisión fue <15%; la recuperación analítica 85-115%; la eficacia de la extracción 4,1-85,6%; y la eficacia total del proceso 2,5-207,7%; 27 compuestos mostraron supresión iónica (hasta un -86,2%), 4 mostraron aumento de la señal (hasta un 647,1%), y 4 no mostraron ningún efecto matriz; los compuestos mostraron buena estabilidad tras 24-48 horas en el inyector. El método se aplicó al análisis de 17 muestras de casos forenses. En conclusión, un método sensible y específico de *screening* dirigido fue desarrollado y validado para 35 compuestos en 50 mg de pelo, incluyendo drogas de abuso (THC, cocaína, opiáceos y anfetaminas) y fármacos (benzodiacepinas y antidepresivos), asegurando valores de *cut-off* menores a los recomendados por la asociación internacional de análisis de pelo (*Society of Hair Testing*).

[http://www.fsijournal.org/article/S0379-0738\(11\)00541-X/fulltext](http://www.fsijournal.org/article/S0379-0738(11)00541-X/fulltext)





ARTÍCULO 2

Hair analysis of amphetamine-type-stimulant (ATS) drugs,
including synthetic cathinones and piperazines, by LC-MSMS

Elena Lendoiro, Cristian Jiménez-Morigosa, Angelines Cruz, Mario
Páramo, Manuel López-Rivadulla, Ana de Castro

Drug Testing and Analysis (2015)

En revisión

ISSN: 1942-7611

Resumen: Los estimulantes tipo anfetamina (ATS) son el segundo grupo de sustancias ilícitas más consumidas a nivel mundial. Sin embargo, en los últimos años nuevas drogas sintéticas (NPS) con efectos estimulantes han aparecido en el mercado ilegal, las cuáles no pueden ser detectadas con los métodos analíticos tradicionales. Un método de LC-MSMS para la determinación en pelo de ATS clásicos (anfetamina, metanfetamina, 3,4-metilendioximetanfetamina y 3,4-metilendioxianfetamina), catinonas sintéticas (metilona, mecedrona, mefedrona, 3,4-metilendioxipirovalerona, (\pm)-4-fluorometanfetamina y 4-fluorometcatinona), piperazinas sintéticas (1-(3-clorofenil)piperazina y 3-trifluorometilfenilpiperazina), y fármacos (trazodona y fenazona) que producen mCPP como metabolito, fue desarrollado y completamente validado. Las muestras de pelo (30 mg) fueron incubadas en metanol ácido (0,1% HCl) y se realizó su extracción por fase sólida empleando cartuchos de modo mixto. La separación cromatográfica fue realizada usando una columna analítica Atlantis T3 (3 μ m; 2,1x50 mm), y formiato amónico 2 mM pH 3 y acetonitrilo como fases móviles. El método fue validado, incluyendo selectividad (sin interferencias endógenas ni exógenas); linealidad (2-20 a 2000-4000 pg/mg); límites de detección (0,2 a 5 pg/mg) y cuantificación (2 a 20 pg/mg); exactitud (93,4-109,4% de la concentración teórica); imprecisión (%CV<11,6%); recuperación de la extracción (40,5-92,1%); efecto matriz (24,1-227,2%); eficacia total del proceso (9,8-165,7%) y estabilidad en el inyector (-14,5% de pérdida). El método fue aplicado al análisis de 16 muestras de pelo. Se determinó la presencia de anfetamina (n= 7; 69,1-777,1 pg/mg), metanfetamina (n= 3; 120,4-1538,9 pg/mg), MDA (n= 2; 27,8-135,4 pg/mg) y MDMA (n= 8; 73,4-3654,5 pg/mg). Además, se encontraron 10 resultados positivos para mCPP (341,7-25008,9 pg/mg); pero en todos los casos también se identificó trazodona (2085,3-567521,7 pg/mg), lo que probó que el consumo de mCPP había presentado un origen lícito.

Abstract

Amphetamine-type-stimulants (ATS) are the second most commonly used group of illicit drugs worldwide. However, in the last years new psychoactive substances (NPS) with stimulant effects have appeared in the illegal market, which are not detected with traditional analytical methods. An LC-MSMS method for the determination in hair of classical ATS (amphetamine, methamphetamine, 3,4-methylenedioxymethamphetamine and 3,4-methylenedioxyamphetamine), synthetic cathinones (methylone, methedrone, mephedrone, 3,4-methylenedioxypropylone, (±)-4-fluoromethamphetamine and 4-fluoromethcathinone), synthetic piperazines (1-(3-chlorophenyl)piperazine and 3-trifluoromethylphenylpiperazine), and medicines (trazodone and phenazone) that produce mCPP as metabolite, was developed and fully validated. Hair samples (30mg) were incubated in acid methanol (0.1% HCl) and extracted by a mixed-mode solid phase extraction. Chromatographic separation was performed using an Atlantis T3 (3 μ m; 2.1x50 mm) analytical column, and ammonium formate 2 mM pH 3 and acetonitrile as mobile phase. The method was validated, including selectivity (no endogenous or exogenous interferences); linearity (2-20 to 2,000-4,000 pg/mg); limits of detection (0.2 to 5 pg/mg) and quantification (2 to 20 pg/mg); accuracy (93.4-109.4% of target concentration); imprecision (%CV<11.6%); extraction recovery (40.5-92.1%); matrix effect (24.1-227.2%); process efficiency (9.8-165.7%) and stability in the autosampler (-14.5% of loss). The method was applied to the analysis of 16 hair samples. Amphetamine (n= 7; 69.1-777.1 pg/mg), methamphetamine (n= 3; 120.4-1,538.9 pg/mg), MDA (n= 2; 27.8-135.4 pg/mg) and MDMA (n= 8; 73.4-3654.5 pg/mg) were found. Moreover, 10 positive results for mCPP were detected (341.7-25,008.9 pg/mg); however, in all cases trazodone identification (2,085.3-567,521.7 pg/mg) probed a licit origin of mCPP.

Keywords: hair, amphetamine-type-stimulants, new psychoactive substances, synthetic cathinones, synthetic piperazines.

1. Introduction

Amphetamine-type-stimulants (ATS) include classical drugs of abuse such as amphetamine, methamphetamine, methylenedioxyamphetamine (MDA) and methylenedioxymethamphetamine (MDMA). These substances act as central nervous system stimulants, increasing alertness, physical activity and libido; decreasing appetite and inhibitions; and causing euphoria and/or hallucinations¹. ATS are the second most frequently group of illicit drugs used worldwide. However, its use declined globally in 2010-2012, mainly in Western and Central Europe², in agreement with the progressive popularization of the new psychoactive substances (NPS).

NPS were introduced in the drug market in recent years as “legal” substitutes of classical drugs of abuse. In fact, only few of these new substances have been scheduled in some countries in the last years^{3,4}. Among NPS, synthetic cathinones and synthetic piperazines are consumed as an alternative to classical ATS because they mimic their stimulant effects. For example, synthetic piperazines such as 1-(3-chlorophenyl)piperazine (mCPP) and 3-trifluoromethylphenylpiperazine (TFMPP) are claimed to act like MDMA; synthetic cathinones such as methylone and mephedrone were described to have stimulant and partly entactogen effects analogous to MDMA; and 3,4-methylenedioxyprovalerone (MDPV) was reported to have cocaine- and amphetamine-like effects⁵.

Hair represents a useful alternative matrix in forensic toxicology as its analysis allows a retrospective evaluation of drug use history, and its collection is easy and non-invasive^{6,7}. This matrix has been used for forensic and clinical analysis of drugs of abuse and medicines in a wide range of situations, such as workplace testing^{8,9}, gestational exposure¹⁰⁻¹², drug facilitated sexual assaults^{13,14}, doping control^{15,16}, drug abuse history and withdrawal control¹⁷, driving license regranting^{18,19} or postmortem toxicology^{20,21}. However, limited amount of sample is frequently supplied for testing and, consequently, multianalyte methods are recommended, saving time, costs and amount of specimen required. Moreover, classical ATS and NPS with similar effects could be detected in the same user, due to the long window of detection of hair samples.

The aim of this study was to develop and validate a method for the determination of ATS, including classical drugs (amphetamine, methamphetamine, MDMA and MDA) and NPS such as synthetic cathinones (methylone, methedrone, mephedrone, MDPV, 4-fluoromethcathinone (4-FMC) and (\pm)-4-fluoromethamphetamine (4-FMA)), and piperazines (mCPP and TFMPP) in hair using LC-MSMS. Moreover, the medicines trazodone and phenazone were included in the method as they produce mCPP as a metabolite^{22,23}.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals and Reagents

Amphetamine, methamphetamine, MDMA, MDA, methylone, methedrone, mephedrone, mCPP, MDPV, TFMPP and trazodone standards at 1 mg/mL, and amphetamine-d₅, methamphetamine-d₅, MDMA-d₅, MDA-d₅, methylone-d₃, mephedrone-d₃, mCPP-d₈ and TFMPP-d₄ at 0.1 mg/mL in methanol were purchased from Cerilliant™ (Round Rock, TX, USA). Phenazone in solid form was obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), and 4-FMA and 4-FMC in solid form from the National Measurement Institute, Australian Government (Lindfield, Sydney, Australia). Reagent grade formic acid (FA) 98-100%, reagent grade hydrochloric acid (HCl) 37% and reagent grade ammonia solution 32% (v/v) (NH₄OH) were from Scharlau (Sentmenat, Spain). Methanol HPLC grade (MeOH), 2-propanol (2-PROP) and reagent grade dichloromethane (DCM) were from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany), and LC-MS acetonitrile (ACN) from Panreac (Castellar del Vallès, Spain). Water was purified with a Milli-Q water system (Millipore, Le-Mont-sur-Lausanne, Switzerland). Strata X-C cartridges (30 mg, 3 mL) were purchased from Phenomenex (Torrence, CA, USA).

2.2. Preparation of calibrators, quality controls (QC) and internal standard solutions

Individual solutions of 4-FMA and 4-FMC were prepared at 1 mg/ml in methanol. A stock solution at 20 µg/mL in methanol was generated from the individual standards at 1 mg/mL. Working solutions were prepared by further dilutions in methanol at 6, 0.6, 0.06, 0.006 and 0.0006 µg/mL. An eight-point calibration curve (2-4,000 pg/mg) was

generated by addition of 20, 50 or 100 μL of the appropriate working solution to 30 mg of blank hair samples. QC solutions at 20, 0.6, 0.12, 0.012 and 0.0024 $\mu\text{g}/\text{mL}$ were prepared in methanol from different stock solutions than those used for calibrators. Low (6 pg/mg for methylone, methedrone, mephedrone and MDPV; and 30 pg/mg for the rest of the analytes), medium (300 pg/mg) and high (1500 pg/mg) QCs samples were prepared by the addition of 75 μL of the corresponding solution. An internal standard (IStd) mixture containing amphetamine- d_5 , methamphetamine- d_5 , MDMA- d_5 , MDA- d_5 , methylone- d_3 , mephedrone- d_3 , mCPP- d_8 and TFMPP- d_4 at 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ was prepared by dilution of the individual IStd stock solution in methanol. Working IStd solution at 120 ng/mL was obtained by dilution, and 25 μL were added to hair samples. All these solutions were stored at -20°C in the absence of light until use.

2.3. Hair samples

Hair samples for the preparation of the calibrators and quality control (QC) samples were donated by the staff personnel. Moreover, 16 real specimens were analyzed in order to demonstrate the applicability of the method. Seven hair specimens with a previously positive result for classical amphetamine derivatives using the routine method employed in our laboratory were reanalyzed using the present methodology. Samples were received in our laboratory from 2009 to 2013, and gave positive results to amphetamine ($n= 7$), methamphetamine ($n= 3$), MDA ($n= 2$) and MDMA ($n= 7$). In addition, 9 hair specimens were collected in 2014 from patients under daily trazodone treatment, 6 males and 3 females, with doses ranging between 50 to 500 mg/day . Hair samples were collected from the vertex posterior of the head, as close as possible from the scalp, indicating with a string the hair root, as recommended by the Society of Hair Testing (SoHT)²⁴. Specimens were stored at room temperature in an envelope until analysis.

2.4. Sample preparation

2.4.1. Decontamination process

Prior to analysis, hair samples were washed to remove external contamination. Each hair sample was washed with 2 mL of dichloromethane three times during 2 min. After that, samples were completely dried in a heater at 40°C. The last wash solvent was collected and dried under nitrogen at 35°C in a TurboVap LV evaporator (Zymark, Hopkinton, MA, USA), and injected into the LC-MSMS to confirm the total removal of external contamination.

2.4.2. Hair incubation

Thirty milligrams of decontaminated hair were powdered in a ball mill (Precellys, Montigny le Bretonneux, France). The powder was incubated with 2 mL 0.1% HCl in methanol for 1 h at 60°C in a bath, after the addition of 25 µL IStd working solution. The sample was centrifuged (4,000 rpm, 10 min) and the supernatant was evaporated to dryness under nitrogen at 35°C. After that, the residue was reconstituted in 2 mL of 2% FA in water to achieve the optimum pH for the solid phase extraction (SPE).

2.4.3. Clean-up

Strata X-C cartridges were selected for carrying out the SPE. Cartridges were conditioned by sequential addition of 2 mL methanol and 2 mL water. After loading the samples in acid solution, the cartridges were washed with 2 mL 2% FA in water and 2 mL MeOH:Water:FA (47.5:47.5:5; v:v:v), and then dried for 10 min under vacuum. Analytes were eluted with 2 mL DCM:2-PROP:NH₄OH (47.5:47.5:5; v:v:v), and subsequently evaporated to dryness with nitrogen at 35°C after addition of 25 µL acidic methanol (0.1% HCl). Samples were reconstituted in 75 µL of initial mobile phase, and 30 µL were injected into the LC-MSMS.

2.5. LC-MS/MS

The HPLC system was an Alliance 2795 Separation Module equipped with an Alliance

series column heater/cooler (Waters Corp., Milford, MA, USA). Gradient elution was performed using an Atlantis[®] T3 (2.1 mm x 50 mm, 3 µm) reversed-phase analytical column (Waters, Milford, MA, USA), maintained at 35°C. Ammonium formate 2mM with 0.1% FA (pH= 3) (A) and ACN (B) were used as mobile phase at a flow rate of 0.3 mL/min. The gradient program was as follows: 0-3 min 0% B; 3-5 min from 0% to 20% B; 5-6.8 min 20% B; 6.8-7.3 min from 20% to 25% B; 7.3-8.8 min 25% B; 8.8-9.3 min from 25% to 30% B; 9.3-9.4 min return to initial conditions; and 9.4-13 min column re-equilibration. A divert valve was set to direct the flow to the MS from 4 to 11 min, and to waste the remaining time.

A Quattro Micro[™] API ESI triple quadrupole (Waters Corp., Milford, MA, USA) was employed for detection. The instrument was operated in electrospray in the positive mode (ESI+) to produce protonated molecules of the analytes with the following optimized settings: capillary voltage 1.0 kV; source block and desolvation gas (nitrogen) temperature 150 °C and 400 °C, respectively; desolvation and cone gas (nitrogen) flow rate 800L/h and 60 L/h, respectively. Data were acquired in multiple reaction monitoring (MRM) mode. A post-column infusion of each individual analyte at 10 µL/mL connected with a “T” valco to the chromatographic effluent (ammonium formate 2mM with 0.1% of FA (pH= 3) and ACN, 50:50, v:v) was employed to select multiple reaction monitoring (MRM) transitions, cone voltages and collision energies for the target analytes and IStd (Table 1). Data acquisition was controlled with MassLynx 4.1 software and processed with QuanLynx 4.1 software (Waters Corp., Milford, USA).

Table 1. MRM transitions, cone voltage (CV), collision energy (CE), retention time (Rt) and internal standard (IStd) selected for each analyte.

Analyte	MRM transition	CV (V)	CE (eV)	Rt (min)	IStd
Amphetamine	<u>136.1>119.0</u>	20	9	5.7	Amphetamine-d ₅
	136.1>90.6		15		
Amphetamine-d ₅	141.2>124.1	15	9	5.7	

4-FMC	<u>182.3>164.2</u> 182.3>149.2	22	13 19	5.3	Mephedrone-d ₃
Methylone	<u>208.4>160.2</u> 208.4>190.3	22	17 13	5.4	Methylone-d ₃
Methylone-d ₃	211.3>163.2	22	19	5.4	
Methamphetamine	<u>150.1>90.6</u> 150.1>119.0	24	11 17	5.8	Methamphetamine-d ₅
Methamphetamine-d ₅	155.1>120.9	22	11	5.8	
4-FMA	<u>168.3>109.0</u> 168.3>137.2	22	21 11	6.3	Methylone-d ₃
Mephedrone	<u>178.3>160.2</u> 178.3>145.1	20	12 18	6.5	Mephedrone-d ₃
Mephedrone-d ₃	181.4>163.3	22	13	6.5	
MDA	<u>180.3>105.1</u> 180.3>133.2	15	20 16	5.9	MDA-d ₅
MDA-d ₅	185.1>168.1	15	9	5.9	
Methedrone	<u>194.4>176.3</u> 194.4>161.2	20	13 19	6.4	Methylone-d ₃
MDMA	<u>194.0>163.0</u> 194.0>104.8	20	12 25	6.4	MDMA-d ₅
MDMA-d ₅	199.1>165.0	22	12	6.4	
Phenazone	<u>189.2>76.9</u> 189.2>104.1	35	40 24	7.3	MDMA-d ₅
mCPP	<u>197.3>154.2</u> 197.3>118.9	32	19 25	7.5	mCPP-d ₈
mCPP-d ₈	205.3>158.2	36	21	7.5	
MDPV	<u>276.3>126.2</u> 276.3>175.2	28	27 23	7.9	mCPP-d ₈
TFMPP	<u>231.3>188.2</u> 231.3>118.9	36	23 31	9.0	TFMPP-d ₄
TFMPP-d ₄	235.3>190.3	36	21	9.0	

3.2. Artículo 2

Trazodone	<u>372.2>176.6</u> 372.2>148.2	35	24 34	9.6	TFMPP-d ₄
Underlined transitions were used for quantification. 4-FMC: (±)-4-fluoromethcathinone; 4-FMA: (±)-4-fluoromethamphetamine; MDA: 3,4-methylenedioxyamphetamine; MDMA: 3,4-methylenedioxyamphetamine; mCPP: 1-(3-chlorophenyl)piperazine; MDPV: 3,4-methylenedioxypropylamphetamine; TFMPP: 3-(trifluoromethylphenyl)piperazine					

2.6. Validation

The method was validated with the assessment of the following parameters: selectivity, linearity, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), imprecision, accuracy, extraction recovery, matrix effect, process efficiency and stability in the autosampler.

Endogenous and exogenous interferences were evaluated to test selectivity. Potential endogenous matrix interferences were assessed by the analysis of blank hair samples from 10 different sources fortified with the IStd mixture. Exogenous interferences were assessed by the analysis of blank hair samples fortified with 38 common drugs of abuse and medicines at 8000 pg/mg. The following drugs were tested: morphine, codeine, 6-acetylmorphine, methadone, 2-ethylidene-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidine (EDDP), cocaine, benzoylecgonine, ecgonine methyl ester, cocaethylene, lysergic acid diethylamide (LSD), ketamine, norketamine, gamma-hydroxybutyric acid (GHB), nicotine, cotinine, fentanyl, amitriptyline, paroxetine, zolpidem, zopiclone, ibuprofen, omeprazol, acetaminophen, diclofenac, naproxen, alprazolam, temazepam, lormetazepam, lorazepam, flunitrazepam, 7-aminoflunitrazepam, clonazepam, diazepam, nordiazepam, oxazepam, triazolam, nitrazepam and bromazepam. If analytes were not detected (<LOD), the method was considered selective.

Linearity was verified by preparing 4 calibration curves analyzed on 4 different days. A calibration range between 2 to 4,000 pg/mg was studied for each analyte. Acceptance criteria included a coefficient of determination (r^2) ≥ 0.99 , and residuals $\leq 15\%$ at each concentration level, except at the LOQ, for which residuals $\leq 20\%$ were accepted.

The LOD was defined as the lowest concentration at which the two MRM transitions monitored for each analyte could be identified with a signal-to-noise ≥ 3 with acceptable chromatography, within ± 0.2 min of the mean calibrators retention time and appropriate ion ratio²⁵. LOD was determined by the analysis of fortified blank hair samples (n=3) at decreasing concentrations. LOQ was defined as the lowest concentration that could be quantified with a signal-to-noise ≥ 10 , and adequate precision (%CV <20%) and accuracy (% of target concentration $\pm 20\%$)²⁵. LOQ was evaluated by the analysis of 5 replicates.

Imprecision was evaluated by the calculation of the coefficient of variation (%CV) of pooled within-day, between-day and total imprecision following Krouwer and Rabinowitz' recommendations²⁶. Acceptable imprecision was achieved if %CV was $\leq 15\%$. Accuracy was expressed as the percentage of the nominal concentration, and was required to be within 85-115% of the target concentration. Imprecision and accuracy were assessed at low, medium and high QC concentrations by the analysis of 5 replicates at each concentration on 4 different days (n= 20).

Extraction recovery, matrix effect and overall process efficiency were calculated at low and high QC concentrations based on Matuszewski et al. recommendations²⁷. Different blank hair samples were fortified before and after extraction, and also the same QC concentrations were prepared in initial mobile phase. Extraction recovery was calculated as percentage by comparing mean peak area in blank hair samples fortified with the analytes before extraction (n= 6) with mean peak area in blank hair samples fortified after extraction (n= 10). Matrix effect was evaluated as percentage by comparing mean peak area in blank hair samples from 10 different sources fortified after extraction with mean peak area when the analytes were prepared in mobile phase (n= 6). Process efficiency was expressed as the ratio of mean peak area in blank hair samples fortified before extraction (n= 6) divided by mean peak area in samples prepared in initial mobile phase (n= 6) as percentage.

Analytes stability in the autosampler was assessed by reinjecting low (n= 5) and high (n= 5) QC samples after 72 h stored at 6°C. Stability was evaluated by comparing concentrations of freshly fortified hair samples (n= 5) at each QC concentration with

concentrations obtained after storage. Stability was considered acceptable if QC samples quantified within $\pm 15\%$ of freshly prepared QC samples.

3. Results

3.1. Validation

The method proved to be selective for endogenous and exogenous interferences, meeting identification criteria. No quantifiable interferences with any extractable endogenous compounds in hair were detected after the analysis of blank hair specimens from 10 different individuals. Moreover, no potentially interfering peaks were found after the analysis of blank hair samples fortified with common drugs of abuse and medicines. Figure 1.A shows a MRM chromatogram of the quantifier transitions for all the analytes in a blank specimen.

Linearity of the compound-to-IStd ratio versus the theoretical concentration was verified in hair. Calibration curves fitted using least-squared regression with $1/x$ weighting factor for all the analytes, except for MDMA, methedrone and 4-FMA, for which data fitted better assuming a quadratic model. The curvature tested on a set of 4 calibration curves yielded coefficients of determination above 0.99 for all the analytes, and residuals were within $\pm 20\%$ of the target concentration at the LOQ and $\pm 15\%$ at the remaining concentrations. LOD ranged from 0.2 to 5 pg/mg, and LOQ from 2 to 20 pg/mg, depending on the analyte. Figure 1.B shows MRM chromatograms of the quantifier transitions for all the analytes in a hair sample fortified at the LOQ. Table 2 includes calibration parameters, LOD and LOQ for all the compounds.

Imprecision and accuracy at the three QC concentrations met the acceptance criteria. Within-day, between-day and total imprecision were $<7.9\%$, $<11.2\%$ and $<11.6\%$, respectively. Accuracy ranged from 93.4 to 109.4% of the target concentration. Imprecision and accuracy results are summarized in Table 3.

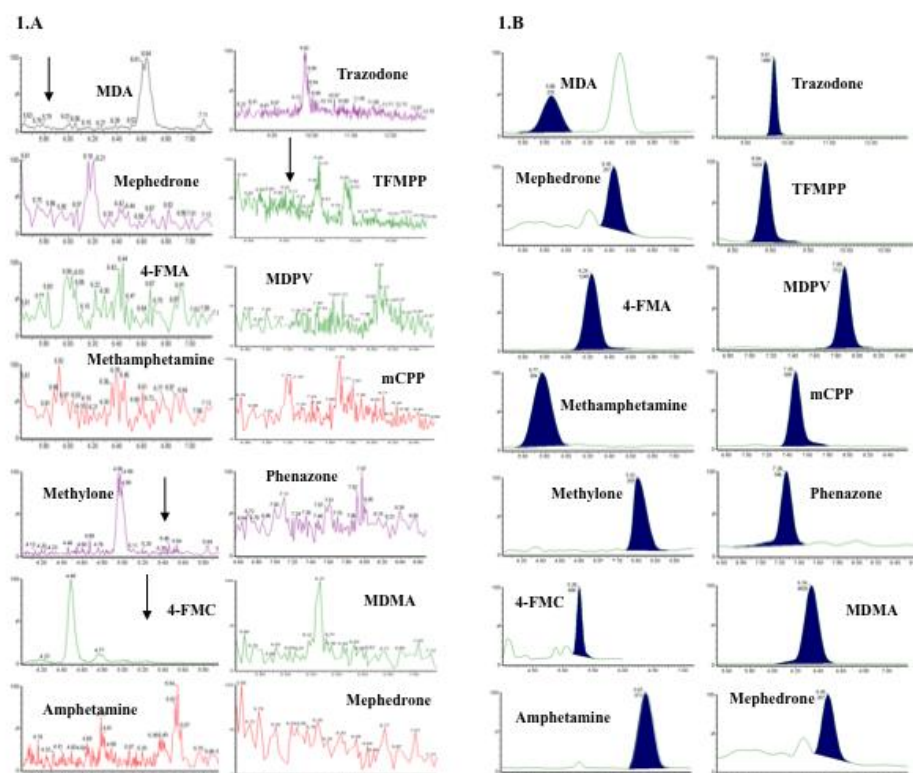


Figure 1. MRM chromatograms of the quantifier transitions for all the analytes in a blank hair sample (1.A) and in a blank hair sample fortified at the corresponding LOQ (1.B).

Table 2. Limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ) and calibration parameters for each analyte.

Analyte	LOD (pg/mg)	LOQ (pg/mg)	Linearity (pg/mg)	Intercept \pm SD (n= 4)	Slope \pm SD (n= 4)	$r^2 \pm$ SD (n= 4)
Amphetamine	5.0	20.0	20-4,000	2.0000 \pm 3.7404	0.4995 \pm 0.0625	0.9973 \pm 0.0016
4-FMC	5.0	10.0	10-4,000	-0.4094 \pm 1.7085	0.2824 \pm 0.0864	0.9962 \pm 0.0033
Methylone	1.0	2.0	2-4,000	-0.4243 \pm 0.4586	0.4823 \pm 0.0267	0.9983 \pm 0.0018
Methamphetamine	5.0	20.0	20-4,000	0.1199 \pm 1.2224	0.1854 \pm 0.0917	0.9972 \pm 0.0014
4-FMA	2.0	10.0	10-2,000	-0.7638 \pm 1.0950	1.0558 \pm 0.2312	0.9980 \pm 0.0014
Mephedrone	1.0	2.0	2-4,000	0.4512 \pm 0.5279	0.6973 \pm 0.1720	0.9977 \pm 0.0023

MDA	5.0	20.0	20-4,000	-0.3420 ± 0.7296	0.1491 ± 0.0178	0.9986 ± 0.0014
Methedrone	1.0	2.0	2-4,000	0.1610 ± 0.1098	0.2851 ± 0.0202	0.9958 ± 0.0015
MDMA	1.0	20.0	20-4,000	-0.4004 ± 1.5038	0.6292 ± 0.0524	0.9940 ± 0.0041
mCPP	5.0	10.0	10-4,000	0.3951 ± 1.8515	0.7242 ± 0.0957	0.9967 ± 0.0019
MDPV	0.2	2.0	2-4,000	2.6368 ± 2.5566	3.3449 ± 0.9799	0.9989 ± 0.0004
Phenazone	5.0	10.0	10-4,000	1.1859 ± 1.1282	0.1540 ± 0.0630	0.9977 ± 0.0018
TFMPP	1.0	10.0	10-4,000	-1.9817± 1.6012	0.8505 ± 0.1189	0.9962 ± 0.0038
Trazodone	0.2	10.0	10-4,000	7.9202 ± 15.0681	5.1231 ± 1.0153	0.9972 ± 0.0012
4-FMC: (±)-4-fluoromethcathinone; 4-FMA: (±)-4-fluoromethamphetamine; MDA: 3,4-methylenedioxyamphetamine; MDMA: 3,4-methylenedioxymethamphetamine; mCPP: 1-(3-chlorophenyl)piperazine; MDPV: 3,4-methylenedioxypropylvalerone; TFMPP: 3-trifluoromethylphenylpiperazine						

Table 3. Imprecision and accuracy at low (6 or 30 pg/mg, depending on the analyte), medium (300 pg/mg) and high (1500 pg/mg) QC concentrations.

Analyte	Within-day imprecision (n=20; %CV)			Between-day imprecision (n=20; %CV)			Total imprecision (n=20; %CV)			Accuracy (n=20; % target concentration)		
	Low	Medium	High	Low	Medium	High	Low	Medium	High	Low	Medium	High
Amphetamine	2.9	2.9	3.1	6.9	2.3	5.0	7.4	3.7	5.9	103.5	109.4	105.2
4-FMC	4.9	3.4	3.0	7.4	9.5	11.2	8.9	10.1	11.6	97.7	104.5	103.0
Methylone	2.4	2.8	2.2	2.8	3.1	4.7	3.7	4.1	5.2	109.3	107.3	102.2
MA	5.1	4.3	3.2	6.5	3.5	2.1	8.3	5.5	3.9	104.7	108.7	107.0
4-FMA	5.7	6.2	4.4	3.0	4.5	6.8	6.4	7.7	8.1	103.3	104.6	101.9
Mephedrone	2.9	2.2	3.0	0.3	6.2	5.1	3.0	6.5	5.9	109.3	102.7	99.0
MDA	3.6	3.5	3.2	4.6	4.7	5.3	5.8	5.8	6.2	104.7	100.9	99.2
Methedrone	5.6	3.4	3.3	2.0	7.0	5.3	6.0	7.8	6.2	105.8	106.2	103.9

MDMA	4.5	2.8	1.7	5.2	2.5	2.0	6.8	3.8	2.7	104.7	104.6	103.9
mCPP	4.0	4.0	2.3	2.2	1.8	2.6	4.6	4.4	3.4	96.9	101.7	102.9
MDPV	5.4	4.5	2.6	3.9	0.0	0.0	6.6	4.5	2.6	102.4	104.6	102.0
Phenazone	5.1	7.3	7.9	1.0	7.3	3.0	5.2	10.4	8.5	93.4	101.5	101.7
TFMPP	3.3	1.8	1.8	2.5	1.5	3.0	4.2	2.3	3.5	99.8	102.6	103.7
Trazodone	6.1	3.9	2.8	3.1	6.6	0.0	6.8	7.6	2.8	96.8	100.5	104.8

MA: Methamphetamine; 4-FMC: (\pm)-4-fluoromethcathinone; 4-FMA: (\pm)-4-fluoromethamphetamine; MDA: 3,4-methylenedioxyamphetamine; MDMA: 3,4-methylenedioxyamphetamine; mCPP: 1-(3-chlorophenyl)piperazine; MDPV: 3,4-methylenedioxypropylvalerone; TFMPP: 3-trifluoromethylphenyl)piperazine

Extraction recovery and process efficiency ranged from 40.5 to 92.1% and 9.8 to 165.7%, respectively. Matrix effect was observed for all the compounds, except for MDA, mCPP, phenazone and trazodone, with signal enhancement ranging from 109.3 to 227.2% (%CV<19.6%; n= 10). mCPP, phenazone and trazodone showed ion suppression (24.1 to 106.9%; %CV<17.3%; n= 10), and no matrix effect was observed for MDA. Similar results were observed for the respective IStand, thus compensating the possible imprecision and inaccuracy due to this effect. Data from these results are presented in Table 4.

Table 4. Extraction recovery, process efficiency and matrix effect at low (6 or 30 pg/mg, depending on the analyte) and high (1500 pg/mg) QC concentrations.

Analyte	Extraction recovery, n= 6		Process efficiency, n= 6		Matrix effect, n= 10 (%CV)	
	Low	High	Low	High	Low	High
Amphetamine	75.3	89.9	163.4	155.4	217.1 (11.9)	172.9 (9.9)
Amphetamine-d ₅					184.7 (13.5)	
4-FMC	47.8	53.9	99.5	112.5	208.1 (4.8)	208.8 (6.7)
Methylone	70.8	74.4	111.3	81.3	157.1 (5.0)	109.3 (6.3)
Methylone-d ₃					153.6 (5.4)	
Methamphetamine	72.9	70.7	165.7	147.9	227.2 (13.9)	209.1 (10.1)

3.2. Artículo 2

Methamphetamine-d ₅					227.5 (10.9)	
4-FMA	68.6	82.0	153.9	153.9	224.3 (5.7)	187.7 (6.6)
Mephedrone	51.1	59.8	101.7	113.6	199.1 (6.8)	190.0 (7.4)
Mephedrone-d ₃					203.9 (7.3)	
MDA	84.6	88.0	100.3	74.1	118.6 (20.6)	75.8 (13.4)
MDA-d ₅					114.9 (17.9)	
Methedrone	67.6	72.4	111.2	88.4	164.6 (7.2)	122.1 (10.0)
Methedrone-d ₃					153.6 (5.4)	
MDMA	82.7	92.1	128.9	86.9	155.9 (19.6)	94.4 (10.2)
MDMA-d ₅					131.3 (8.3)	
mCPP	70.3	79.7	75.2	54.4	106.9 (11.6)	68.2 (14.0)
mCPP-d ₈					111.4 (14.1)	
MDPV	75.8	85.0	106.7	108.8	140.7 (2.9)	128.1 (3.6)
Phenazone	53.1	60.4	20.3	29.9	38.3 (14.8)	49.6 (6.3)
TFMPP	61.5	68.9	105.2	117.1	171.0 (7.4)	169.9 (8.1)
TFMPP-d ₈					180.8 (8.1)	
Trazodone	40.5	49.4	9.8	21.8	24.1 (17.3)	44.2 (7.1)
Matrix effect= 100% means no matrix effect; 4-FMC: (±)-4-fluoromethcathinone; 4-FMA: (±)-4-fluoromethamphetamine; MDA: 3,4-methylenedioxyamphetamine; MDMA: 3,4-methylenedioxymethamphetamine; mCPP: 1-(3-chlorophenyl)piperazine; MDPV: 3,4-methylenedioxypropylvalerone; TFMPP: 3-(trifluoromethylphenyl)piperazine						

All the analytes were stable in the autosampler for 72 h at 6°C after the analysis of 5 replicates at 2 QC concentrations (low and high). Percentage of loss when compared to fresh QC samples was lower than 14.5% in all cases (Table 5).

Tabla 5. Stability at low (6 or 30 pg/mg, depending on the analyte), and high (1500 pg/mg) QC concentrations after 72 h in the autosampler at 6°C. Data expressed as % loss compared to fresh controls.

Analyte	% loss	
	Low (n= 5)	High (n= 5)
Amphetamine	-10.9	-5.0
4-FMC	5.5	1.6
Methylone	-4.7	3.1
Methamphetamine	-2.8	-0.8
4-FMA	2.7	-11.1
Mephedrone	-14.5	5.2
MDA	-2.4	-6.4
Methedrone	-12.2	5.2
MDMA	-2.3	-3.7
mCPP	-8.9	-2.5
MDPV	2.7	0.9
Phenazone	-13.3	10.5
TFMPP	3.5	-8.0
Trazodone	-3.5	6.6
4-FMC: (±)-4-fluoromethcathinone; 4-FMA: (±)-4-fluoromethamphetamine; MDA: 3,4-methylenedioxyamphetamine; MDMA: 3,4-methylenedioxymethamphetamine; mCPP: 1-(3-chlorophenyl)piperazine; MDPV: 3,4-methylenedioxypropylvalerone; TFMPP: 3-trifluoromethylphenyl)piperazine		

3.2. Application to real specimens

Sixteen real hair specimens were analyzed to probe the applicability of the present method (Table 6). Samples with a previous positive result for classical ATS (samples 1-7) gave a positive result for the same analytes. Seven specimens were positive for amphetamine (69.1-777.1 pg/mg), 3 for methamphetamine (120.4-1,538.9 pg/mg), 2 for MDA (27.8-135.4 pg/mg) and 7 for MDMA (98.7-3,654.5 pg/mg). Moreover, a positive result for mCPP was found in sample 7 (6,527.9 pg/mg), but the presence of

trazodone (17,094.6 pg/mg) in this sample probe mCPP origin from consumption of this prescription drug and not from a recreational use. Nine hair specimens (samples 8-16) from patients under trazodone daily treatment showed positive results for trazodone (2,085.3-567,521.7 pg/mg) and its metabolite mCPP (341.7-25,008.9 pg/mg). In addition, sample 16 showed a positive result for MDMA at low concentration (73.4 pg/mg). Figure 2 shows MRM chromatograms of the positive results found in sample 7.

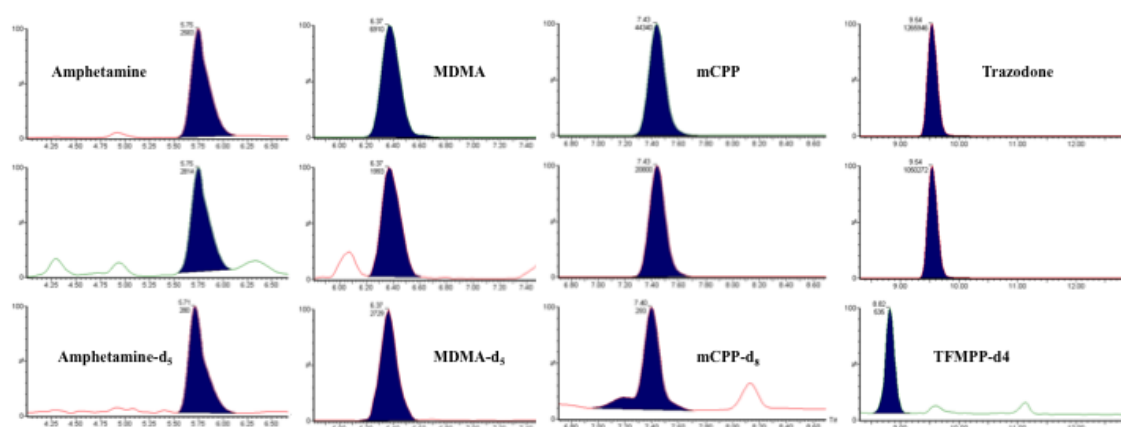


Figure 2. MRM chromatograms of the positive results found in sample 7 containing amphetamine (383.7 pg/mg), MDMA (98.7 pg/mg), mCPP (6,527.9 pg/mg) and trazodone (17,094.6 pg/mg).

Table 6. Concentrations (pg/mg) of the study analytes found in the 16 real hair specimens.

Samples	Concentration (pg/mg)					
	Amphetamine	Methamphetamine	MDMA	MDA	mCPP	Trazodone
1	91.3	-	1,536.4	27.8	-	-
2	777.1	1,538.9	3,654.5	135.4	-	-
3	69.1	1,243.6	103.9	-	-	-
4	424.7	-	131.5	-	-	-
5	44.9	120.4	109.0	-	-	-
6	679.2	-	223.1	-	-	-

7	383.7	-	98.7	-	6,527.9	17,094.6
8	-	-	-	-	25,008.9	567,521.7
9	-	-	-	-	869.2	4,814.4
10	-	-	-	-	3,411.4	25,835.4
11	-	-	-	-	22,398.4	65,628.2
12	-	-	-	-	4,942.6	11,096.6
13	-	-	-	-	12,748.2	19,992.6
14	-	-	-	-	8,000.9	23,089.8
15	-	-	-	-	341.7	2,085.3
16	-	-	73.4	-	963.3	3,211.0
MDMA: 3,4-methylenedioxyamphetamine; MDA: 3,4-methylenedioxyamphetamine; mCPP: 1-(3-chlorophenyl)piperazine						

4. Discussion

An LC-MSMS method for the determination in hair of classical ATS (amphetamine, methamphetamine, MDMA and MDA), synthetic cathinones (methyldone, methedrone, mephedrone, MDPV, 4-FMC and 4-FMA), synthetic piperazines (mCPP and TFMPP), and medicines that produce mCPP as metabolite (trazodone and phenazone) was developed and fully validated. All the analytes eluted within 10 min, with a total run time of 13 minutes. The studied parameters (selectivity, linearity, LOD, LOQ, imprecision, accuracy, extraction recovery, matrix effect, process efficiency and stability) yielded satisfactory results for the all compounds.

Several authors have reported the determination of synthetic cathinones and piperazines in hair^{5,20,23,28-36}. However, the majority of these studies only included a few number of these molecules^{20,23,28,30,32,34,35-36}, whereas with this method it is possible to determine not only 8 NPS but also 4 classical amphetamine derivatives. Multianalyte methodologies are necessary in hair analysis because the amount of hair available is frequently low⁶. In addition, some of the previously published methodologies have been developed using GC-MS or GC-MSMS^{28-30,34,35}, which

required a derivatization step, extending the time of analysis and also increasing the cost. Only in one manuscript the determination of classical ATS were also included³¹.

The presence of classical ATS and NPS in hair samples of drug users can be expected, because many users changed the illegal ones (classical ATS) for the unregulated NPS, to avoid prosecution, or use both. Over the period 2009-2013 the number of NPS on the global drug market increased more than double², while the prevalence of classical ATS decreased. Rust et al.⁵ performed a retrospective study in hair samples, previously tested positive for classical ATS, to determine the prevalence of new psychoactive drugs. Fifty-nine positive results for NPS in 334 analyzed samples were found. Strano-Rossi et al.³³ applied their method for the determination of new synthetic cannabinoids, cathinones and piperazines to 50 authentic hair samples from forensic cases (driving license renewals, postmortem toxicological analyses and workplace drug testing), and previously analyzed for the most common drugs of abuse (including amphetamines). In this case samples with positive results for synthetic cathinones (n=3) were negative for other drugs of abuse. All these findings remark the interest of developing multianalyte methods for classical ATS and NPS, such this here described.

The LOQs achieved in the present method (5-20 pg/mg), using 30 mg of hair sample, were lower or equal to those set for other multianalyte methodologies with similar amounts of hair, employing LC-MSMS or GC-MSMS (5-100 pg/mg)^{5,29,31,33}. However, Strano-Rossi et al.³³ and Rust et al.⁵ included a higher number of analytes compared with this method. Nevertheless, their methods are more tedious, because they employed two LC methods and a two-step extraction, respectively. In addition, our method's LOQs for classical ATS (amphetamine, methamphetamine, MDMA and MDA) were 20 pg/mg, lower than SoHT cut-off recommendation (≥ 200 pg/mg)³⁷ to guarantee chronic exposure. Therefore, the application of the present method to previously positive real hair specimens probed chronic exposure to these substances in 6 cases, in which the concentration of at least one of these compounds was higher than the SoHT cut-off.

The medicines trazodone and phenazone were included in the method because they produce mCPP as main metabolite in the liver, by N-dealkylation of the nitrogen in the

piperazine ring²³. Therefore, simultaneous determination of trazodone, phenazone and mCPP allow distinguishing between therapeutic or recreational use. Trazodone users had higher hair trazodone concentrations (2,085.3-567,521.7 pg/mg) than those of mCPP (341.7-25,008.9 pg/mg). Phenazone was not detected in the analyzed real specimens. A correlation between the given doses and mCPP hair concentrations was found ($r= 0.796$, $p= 0.010$); however, no correlation with trazodone concentrations was determined ($r= 0.411$, $p= 0,271$). Stanaszek et al.²³ also developed a methodology for the determination of trazodone and mCPP in hair, and applied it to a patient under treatment with this antidepressant. Both analytes were detected with similar concentrations to those reported in the present manuscript. Therefore, a positive hair result for mCPP could be falsely attributed to a recreational use if trazodone or phenazone consumption is not discarded. Rust et al.⁵ found mCPP as the more prevalent drug detected (10.5%, 34 samples out of 334 analyzed samples). However, only 5 of these samples showed also a positive result for trazodone, proving the prevalence of this compound as a drug of abuse, but also the importance of distinguishing between licit and illicit origin of this substance.

5. Conclusion

The present manuscript describes the successful development of an LC-MS/MS method for the determination of amphetamine, methamphetamine, MDMA, MDA, methylone, methedrone, mephedrone, MDPV, 4-FMC, 4-FMA, mCPP, TFMPP, trazodone and phenazone in hair. The method was fully validated and applied to authentic samples. Classical ATS were found in real specimens with a previous positive result; however, only the NPS mCPP was detected. Method inclusion of prescription drugs that produce mCPP as main metabolite is important to distinguish between licit and illicit use.

Acknowledgement

E. Lendoiro and A. de Castro would like to thank Consellería de Cultura, Educación e Ordenación Universitaria, Xunta de Galicia, for their predoctoral (PRE/2011/072), and post-doctoral (POS-B/2013/003) contracts, respectively.

References

- [1] M. Carvalho, H. Carmo, V.M. Costa, J.P. Capela, H. Pontes, F. Remiao, F. Carvalho, M.L. Bastos. Toxicity of amphetamines: an update. *Arch Toxicol.* **2012**, *86*, 1167.
- [2] United Nations Office on Drugs and Crime. *World Drug Report.* **2014** (United Nations publication, Sales No. E.14.XI.7).
- [3] Department of Justice Drug Enforcement Administration. Schedules of controlled substances: temporary placement of three synthetic cathinones into Schedule I. *Fed. Regist.* **2011**, *76*, 65371.
- [4] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction. Perspectives on drugs: Controlling new psychoactive substances. 2014. Available at: <http://www.emcdda.europa.eu/topics/pods/controlling-new-psychoactive-substances>. Consulted 7th May 2015.
- [5] K.Y. Rust, M.R. Baumgartner, A.M. Dally, T. Kraemer. Prevalence of new psychoactive substances: A retrospective study in hair. *Drug Test. Analysis.* **2012**, *4*, 402.
- [6] F. Pragst, M.A. Balikova. State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse. *Clin. Chim. Acta.* **2006**, *370*, 17.
- [7] M. Vincenti, A. Salomone, E. Gerace, V. Pirro. Application of mass spectrometry to hair analysis for forensic toxicological investigations. *Mass Spectrom. Rev.* **2013**, *32*, 312.
- [8] C. Vignali, C. Stramesi, L. Morini, P. San Bartolomeo, A. Groppi. Workplace drug testing in Italy: Findings about second-stage testing. *Drug Test. Analysis.* **2015**, *7*, 173.
- [9] E. Gallardo, M. Barroso, J.A. Queiroz. LC-MS: a powerful tool in workplace drug testing. *Drug Test. Analysis.* **2009**, *1*, 109.
- [10] E. Lendoiro, E. González-Colmenero, A. Concheiro-Guisán, A. de Castro, A. Cruz, M. López-Rivadulla, M. Concheiro. Maternal hair analysis for the detection of illicit drugs, medicines and alcohol exposure during pregnancy. *Ther Drug Monit.* **2013**, *35*, 296.

- [11] F. Garcia-Bournissen, B. Rokach, T. Karaskov, G. Koren. Cocaine detection in maternal and neonatal hair: implications to fetal toxicology. *Ther Drug Monit.* **2007**, *29*, 71.
- [12] E. Vinner, J. Vignau, D. Thibault, X. Codaccioni, C. Brassart, L. Humbert, M. Lhermitte. Hair analysis of opiates in mothers and newborns for evaluating opiate exposure during pregnancy. *Forensic Sci Int.* **2003**, *133*, 57.
- [13] P. Kintz, M. Villain, M. Cheze, G. Pepin. Identification of alprazolam in hair in two cases of drug-facilitated incidents. *Forensic Sci Int.* **2005**, *153*, 222.
- [14] A. Salomone, E. Gerace, D. Di Corcia, G. Martra, M. Petrarulo, M. Vincenti. Hair analysis of drugs involved in drug-facilitated sexual assault and detection of zolpidem in a suspected case. *Int J Legal Med.* **2012**, *126*, 451.
- [15] P. Kintz, V. Cirimele, V. Dumestre-Toulet, B. Ludes. Doping control for nandrolone using hair. *J Pharmaceut Biomed.* **2001**, *24*, 1125.
- [16] M. Bresson, V. Cirimele, M. Villain, P Kintz. Doping control for metandienone using hair analyzed by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* **2006**, *836*, 124.
- [17] E. Papaseit, E. Corrales, C. Stramesi, O. Vall, A. Palomeque, O. Garcia-Algar. Postnatal methadone withdrawal syndrome: hair analysis for detecting chronic exposure. *Acta Paediatr.* **2010**, *99*, 162.
- [18] C. Stramesi, M. Polla, C. Vignali, A. Zucchella, A. Groppi. Segmental hair analysis in order to evaluate driving performance. *Forensic Sci. Int.* **2008**, *176*, 34.
- [19] R. Kronstrand, I. Nyström, M. Forsman, K. Käll. Hair analysis for drugs in driver's license regranting. A Swedish pilot study. *Forensic Sci. Int.* **2010**, *196*, 55.
- [20] J.F. Wyman, E.S. Lavins, D. Engelhart, E.J. Armstrong, K.D. Snell, P.D. Boggs, S.M. Taylor. Postmortem Tissue Distribution of MDPV Following Lethal Intoxication by "Bath Salts". *J Anal Toxicol.* **2013**, *37*, 182.
- [21] R. Cordero, S. Lee, S. Paterson. Distribution of concentrations of cocaine and its metabolites in hair collected postmortem from cases with diverse causes/circumstances of death. *J. Anal. Toxicol.* **2010**, *34*, 543.
- [22] R.F. Staack, H.H. Maurer. Piperazine-derived designer drug 1-(3-chlorophenyl)piperazine (mCPP): GC-MS studies on its metabolism and its

- toxicological detection in rat urine including analytical differentiation from its precursor drugs trazodone and nefazodone. *J. Anal. Toxicol.* **2003**, *27*, 560.
- [23] R. Stanaszek, W. Lechowicz. Determination of trazodone and its metabolite 1-(3-chlorophenyl)piperazine (mCPP) in hair by the high performance liquid chromatography method coupled with mass spectrometry (HPLC-ESI-MS). *Problems of Forensic Sciences.* **2006**, *LXVI*, 131.
- [24] G.A.A. Cooper, R. Kronstrand, P. Kintz. Society of Hair Testing guidelines for drug testing in hair. *Forensic Sci Int.* **2012**, *218*, 20.
- [25] European Union Decision 2002/657/EC. *Off. J. Eur. Commun.* **2002**, *221*, 8.
- [26] J.S. Krouwer, R. Rabinowitz. How to improve estimates of imprecision. *Clin Chem.* **1984**, *30*, 290.
- [27] B.K. Matuszewski, M.L. Constanzer, C.M. Chavez-Eng. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Anal Chem.* **2003**, *75*, 3019.
- [28] F. Sporkert, F. Pragst, R. Bachus, F. Masuhr, L. Harms. Determination of cathinone, cathine and norephedrine in hair of Yemenite khat chewers. *Forensic Sci. Int.* **2003**, *133*, 39.
- [29] J.Y. Kim, K.S. Jung, M.K. Kim, J.I. Lee, M.K. In. Simultaneous determination of psychotropic phenylalkylamine derivatives in human hair by gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2007**, *21*, 1705.
- [30] R. Kikura-Hanajiri, M. Kawamura, K. Saisho, Y. Kodama, Y. Goda. The disposition into hair of new designer drugs; methylone, MBDB and methcathinone. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* **2007**, *855*, 121.
- [31] A.A. Elian, J. Hackett, K.T. Donovan. Analysis of amphetamines and synthetic cathinones in hair samples using LC-Tandem mass spectrometry and solid-phase extraction. *LC-GC Europe.* **2014**, *32*, 458.
- [32] S. Pichini, M.C. Rotolo, J. García, N. Girona, L. Leal, O. García-Algar, R. Pacifici. Neonatal withdrawal syndrome after chronic maternal consumption of 4-methylethcathinone. *Forensic Sci. Int.* **2014**, *245C*, e33.
- [33] S. Strano-Rossi, S. Odoardi, M. Fisichella, L. Anzillotti, R. Gottardo, F. Tagliaro. Screening for new psychoactive substances in hair by ultra high performance

- liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. **2014**, *1372*, 145.
- [34] M. Barroso, S. Costa, M. Dias, D.N. Vieira, J.A. Queiroz, M. López-Rivadulla. Analysis of phenylpiperazine-like stimulants in human hair as trimethylsilyl derivatives by gas chromatography–mass spectrometry. *J Chromatogr A*. **2010**, *1217*, 6274.
- [35] M. Martin, J.F. Muller, K. Turner, M. Duez, V. Cirimele. Evidence of mephedrone chronic abuse through hair analysis using GC/MS. *Forensic Sci. Int.* **2012**, *218*, 44.
- [36] S.A.B. Shah, N.I.K. Deshmukh, J. Barker, A. Petróczi, P. Cross, R. Archer, D.P. Naughton. Quantitative analysis of mephedrone using liquid chromatography tandem mass spectroscopy: Application to human hair. *J Pharmaceut Biomed.* **2012**, *61*, 64.
- [37] Society of Hair Testing. Recommendations for hair testing in forensic cases. *Forensic Sci. Int.* **2004**, *145*, 83.

ARTÍCULO 3

Hair analysis interpretation of an unusual case of alleged scopolamine-facilitated sexual assault

Ana de Castro, Elena Lendoiro, Óscar Quintela, Marta Concheiro,
Manuel López-Rivadulla, Angelines Cruz

Forensic Toxicology (2012) 30(2):193-198

DOI: 10.1007/s11419-012-0141-x

ISSN: 1860-8965

Resumen: La supuesta víctima de un presunto caso de sumisión química con escopolamina solicitó un análisis toxicológico de pelo. Los disolventes de lavado obtenidos tras la descontaminación de la muestra de pelo fueron evaporados y guardados para su posterior análisis. El pelo fue incubado con 2 mL de tampón fosfato 0,01M (pH 8,4) y los analitos fueron extraídos mediante un procedimiento de purificación líquido-líquido. Se realizó el análisis de los extractos del pelo mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem, y se detectó la presencia de escopolamina a concentraciones menores del límite de cuantificación. Sin embargo, también se detectó escopolamina en el último disolvente de lavado, con un ratio lavado/pelo >4, lo que sugiere una contaminación externa en lugar de un uso sistémico de dicha sustancia. Estos hallazgos enfatizan la importancia de analizar los disolventes de lavado para lograr una correcta interpretación de los resultados toxicológicos en pelo.

<http://link.springer.com/article/10.1007/s11419-012-0141-x/fulltext.html>



ARTÍCULO 4

**Maternal hair analysis for the detection of illicit drugs,
medicines and alcohol exposure during pregnancy**

Elena Lendoiro, Eva González-Colmenero, Ana Concheiro-Guisán, Ana de Castro, Angelines Cruz, Manuel López-Rivadulla, Marta Concheiro

Therapeutic Drug Monitoring (2013) 35(3):296-304

DOI: 10.1097/FTD.0b013e318288453f

ISSN: 0163-4356

Resumen

Antecedentes/Objetivos: El consumo de drogas de abuso durante el embarazo es un grave problema de salud pública y supone un importante coste económico para el sistema de salud. El objetivo de este trabajo fue comparar la entrevista materna y el análisis de pelo para la determinación del consumo de drogas durante el embarazo, y estudiar las relaciones entre la entrevista materna, las concentraciones en pelo y los parámetros clínicos neonatales.

Métodos: Doscientas nueve madres aceptaron participar en el estudio. Tras el parto, fueron entrevistadas y se recolectó una muestra de pelo. Estas muestras de cabello fueron segmentadas en los tres trimestres y fueron analizadas para 35 drogas y fármacos (opioides, cocaína, anfetaminas, Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC), ketamina, metadona, antidepresivos, benzodiazepinas e hipnóticos; con límites de cuantificación 5-100 pg/mg), y para etilglucurónido (límite de cuantificación 10 pg/mg) mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem. El análisis estadístico fue realizado con el test X^2 y el test t .

Resultados: En la entrevista, el 4,3% de las madres declararon el uso de drogas ilícitas durante el embarazo (cocaína 1,4%, THC 2,9% y opiáceos 1%), el 3,3% declaró el uso de fármacos (metadona 1,9%, benzodiazepinas 1,9% y antidepresivos 0,5%), el 21,5% tabaco y el 13,7% alcohol. El análisis de pelo mostró una prevalencia del 15,4% para las drogas ilícitas (cocaína 12,4%, THC 3,8%, opiáceos 1% y ketamina 1%), del 22,5% para fármacos (metadona 3,3%, benzodiazepinas 11%, antidepresivos 9,1%, zopiclona 1% y fentanilo 1,4%) y del 3,9% para alcohol. El síndrome de abstinencia neonatal fue desarrollado por el 8,1% de los neonatos, todos ellos nacidos de madres con elevadas concentraciones de metadona en pelo (>926,2 pg/mg). Se encontró una relación con significancia estadística entre el menor peso y la menor altura de los recién nacidos de aquellas madres que se declararon fumadores en comparación con estos valores neonatales de los niños de las madres no fumadoras ($p < 0,05$).

Conclusiones: El análisis del pelo materno mostró una mejor sensibilidad para detectar el uso de drogas durante el embarazo en comparación con la

entrevista materna, a excepción del alcohol. En este estudio preliminar, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los neonatos expuestos y los no expuestos a drogas o fármacos, a excepción de para el consumo de tabaco.

http://journals.lww.com/drug-monitoring/Abstract/2013/06000/Maternal_Hair_Analysis_for_the_Detection_of.4.aspx



4. DISCUSIÓN



El pelo se ha convertido en una matriz biológica de enorme relevancia en el campo de la Toxicología Clínica y Forense a lo largo de los últimos treinta años, debido, fundamentalmente, a que permite realizar el análisis retrospectivo del consumo de drogas y fármacos, a diferencia de las matrices biológicas tradicionales. Pero, además de su amplia ventana de detección, presenta otras características ya previamente señaladas, como la toma de muestra no invasiva o el almacenamiento sencillo, que hacen de esta matriz una herramienta muy útil en numerosas aplicaciones toxicológicas.

Como esta Tesis Doctoral se ha elaborado por la modalidad de compendio de artículos, se realizará, a continuación, una discusión general, para resaltar los aspectos más destacables de los mismos. Dentro de la misma, se abordarán algunos de los principales retos por afrontar en el análisis de muestras de pelo, especialmente los relacionados con el desarrollo de las metodologías analíticas y la interpretación de los resultados obtenidos. Además, se discutirá el papel del análisis del pelo materno en la detección y diagnóstico de la exposición prenatal a drogas y fármacos, comparando su utilidad con la proporcionada por marcadores indirectos de consumo, como la entrevista materna, o con otros marcadores objetivos, como el análisis toxicológico de otras matrices biológicas.

4.1. DESARROLLO DE METODOLOGÍAS ANALÍTICAS EN PELO

Una de las características esenciales de las metodologías analíticas desarrolladas en pelo es que deben poseer una elevada sensibilidad, ya que los niveles de concentración de drogas y fármacos detectados en esta matriz biológica pueden encontrarse en el rango de los pg/mg, niveles significativamente inferiores a los encontrados en las matrices biológicas tradicionales (ng/mL- μ g/mL).

En esta Tesis Doctoral se han desarrollado y validado dos metodologías analíticas en pelo. En primer lugar, se realizó un método de *screening* para la detección, confirmación y cuantificación de un amplio número de drogas y fármacos de uso común (Artículo 1). En segundo lugar, se desarrolló un

método para la determinación y cuantificación de compuestos anfetamínicos, y nuevas drogas sintéticas (NPS) con efectos estimulantes (catinonas y piperazinas sintéticas), incluyendo además dos fármacos que producen una piperazina sintética como metabolito (Artículo 2). Ambas metodologías emplearon la espectrometría de masas en tándem como sistema de detección, la cual ha probado ser una técnica altamente sensible y adecuada para el análisis de este tipo de muestras [1-3], ya que permite alcanzar los bajos niveles de detección requeridos. En ambos métodos fue posible establecer unos límites de cuantificación (LOQ) iguales o inferiores a los aconsejados por la SoHT para la determinación de exposición o consumo crónico a sustancias de abuso, en su documento de consenso publicado en 2004 [4]. Estos límites son de 200 pg/mg para opioides, 500 pg/mg para cocaína y 50 pg/mg para su principal metabolito (BE), 200 pg/mg para anfetaminas y 100 pg/mg para THC. Sin embargo, en el año 2011 la SoHT publicó una nueva recomendación [5], rebajando el valor de LOQ para la confirmación de THC, que se estableció en 50 pg/mg (el límite de detección (LOD) del método de *screening* desarrollado), mientras que se mantuvo en 100 pg/mg para el *screening*. El método de *screening* aquí desarrollado presenta, por tanto, un LOQ adecuado para el *screening* del THC, pero no para su confirmación, mientras que para el resto de sustancias incluidas en dicho método, los valores de LOQ son inferiores a los recomendados por la SoHT para realizar su confirmación.

Sin embargo, algunas aplicaciones del análisis de pelo requieren la detección del consumo esporádico o, incluso, a dosis única, como los casos de sumisión química. En la bibliografía es posible encontrar referencias sobre los niveles de concentración detectados en pelo tras la exposición controlada a una dosis única de algunas sustancias, como codeína, benzodiazepinas, cotinina, cocaína, ketamina o hipnóticos (Tabla 1). Sin embargo, para muchas otras sustancias no se han descrito este tipo de estudios, y las concentraciones tras este tipo de exposición no son conocidas. Entre las sustancias incluidas en las dos metodologías analíticas desarrolladas en esta Tesis Doctoral, es posible detectar una única exposición a codeína, cocaína, zolpidem, ketamina y lorazepam, tetrazepam, diazepam y nordiazepam, ya que su LOQ fue menor o igual a los niveles descritos en la bibliografía. No obstante, son necesarios más

estudios, ya que para una misma sustancia las concentraciones encontradas en cabello por los diferentes autores pueden diferir significativamente, como en el caso del zolpidem [6-10] y el tetrazepam [11,12].

Tabla 1. Concentraciones encontradas en la bibliografía en muestras de pelo con exposición a dosis única de diferentes drogas y fármacos.

Referencia	Técnica Analítica	Muestra	Sustancia	Dosis (mg)	Concentración máxima (pg/mg)
Wilkins, 1995 [13]	GC-MS	Cabello (arrancado) (n= 2)	Codeína	120	115-4000
Gwent, 1995 [14]	GC-MS	Barba (n= 6)	Cotina Nicotina	4	1800 <LOQ (30)
Callaghan, 1996 [15]	RIA	Barba (n= 6)	Codeína	60	-
Herdenson, 1996 [16]	GC-MS	Cabello (n= 1)	Cocaína deuterada	120-170	282
Rollins, 1996 [17]	GC-MS	Cabello (n= 19)	Codeína	120	30
Negrusz, 2000 [18]	GC-MS	Cabello (n= 2)	CLO 7-AC	2	<LOQ (10) 4,8
Negrusz, 2001 [19]	GC-MS	Cabello (n= 10)	FLU 7-AF	2	<LOQ (2,5) 8
Negrusz, 2002 [20]	GC-MS	Cabello (n= 10)	CLO 7-AC	3	<LOQ (20) 23
Kintz, 2004 [6]	LC-MSMS	Cabello (n= 4)	Zolpidem 7-AF Lorazepam	-* -* -*	4,4-67 5,2 8
Kintz, 2004 [21]	LC-MSMS	Cabello (n= 3)	Lorazepam	2,5	<LOQ (1)
Villain, 2004 [22]	LC-MSMS	Cabello (n= 2)	Bromazepam	6	4,7

4.1. Desarrollo de metodologías analíticas en pelo

		Cabello (n= 3) Pelo púbico (n= 1)		-* -*	0,9-15 4,1
Villain, 2004 [7]	LC-MSMS	Cabello (n= 3)	Zolpidem	10	1,8-9,8
Villain, 2004 [8]	LC-MSMS	Cabello (n= 2)	Zopiclona	7,5	5,4-9,0
Chezè, 2005 [23]	LC-MSMS	Cabello (n= 2)	CLO y 7-AC FLU y 7-AF	-* -*	1,9 y 41,2 <LOQ (2) y 4,2
Concheiro, 2005 [11]	LC-MSMS	Cabello (n= 2) Barba (n= 1)	Tetrazepam	50	Cabello: 123- 176 Barba: 15
Laloup, 2007 [12]	LC-MSMS	Cabello (n= 6)	Tetrazepam Diazepam Nordiazepam	50 10	17,3-59,7 2,3-6,0 Trazas-5,4
Bernert, 2011 [24]	LC-MSMS	Barba (n= 6)	Nicotina Cotinina	4	1,4-70,8 1,3-47,4
Xiang, 2011 [25]	LC-MSMS	Cabello (n= 14) Cabello (n= 2)	Estazolam CLO y 7-AC	1-6 -*	0,56-2,6 1,31-15,5 y 33,47-45,30
Xiang, 2011 [26]	LC-MSMS	Cabello (n= 4)	Ketamina Norketamina	10	2,0-28,4 2,1-38,2
Schräder, 2012 [27]	LC-MSMS	Barba (n= 3)	EtG	153- 200 g	74-242
Cui, 2013 [9]	LC-MSMS	Cabello (n= 20)	Zolpidem	10	135-554,6
Shima, 2015 [10]	LC-MSMS	Cabello (n= 1)	Zolpidem	10	214
* Se desconoce la dosis administrada por tratarse de un caso de supuesta sumisión química					
CLO: Clonazepam; FLU: Flunitrazepam; EtG: Etilglucurónido; RIA: Radioinmunoensayo; 7-AC: 7-aminoclonazepam; 7-AF: 7-aminoflunitrazepam					

Una característica común de las dos metodologías analíticas desarrolladas es que son métodos multianalito, es decir, permiten realizar la detección y cuantificación de sustancias con diversas propiedades psicoactivas y con características químicas diferentes. La principal ventaja que aportan este tipo de metodologías es el ahorro que suponen tanto en el coste del análisis como en el tiempo necesario para realizarlo, así como un mejor aprovechamiento de la muestra disponible. Esto es especialmente relevante en el análisis de muestras de pelo, debido al largo y tedioso proceso analítico al que deben ser sometidas, incluyendo la segmentación del mechón de pelo, el procedimiento de lavado para realizar la descontaminación de las muestras, la extracción de los analitos de la matriz sólida, la purificación de los extractos y el análisis instrumental. Además, es frecuente que la cantidad de muestra de pelo disponible para la realización de los análisis toxicológicos sea baja (50-100 mg), menor a la aconsejada en las recomendaciones de la SoHT sobre la toma de muestra [4,5], e insuficiente para realizar más de uno o dos procedimientos analíticos. Por ello, realizar el análisis del mayor número de sustancias en el mismo proceso analítico y empleando la misma muestra es muy aconsejable en el desarrollo de métodos analíticos para muestras de pelo. En la Tabla 2 se muestran las sustancias incluidas en los métodos multianalito en pelo publicados hasta la fecha.

4.1. Desarrollo de metodologías analíticas en pelo

Tabla 2. Métodos multianálisis para la determinación de drogas y/o fármacos de uso común en pelo.

Referencia	Técnica Analítica	Cantidad pelo (mg)	Sustancias	LOQ (pg/mg)
Cordero, 2007 [28]	GC-MS	50	MOR, 6-AM, COD, hidrocodeína COC, BE, EME, CEt Diazepam, nordiazepam MA, MDMA, MDA	100-200
Kim, 2007 [29]	GC-MSMS	20	A, MA, MDA, MDMA, MDEA Catinona, metcatinona Fentermina, fenfluramina Selegelina, mesacalina Ketamina 4-bromo-2,5-dimetoxifenetilamina	20-100
Klys, 2007 [30]	LC-MSMS	20	MOR, 6-AM, COD COC, BE CEt A, MA, MDA, MDMA, MDEA	50-200
Hegstad, 2008 [31]	LC-MSMS	20	Nicotina, cotinina MOR, 6-AM, COD COC, BE A, MA, MDMA Benzodiazepinas Zolpidem, zopiclona Carisoprodol, meprobamato Buprenorfina, metadona	5-750
Moore, 2008 [32]	GC x GC-MS	10	MOR Fentanilo, carisoprodol,	5

			oxicodona, propoxifeno, tramadol Diazepam Metadona	
Pelander, 2008 [33]	LC-TOF-MS	150-250	Tramadol, metadona, COD, oxicodona A, MA, MDMA Alprazolam Zolpidem Antiepilépticos Antidepresivos Antipsicóticos Betabloqueantes Lidocaína Paracetamol	100-200
Wu, 2008 [34]	GC-MS	25	MOR, 6-AM, COD A, MA, MDA, MDMA, MDEA Ketamina, norketamina	50-100
Bucelli, 2009 [35]	LC-MSMS y LC-MS ³	20-50	MOR, 6-AM, COD COC, BE, EME A, MA, MDA, MDMA, MDEA	20-250
Guthery, 2010 [36]	GC x GC- TOF-MS	20	MOR, 6-AM, COD A, MA, MDA, MDMA Metadona Benzodiazepinas	Cualitativo
Kronstrand, 2010 [37]	LC-MSMS	20	MOR, 6-AM, COD COC, BE A, MA, MDA, MDMA	7-270

4.1. Desarrollo de metodologías analíticas en pelo

			<p>Benzodiazepinas</p> <p>Metadona, buprenorfina</p> <p>Oxicodona, tramadol, fentanilo, propoxifeno</p> <p>THC</p>	
Merola, 2010 [38]	GC-MS	10	<p>COC, CEt</p> <p>A</p> <p>Ketamina</p> <p>Metadona</p> <p>THC</p>	20-370
Nielsen, 2010 [39]	UPLC-TOF-MS	10	<p>MOR, 6-AM, COD</p> <p>COC, BE</p> <p>A, MA, MDA, MDMA, MDEA</p> <p>Benzodiazepinas</p> <p>Hipnóticos</p> <p>Antidepresivos</p> <p>Metadona, buprenorfina</p> <p>Ketamina</p> <p>Fármacos</p>	50-2000
Domínguez-Romero, 2011 [40]	LC-TOF-MS	20	<p>MOR, COD, Heroína</p> <p>COC, BE</p> <p>A, MA</p> <p>THC, CBD</p> <p>Diazepam</p> <p>Metadona</p> <p>Ketamina</p> <p>Fármacos</p>	15-250
Favretto,	LC-HRMS	2,5	MOR, 6-AM, COD	100-500

2011 [41]			<p>COC, BE</p> <p>A, MA, MDA, MDMA, MDEA, MDPA</p> <p>Benzodiazepinas</p> <p>Zolpidem</p> <p>Antidepresivos</p> <p>Olanzapina</p> <p>Metadona, EDDP, buprenorfina, norbuprenorfina</p> <p>Ketamina, norketamina</p>	
Miyaguchi, 2011 [42]	LC-HRMS	0,2	<p>COC, BE</p> <p>A, MA, MDA, MDMA, dimetilanfetamina</p> <p>Ketamina, norketamina</p>	50-500
Aleksa, 2012 [43]	GC-MS	10	<p>MOR, 6-AM, COD</p> <p>COC, BE, CEt, norcocaína</p> <p>A, MA, MDA, MDMA</p> <p>Oxicodona, oximorfona, hidrocodona, hidromorfona, meperidina</p> <p>Metadona</p>	400-600
Broecker, 2012 [44]	LC-QTOF-MS	20	<p>MOR, 6-AM, COD, dihidrocodeína, acetilcodeína</p> <p>COC, BE, EME, CEt</p> <p>A, MA, MDA, MDMA, MDEA</p> <p>Benzodiazepinas</p> <p>Metadona, EDDP</p>	9-21
Di Corcia, 2012 [45]	UPLC-MSMS	50	<p>MOR, 6-AM, COD</p> <p>COC, BE</p> <p>A, MA, MDA, MDMA, MDEA</p>	20-80

4.1. Desarrollo de metodologías analíticas en pelo

			THC Metadona, buprenorfina	
Rust, 2012 [46]	LC-MSMS	2,5	Catinonas sintéticas Piperazinas sintéticas Metilfenidato Ketamina	LOD= 10-50
Zhu, 2012 [47]	Nano-LC-Chip-MSMS	2	MOR, COD, 6-AM COC, BE, CEt, norcocaína A, MA, MDA, MDMA, MDEA PCP Metadona	0,2-1,25
Sergi, 2013 [48]	LC-MSMS	100	MOR, COD, 6-AM COC, BE, norcocaína A, MA, MDA, MDMA, MDEA Ketamina PCP Mescalina	1,8-16
Chang, 2014 [49]	LC-MSMS	10	MOR, COD, 6-AM A, MA, MDA, MDMA Ketamina, norketamina, dehidronorketamina	2-5
Elian, 2014 [50]	LC-MSMS	10	A, MA, MDA, MDMA Butilona, etilona, fletedrona, mefedrona, metilona, mecedrona, metcatinona MDPV, pirovalerona	100
Gottardo, 2014 [51]	LC-QTOF-MS	100	Cannabinoides sintéticos Catinonas sintéticas Feniletilaminas	10-20

Imbert, 2014 [52]	LC-MSMS	50	MOR, COD, 6-AM, heroína, etilmorfina COC, BE, EME, CEt, norcocaína, AEME A, MA, MDA, MDMA, MDEA Catinonas sintéticas m-CPP Metilfenidato	50
Koster, 2014 [53]	LC-MSMS	50	MOR, COD, 6-AM, heroína COC, BE A, MA, MDA, MDMA, MDEA Metilfenidato THC Metadona, EDDP Nicotina, cotinina	30-800
Maublanc, 2014 [54]	LC-MSMS	50	Benzodiazepinas Sedantes Antipsicóticos Antihistamínicos Hipnóticos Tramadol Propoxifeno Metadona Buprenorfina Ketamina LSD Escopolamina	0,5-10
Montesano, 2014 [55]	UPLC-MSMS	10	MOR, COD, 6-AM	2-5000

4.1. Desarrollo de metodologías analíticas en pelo

			<p>COC, BE</p> <p>A, MA, MDA, MDMA</p> <p>Metadona, Norbuprenorfina</p> <p>Ketamina</p> <p>Escopolamina</p> <p>PCP</p> <p>Hipnóticos</p> <p>Benzodiazepinas</p> <p>Antihistamínicos</p> <p>Antidepresivos</p> <p>Antipsicóticos</p> <p>Barbitúricos</p> <p>Sedantes</p> <p>Relajantes musculares</p>	
Strano-Rossi, 2014 [56]	LC-MSMS	30	<p>Catinonas sintéticas</p> <p>Piperazinas sintéticas</p> <p>Cannabinoides sintéticos</p> <p>Ketamina</p>	5-20
<p>A: Anfetamina; AEME: anhidroecgoninametiléster; BE: Benzoilecgonina; CBD: Cannabidiol; CEt: Cocaetileno; COC: Cocaína; COD: Codeína; LSD: Dietilamida de ácido lisérgico; EME: Ecgoninametiléster; EDDP: 2-etilene-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina; MA: Metanfetamina; mCPP: 1-(3-clorofenil)piperazina; MDA: Metilendioxianfetamina; MDEA: Metilendioxietilamfetamina; MDMA: Metilendioximetanfetamina; MDPV: Metilendioxipirovalerona; MDPA: Metilendioxipropilamfetamina; MOR: Morfina; PCP: 1-(1-fenilciclohexil)piperidina; THC: Δ^9-tetrahidrocannabinol; 6-AM: 6-monoacetilmorfina</p>				

Tanto la cromatografía líquida [30,31,33,35,37,39-42,44-56] como la cromatografía gaseosa [28,29,32,34,36,38,43] han sido empleadas para la realización de la separación de los compuestos en métodos multianalito. Sin embargo, el uso de la cromatografía líquida es mayoritario en este tipo de

métodos, ya que permite el análisis simultáneo de un mayor número de compuestos, sin necesidad del paso previo de derivatización. En esta Tesis Doctoral todos los métodos desarrollados han empleado la cromatografía líquida como técnica de separación.

En la mayoría de los métodos multianalito de la bibliografía se incluyen las principales drogas de abuso clásicas (opioides, cocaína y sus metabolitos, y anfetaminas) [28,30,31,35,37,39-41,43-45,47,48,52,53,55], a excepción del THC, que sólo se determina en 5 de estos métodos [37,38,40,45,53]. Kronstrand et al. [37] utilizan dos técnicas de detección diferentes (GC-MS para el THC, y LC-MSMS para el resto de los compuestos), mientras que Merola et al. [38] emplean la misma muestra de pelo, pero la someten a dos incubaciones diferentes (hidrólisis ácida e hidrólisis básica) para la extracción de los analitos de la matriz. Sólo Domínguez-Romero et al. [40], Di Corcia et al. [45] y Koster et al. [53] determinan el THC junto con el resto de las drogas incluidas en sus metodologías, realizando la misma incubación y empleando el mismo método de detección. En el método de *screening* desarrollado en esta Tesis Doctoral también se incluyeron opioides, cocaína y sus metabolitos, anfetaminas y THC, así como otros fármacos de uso común, empleando la misma incubación y el mismo método de extracción y de análisis para las 35 sustancias detectadas, utilizando la misma alícuota de pelo. Los métodos multianalito mencionados anteriormente que permiten la detección de THC [40,45,53], incluyen un menor número de sustancias, pero presentan un tratamiento de la muestra menos tedioso. Di Corcia et al. [45] realiza una inyección directa del líquido de incubación, mientras que Domínguez-Romero et al. [40] y Koster et al. [53] filtran dicho extracto previamente a la inyección. El método de *screening* de esta Tesis Doctoral incluyó la extracción del líquido de incubación, lo que ha permitido incluir un mayor número de sustancias en el *screening*, y prolongar la vida de la columna cromatográfica (más de 5000 inyecciones).

El LOQ obtenido para el THC por estos tres autores (30-40 pg/mg) es inferior al obtenido en el método de *screening* desarrollado en esta Tesis Doctoral (100 pg/mg), pero, por contra, para el resto de sustancias incluidas en los métodos

(como opioides, anfetaminas, cocaína y metabolitos, benzodiazepinas, metadona o ketamina) los LOQ fueron mayores. Además, sólo Koster et al. [53] emplean la misma metodología para la confirmación de los resultados positivos, mientras que Di Corcia et al. [45] y Domínguez-Romero et al. [40] analizan las muestras con un método de confirmación diferente al método de *screening*.

En relación a la determinación de las NPS y anfetaminas clásicas, se han publicado pocas metodologías para su determinación en pelo, y la mayoría de los métodos analíticos desarrollados sólo permiten la identificación y cuantificación de una [57-61] o de un número reducido de sustancias [62-67]. El método multianalito desarrollado en esta Tesis Doctoral permite la identificación y cuantificación de anfetaminas clásicas y de una selección de catinonas y piperazinas sintéticas, además de dos fármacos que se metabolizan a la piperazina mCPP. La determinación conjunta de las anfetaminas clásicas y de las drogas emergentes con efectos estimulantes permite estudiar la prevalencia de estas nuevas drogas y el perfil de consumo de los usuarios de estas sustancias, los cuales pueden modificar sus hábitos y dejar de consumir las anfetaminas clásicas por las nuevas drogas emergentes, o alternar el consumo de ambos grupos. En la bibliografía es posible encontrar sólo tres publicaciones que incluyan alguna NPS y anfetaminas clásicas empleando la misma metodología analítica para su determinación [29,50,52]. Sin embargo, Kim et al. [29], Elian et al. [50] y Imbert et al. [52] presentan un LOQ para estas sustancias muy superior al obtenido con el método analítico desarrollado en esta Tesis Doctoral (20-100 pg/mg, 100 pg/mg y 50 pg/mg, respectivamente, frente a 2-20 pg/mg), lo que impide la detección de consumos esporádicos de estas sustancias.

La extracción de los analitos de la matriz sólida es uno de los principales factores que influyen en la obtención de una adecuada sensibilidad, y que, por tanto, debe ser estudiada durante el desarrollo de metodologías en pelo. Este factor es especialmente significativo en las metodologías multianalito, ya que la elección del disolvente y las condiciones de incubación deben ser adecuadas para la extracción de todos los compuestos. Además, las condiciones elegidas

no deben producir la modificación química de los compuestos, ni la modificación de los ratios entre el principio activo y sus metabolitos.

El estudio de la eficacia de la extracción es difícil de realizar en muestras de pelo, ya que es una matriz sólida y se carece de patrones o muestras de pelo de referencia con concentraciones certificadas para muchas de las sustancias de interés toxicológico. En estas circunstancias pueden emplearse muestras reales de consumidores para la realización de estos experimentos, pero el uso de estas muestras sólo permite el estudio de un número limitado de sustancias (a las que haya estado expuesto el consumidor), y no es posible establecer un valor de referencia de la concentración. Algunos autores han empleado muestras de pelo de personas no expuestas que someten a ultrasonificación en disoluciones acuosas con altas concentraciones de las sustancias de interés para que se unan a la superficie del cabello [35,67,68]. No obstante, esta técnica no está avalada por la SoHT, ya que la incorporación de las moléculas en la fibra de pelo se realiza de forma superficial, y no en el interior de la fibra como ocurre en las muestras reales, lo que origina que siempre se obtenga buenas recuperaciones. Debido a esto, la mayoría de los autores optan por emplear para estos estudios muestras de pelo de no consumidores que fortifican a diferentes niveles de concentración, lo que permite evaluar la estabilidad de los analitos en las condiciones a las que son sometidas las muestras de pelo para realizar la extracción de la matriz, pero no la eficacia real de la extracción de las moléculas de dicha matriz. En cualquier caso, para mejorar la extracción de los analitos de la matriz es aconsejable pulverizar la muestra, ya que permite incrementar la interacción entre la superficie del pelo y el disolvente de extracción. Además, el uso de esta técnica favorece la homogeneidad de la muestra, y no altera químicamente a las drogas incorporadas en el pelo.

En el desarrollo de las metodologías analíticas incluidas en esta Tesis Doctoral se han ensayado la pulverización y la incubación en distintos disolventes para realizar la extracción de los compuestos de interés de la matriz de pelo. En el primer método desarrollado (método de *screening*) fueron evaluados varios disolventes para la incubación de las muestras, entre los que destacan HCl 0,1

4.1. Desarrollo de metodologías analíticas en pelo

N, NaOH 0,01 N, acetonitrilo (ACN) y metanol (MeOH). Como se puede observar en la Figura 1, la solución básica (NaOH 0,01 N), a pesar de ofrecer la mejor recuperación para el THC, no fue adecuada para la mayoría de las sustancias, probablemente porque provoca su degradación química. La solución ácida (HCl 0,1 N) ofreció la mejor recuperación para la mayoría de las sustancias incluidas en el método; sin embargo, para algunos compuestos como 6-AM, THC, zopiclona y nordiazepam, la recuperación obtenida con este disolvente fue la menor. Los disolventes orgánicos ensayados (ACN y MeOH) permitieron obtener buenas recuperaciones para todos los compuestos, aunque la extracción del citalopram y la metadona en MeOH fue escasa (<2%), posiblemente porque los extractos obtenidos con el este disolvente presentaban más interferencias que los obtenidos empleando ACN. Por este motivo, finalmente se seleccionó el ACN como líquido de incubación. En los métodos multianalito es común el uso de disolventes orgánicos para realizar la incubación, especialmente MeOH [30,31,40,43,45,53] y mezclas de MeOH:ACN:Formiato amónico [37,39,44,47,55].

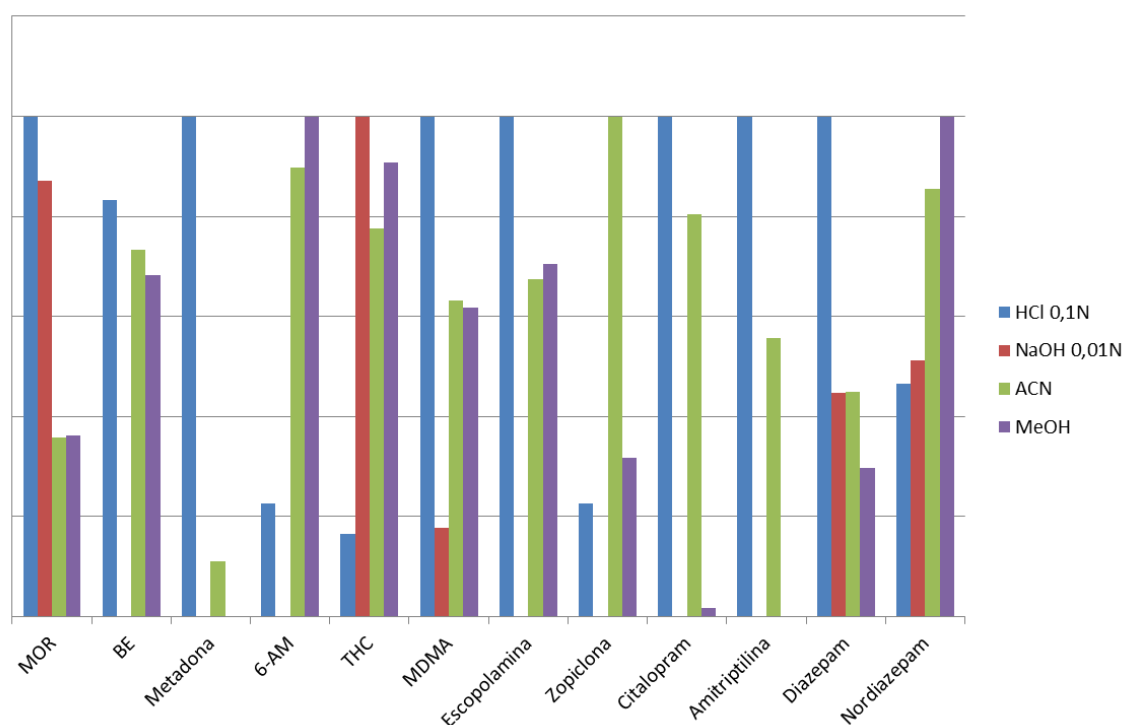


Figura 1. Recuperación obtenida por los disolventes de incubación empleados en el desarrollo del método de *screening* para 12 de las sustancias incluidas en el método descrito en esta Tesis Doctoral (BE: benzoilecgonina; MDMA: metilendioxfanfetamina; MOR: morfina; THC: Δ^9 -tetrahidrocannabinol; 6-AM: 6-acetilmorfina).

Posteriormente a la extracción de los analitos de la matriz del pelo, se realizó la purificación de los extractos mediante una extracción líquido-líquido, seguida de una extracción en fase sólida con cartuchos Strata-X. Empleando ACN como disolvente de incubación y los dos procedimientos de extracción, se obtuvieron eficacias de extracción con valores comprendidos entre 4,1 y 85,6%. En concreto, 18 compuestos (morfina, fentanilo, BE, anfetamina, THC, LSD, escopolamina, 7-aminoflunitrazepam (7-AF), alprazolam, bromazepam, diazepam, triazolam, tetrazepam, zolpidem, zopiclona, citalopram, paroxetina y venlafaxina) presentaron valores de eficacia de la extracción inferiores al 50%. La realización de dos procedimientos de extracción no evitó que 31 de los 35 compuestos presentarán efecto matriz, 27 de ellos con valores de supresión de la señal de -24,6% a -86,2% (morfina, codeína, 6-AM, escopolamina, zopiclona, 7-AF, cocaína, zolpidem, venlafaxina, LSD, fentanilo, citalopram, paroxetina, amitriptilina, metadona, triazolam, fluoxetina, tetrazepam, clomipramina, nordiazepam, oxazepam, alprazolam, clonazepam, lorazepam, flunitrazepam, lormetazepam y diazepam). Sin embargo, en todos los casos se alcanzaron niveles de LOQ suficientemente bajos para la obtención de una adecuada sensibilidad.

En la optimización del disolvente de extracción durante el desarrollo del método para NPS y anfetaminas clásicas, se ensayaron tampón borato pH= 9, MeOH y disoluciones ácidas en MeOH (0,1%, 0,5%, 1% y 5% de HCl) como disolventes de incubación. Tanto con el tampón borato como con el MeOH, las recuperaciones obtenidas para todos los compuestos fueron unas 5 veces menores a las obtenidas con las disoluciones ácidas de metanol, dado el carácter básico de las sustancias incluidas en el método. Entre las disoluciones ácidas, la recuperación óptima fue obtenida con la mezcla de HCl al 0,1% en metanol para todas las sustancias, a excepción de la metilona, que presentó mejores recuperaciones con un porcentaje HCl del 0,5%, como se puede observar en la Figura 2. Disoluciones ácidas, tanto mezclas de MeOH con HCl [29,58,64] como tampón fosfato a pH ácido [52,62], han sido frecuentemente empleadas para la determinación de NPS y/o anfetaminas clásicas.

4.1. Desarrollo de metodologías analíticas en pelo

También en este caso, después de la incubación con HCl al 0,1% en metanol, se realizó una purificación de los extractos mediante una extracción en fase sólida con cartuchos de intercambio catiónico (Strata-X-C), obteniendo valores de eficacia de la extracción superiores al 50% para todos los analitos, a excepción de la trazodona (40,5% al nivel del control de calidad (QC) bajo y 49,4% al nivel de QC alto). Además, sólo tres de los compuestos, mCPP, fenazona y trazodona, mostraron un efecto matriz negativo, con una supresión de la señal de hasta un -75,9%.

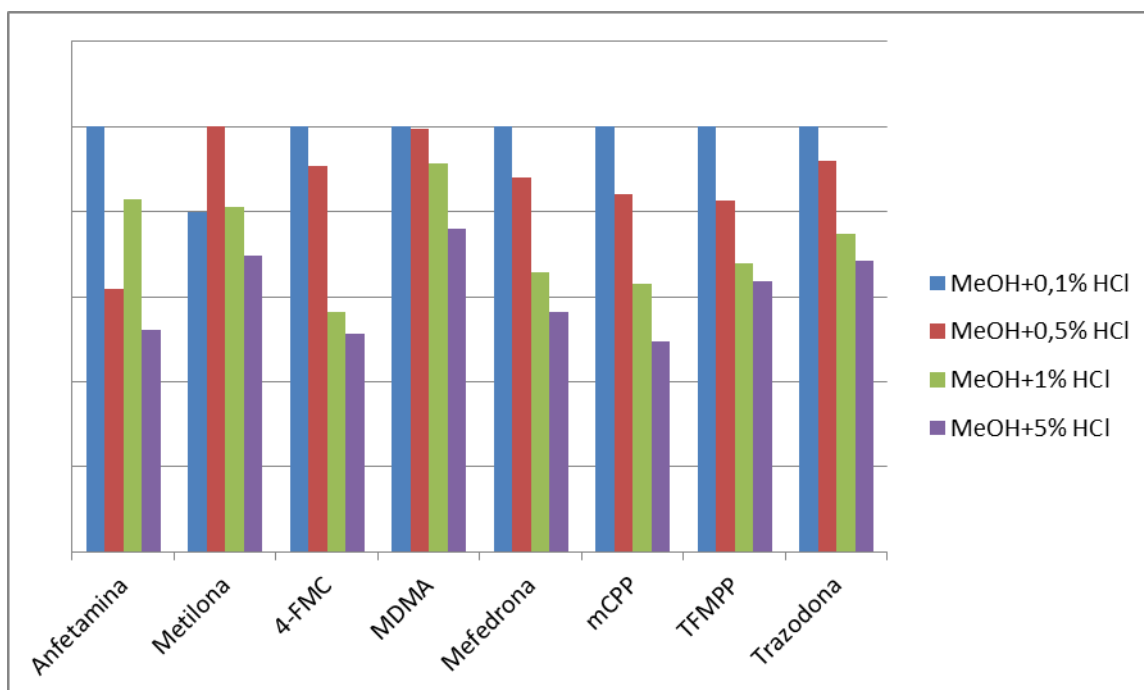


Figura 2. Recuperación obtenida por las disoluciones de incubación (metanol con 0,1%, 0,5%, 1% y 5%) empleadas en el desarrollo del método de NPS para 8 de las sustancias incluidas en el método (mCPP: 1-(3-clorofenil)piperazina; MDMA: metilendioximetanfetamina; TFMPP: 3-trifluorometilfenilpiperazina; 4-FMC: 4-fluorometcatinona).

4.2. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS EN PELO

La correcta interpretación de los resultados toxicológicos de las muestras de pelo requiere de la valoración de múltiples factores, tales como la incorporación de las drogas en el pelo y el papel de la contaminación externa, la variación interindividual en el ratio de crecimiento, el color del pelo y el efecto de los tratamientos cosméticos. Se trata, pues, de un tema complejo, y actualmente se considera la interpretación de los resultados uno de los mayores retos en el correcto análisis toxicológico del pelo.

4.2.1. Efecto de la contaminación externa

La incorporación de las drogas en el pelo se realiza siguiendo un modelo complejo con tres rutas principales, como se indicó en la introducción de esta Tesis Doctoral. La incorporación desde la sangre es la que permite realizar un estudio retrospectivo del consumo. Sin embargo, la incorporación a través del sudor y las secreciones sebáceas y principalmente la exposición pasiva, que constituyen la contaminación externa, son los principales causantes de una errónea interpretación de los resultados, bien por un aumento en las concentraciones o bien por la obtención de resultados falsos positivos. La minimización del efecto de la contaminación externa puede realizarse mediante la realización de lavados sucesivos, el cálculo de ratios entre las concentraciones de metabolitos y principio activo, y el empleo de niveles de corte o *cut-offs*.

La mayoría de los autores [69-73], y también la SoHT en sus recomendaciones [4,5], aconsejan el lavado de las muestras de pelo previamente a su análisis y el estudio posterior de los lavados, o al menos del último lavado realizado, con la finalidad de comprobar la ausencia de las sustancias analizadas en este líquido. Aun así, algunos autores no realizan ningún lavado previo en procedimientos analíticos de *screening* [39,51], y solo en caso positivo realizan un nuevo análisis de confirmación, en el que se incluye el procedimiento de lavado, lo que encarece y prolonga el análisis. Los principales métodos de lavado encontrados en la bibliografía incluyen sucesivos lavados con

diclorometano (DCM) [34-36,43,45,49,53], con acetona [32], combinación de lavados con agua y lavados con acetona [38,42,44,65], y combinación de lavados con isopropanol y tampón fosfato [31,37,48]. También es posible encontrar lavados con jabones o dodecilsulfato sódico (agente tensoactivo aniónico presente en ciertos jabones) [40,41,47]; sin embargo, este tipo de lavado no permite el análisis de las disoluciones de lavado y, por ello, no son aconsejables o, al menos, debe realizarse un lavado orgánico posteriormente que pueda ser analizado.

En los procedimientos descritos en esta Tesis Doctoral, el protocolo de lavado escogido fue la realización de lavados sucesivos con DCM y el análisis del último lavado tras la adición de la cantidad correspondiente de patrón interno. El DCM está considerado como un disolvente de lavado apropiado, ya que permite eliminar la contaminación superficial de la fibra de pelo, sin extraer las sustancias incorporadas en su interior [74]. En todos los casos analizados de con el método de *screening*, tanto los de rutinaria del laboratorio (Artículo 1) como los estudiados para evaluar el consumo de drogas durante el embarazo (Artículo 4), se han obtenido niveles de concentración en el último lavado que cumplen el criterio de establecido por Baumgartner et al. [75] y por Tsanaclis et al. [76]. Es decir, el ratio entre la concentración encontrada en el último lavado y la concentración del interior del pelo fue menor a 0,1, y por tanto se considera que la contaminación externa fue totalmente eliminada en todos los casos analizados. Lo mismo fue observado en los casos analizados con el método para la determinación de NPS y anfetaminas clásicas.

Como excepción, cabe destacar el trabajo presentado en esta Tesis Doctoral sobre un supuesto caso de sumisión química con escopolamina (Artículo 3), en el que las concentraciones encontradas fueron muy superiores a las detectadas en el interior del pelo. Concretamente, los ratios entre las áreas de los lavados y las áreas del interior del pelo fueron superiores a 4,6, lo que indica la contaminación externa con escopolamina de las muestras analizadas. Este caso, en el que la contaminación externa fue deliberadamente provocada por la presunta víctima, pone de manifiesto la relevancia del análisis de los lavados para evitar falsos positivos. En la bibliografía es posible encontrar

ejemplos de falsos positivos por contaminación externa [77-83], especialmente a aquellas sustancias que se consumen fumadas como el cannabis, heroína, cocaína, metanfetamina, etc [77-79], pero también por el simple manejo de estas sustancias o la exposición a un ambiente contaminado por parte de individuos no consumidores [80-83]. Sin embargo, la posibilidad de una contaminación ambiental con escopolamina es muy reducida, ya que su administración es por vía oral y la manipulación necesaria para su consumo es mínima. Además, en todos los casos consultados en la bibliografía, la contaminación fue deliberadamente realizada por el laboratorio para evaluar diferentes protocolos de eliminación de la misma, y no se han encontrado otros casos similares con una contaminación realizada por el propio sujeto para obtener intencionadamente un falso positivo.

Otro mecanismo para minimizar el efecto de la contaminación externa es la detección de metabolitos, y el estudio de ratios entre estos metabolitos y los principios activos correspondientes. Según el criterio establecido por la SAMHSA, un ratio de BE/cocaína mayor de 0,05 se corresponde con un consumo activo de cocaína [84]. Como se puede observar en la Tabla 3, todos los casos analizados con el método de *screening* desarrollado en esta Tesis Doctoral con un resultado positivo para estas sustancias (> LOQ) presentan un ratio mayor de 0,21. Además esta organización establece un ratio de 6-AM/morfina mayor de 1,3 para asegurar el consumo de heroína, y como se puede observar en la Tabla 4, todos los casos analizados con el método de *screening* y que presentaron un resultado positivo (> LOQ) muestran un ratio mayor de 4,0. Sin embargo, para otras sustancias no existen o no están establecidos unos ratios similares que permitan establecer un consumo activo

4.2. Interpretación de los resultados en pelo

Tabla 3. Ratio entre la concentración de benzoilecgonina (BE) y cocaína en los casos positivos a estas sustancias analizados con el método de *screening* desarrollado en esta Tesis Doctoral.

CASO	Cocaína (pg/mg)	BE (pg/mg)	Ratio BE/Cocaína
S1	535,0	509,0	0,95
S2	88,1	85,4	0,97
S3	307,9	326,0	1,06
S6	467,9	467,5	1,00
S7	117,4	120,7	1,03
S8	424,0	432,7	1,02
S9	6103,5	6101,0	1,00
S10	137,0	134,6	0,98
M1_T1	379,9	365,6	0,96
M1_T2	247,8	234,8	0,95
M1_T3	158,7	142,6	0,90
M2_T1	50604,8	46668,1	0,92
M2_T2	17192,4	14661,7	0,85
M2_T3	8860,3	7075,9	0,80
M5_T1	41,0	40,2	0,98
M5_T2	41,8	41,7	1,00
M5_T3	26,8	24,6	0,92
M51_T1	566,9	464,6	0,82
M51_T2	501,0	452,3	0,90
M51_T3	337,3	251,9	0,75
M62_T1	119,4	137,8	1,15
M62_T2	65,4	52,3	0,80
M62_T3	33,3	17,1	0,51

M73_T1	372,8	247,9	0,66
M73_T2	192,9	162,6	0,84
M73_T3	140,8	137,3	0,98
M76	478,5	358,8	0,75
M97_T1	153,8	152,7	0,99
M108	171,2	36,5	0,21
M116	47,8	31,8	0,67
M149	68,2	40,9	0,60
M150	130,3	107,3	0,82
M162	69,9	51,0	0,73
M183	86,4	56,3	0,65
M190	286,2	208,6	0,73
M199	907,0	592,0	0,65
M211	533,8	344,4	0,65
M214_T1	1161,0	864,7	0,74
M214_T2	1383,4	1029,4	0,74
M214_T3	558,3	424,9	0,76
M216_T1	1080,2	785,3	0,73
M216_T2	711,7	335,7	0,47
M216_T3	335,7	229,5	0,68

4.2. Interpretación de los resultados en pelo

Tabla 4. Ratio entre la concentración de 6-monoacetilmorfina (6-AM) y morfina entre los casos positivos a 6-AM analizados con el método de *screening* desarrollado en esta Tesis Doctoral.

CASO	6-AM (pg/mg)	Morfina (pg/mg)	Ratio 6-AM/morfina
S5	18265,1	3869,6	4,7
M2_T1	15657,1	2397,8	6,5
M2_T2	7335,8	1814,8	4,0
M2_T3	6061,3	1274,6	4,8
M216_T1	1814,0	297,9	6,1
M216_T2	1955,3	323,3	6,0
M216_T3	1634,9	327,6	5,0

Por último, es posible emplear *cut-offs* que permitan establecer los niveles de concentración que aseguran el consumo crónico con el fin de minimizar el efecto de la contaminación externa. Estos niveles han sido establecidos para las principales drogas de abuso por la SoHT en sus sucesivas recomendaciones [4,5]. En la aplicación del método para la identificación de consumo de sustancias psicoactivas durante el embarazo (Artículo 4) se han empleado estos niveles de corte para diferenciar un consumo crónico durante la gestación (concentraciones superiores al *cut-off* establecido por la SoHT), un consumo esporádico (concentraciones entre el *cut-off* de la SoHT y el LOQ del método analítico) y la ausencia de consumo o exposición (niveles inferiores al LOQ o resultados negativos). En este estudio, 8 mujeres fueron consumidoras crónicas de cocaína y 18 fueron consumidoras esporádicas durante el embarazo; 6 fueron consumidoras crónicas de cannabis y 2 esporádicas; y las consumidoras de anfetaminas (n= 1) y de heroína (n= 2) fueron todas consumidoras crónicas.

Por tanto, la minimización del efecto de una posible contaminación externa en el análisis de muestras de pelo debe realizarse como una combinación del análisis del último lavado, la presencia de metabolitos y su ratio con el

compuesto sin metabolizar, y el uso de niveles de corte que permitan establecer el consumo crónico o esporádico de dichas sustancias.

4.2.2. Efecto de la variabilidad interindividual en el ratio de crecimiento del pelo

El ratio de crecimiento del pelo presenta una variación interindividual que afecta a la interpretación de los resultados analíticos obtenidos al realizar análisis retrospectivo del consumo, especialmente, en el análisis segmental de las muestras de pelo. La SoHT ha establecido un ratio medio de crecimiento de 1 cm/mes [4,5] pero, como puede observarse en la Tabla 4, los valores medios observados en la bibliografía oscilan entre 0,86 y 1,12 cm/mes. Además, como evidenció Harkey [85], es posible observar ratios de crecimiento extremos de hasta 3,36 cm/mes.

Tabla 4. Ratios de crecimiento del cabello humano encontrados en la bibliografía.

Referencia	Rango del ratio de crecimiento del pelo (cm/mes)		
	Mínimo	Máximo	Media
Harkey [85]	0,6	3,36	-
Myers et al. [86]	0,84	1,15	0,98
Barman et al. [87]	-	-	0,94
Pecoraro et al. [88]	0,76	0,96	0,86
Miyazawa et al. [89]	0,84	1,37	1,12
Potsch [90]	0,65	2,2	1,4
Pragst et al. [91]	0,6	1,5	-
Van Neste [92]	0,95	1,12	1,04
Lee et al. [93]	-	-	1,04
Tajima et al. [94]	0,73	1,48	1,11

Además, el ratio de crecimiento del pelo también varía en función del origen anatómico de la muestra, siendo el cabello de la zona del vértex posterior el que presenta un mayor ratio en comparación con otras localizaciones anatómicas como pubis, axila, brazos y piernas [95]. Asimismo, el porcentaje de pelo en fase de crecimiento o fase anágena también varía en función de la localización anatómica del pelo [85]. En general se han observado mayores concentraciones de drogas en las muestras de pelo corporal que las encontradas en el cabello, fundamentalmente por su mayor porcentaje de pelo en fase de reposo o fase telógena, la mayor exposición al sudor y al sebo, la menor exposición a la luz y a tratamientos cosméticos, y presentar un ratio de crecimiento más lento que el cabello [96-100].

En los niños menores de un año el ratio de crecimiento del pelo es muy cambiante, oscilando entre un 0,6 cm/mes al nacimiento, aumentando posteriormente a 0,9-1,5 cm/mes, y estabilizándose finalmente en 1 cm/mes al año de vida [101]. Esta variación en el ratio de crecimiento, y la posible contribución de la exposición intraútero en las concentraciones detectadas en el cabello durante el primer año de vida, dificultan enormemente la interpretación de estos resultados en los niños menores de un año.

Las posibles variaciones en el ratio de crecimiento deben tenerse en consideración durante la interpretación del resultado analítico para ajustar correctamente la franja temporal que ha sido analizada y realizar correctamente el estudio retrospectivo de consumo. Además, la toma de muestra debe realizarse cortando el mechón lo más próximo al cuero cabelludo, ya que si no los cálculos realizados para determinar la franja temporal de cada segmento serán erróneos. LeBeau et al. [102] observaron que incluso aquellas personas expertas en la toma de muestra dejaban remanentes de pelo de hasta 1,6 cm, con una media de 0,7 cm, en el cuero cabelludo tras la toma de muestra.

4.2.3. Efecto del color de pelo

La incorporación de las drogas y sus metabolitos a la fibra del pelo se realiza por unión a componentes que conforman las células pilosas, siendo la

melanina una de las moléculas por la que estas sustancias presentan una mayor afinidad, como se describió en la introducción. Debido a los mayores niveles de melanina en los pelos oscuros, el pelo pigmentado tiene una mayor afinidad por esta unión, y por tanto el pelo de color oscuro presentará mayores concentraciones de estas sustancias que el pelo claro [103-107]. Sin embargo, este efecto de variación en la incorporación de las sustancias en función del color de pelo está altamente influenciado por la basicidad de las moléculas que se incorporan, y se ha observado que en las sustancias no básicas este efecto no se aprecia [105,108-110].

4.2.4. Efecto de los tratamientos cosméticos

Tratamientos cosméticos como tintes, mechas o permanentes causan un daño en la fibra capilar, aumentan su porosidad y eliminan parte o la totalidad del pigmento natural del pelo, lo que provoca una disminución de las concentraciones de drogas y/o fármacos incorporados en el interior de la fibra capilar, y puede alterar las relaciones entre el principio activo y sus metabolitos por hidrólisis de los mismos [111,112]. Por ello, es recomendable documentar previamente a la toma de muestra los tratamientos cosméticos realizados [69], y considerar que las concentraciones detectadas tras el análisis hayan podido sufrir una disminución por el tratamiento cosmético.

Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral se analizaron dos mechones del cabello de un policonsumidor de drogas y fármacos con el método de *screening*. Un mechón no había sido tratado cosméticamente, mientras que el otro mechón presentaba una decoloración, pero ambos se recogieron simultáneamente. Como puede observarse en la Tabla 5, el mechón no tratado cosméticamente fue positivo a heroína (con presencia de morfina, codeína y 6-AM) y cocaína (con presencia de cocaína y BE), con concentraciones superiores a los *cut-offs* de la SoHT para la determinación de consumo crónico [4,5]; y también presentó resultados positivos (con valores superiores al LOQ del método analítico) a zolpidem, citalopram paroxetina, metadona, fentanilo, anfetamina, alprazolam y nordiazepam en los tres segmentos analizados. En

cambio, el mechón tratado cosméticamente fue positivo a citalopram, paroxetina y metadona (sólo el segmento 1 presentó valores superiores al LOQ para estos dos compuestos), anfetamina, alprazolam, morfina, codeína, 6-AM, cocaína y BE en los tres segmentos, con valores de concentración inferiores a las encontradas en el mechón no tratado. El cálculo del porcentaje de la diferencia (% de diferencia) entre el pelo no tratado y el tratado cosméticamente indicado en la Tabla 5 se realizó según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de diferencia} = \frac{(\text{Conc pelo no tratado} - \text{Conc pelo tratado})}{\text{Conc pelo no tratado}} * 100$$

Los % de diferencia mostraron valores entre 47 y 100%, pero para la mayoría de los compuestos (zolpidem, citalopram, paroxetina, codeína, morfina, metadona, BE, cocaína, nordiazepam y fentanilo) este valor fue superior al 80%. En la bibliografía es posible encontrar estudios sobre el efecto de distintos tratamientos cosméticos en las concentraciones de drogas como cocaína [111,113-116], opioides [111,113,117], anfetaminas [118-120], cannabis [111], benzodiazepinas [114] y etilglucurónido [121-124]. Sin embargo, no se han realizado estudios para otros fármacos presentes en el pelo analizado en esta Tesis Doctoral, como antidepresivos e hipnóticos, que presentaron diferencias superiores al 96%. Para el resto de las sustancias, según la bibliografía, los % de diferencia determinados para cabellos sometidos a decoloración por mechas fueron de 24,6-66,2% para la cocaína y de 36,4-67,3% para la BE [111,113,114], inferiores a los encontrados en este estudio (94,9% y 95,6%, respectivamente). Lo mismo sucede con los valores para la anfetamina, los cuáles fueron superiores (53,7-74%) a los encontrados en la bibliografía (20-39%) [118,119]. En cambio para los opioides, los valores de % de diferencia en el cabello analizado (83,9-90,6%, 92,3-93,6% y 47-77,5% para morfina, codeína y 6-AM, respectivamente) fueron similares a los establecidos en la bibliografía, concretamente 67,4-94% para la morfina, 57,5-100% para la codeína y 65,9-93% para la 6-AM [111,113,114,117]. Por último, el nordiazepam presentó un % de diferencia del 100% en este caso, mientras que Yegles et al. [114] encontraron disminuciones del 67,7%.

La pronunciada disminución en las concentraciones de las sustancias incorporadas en este cabello pueden atribuirse al uso de tratamientos cosméticos más agresivos (como las mechas), que producen una mayor disminución en las concentraciones que otros tratamientos menos agresivos como el tinte, como probaron Jurado et al. [111]. A pesar de estas elevadas diferencias, el consumo crónico de heroína y cocaína pudo ser confirmado en ambas muestras (con o sin tratamiento cosmético), ya que en ambos casos las concentraciones fueron superiores al *cut-off* establecido por la SoHT para la determinación de consumo crónico. Además, el % de diferencia de la 6-AM fue incrementándose al aumentar la distancia a la raíz (47,0%, 64,2% y 77,5% en los segmentos 1, 2 y 3, respectivamente), y aunque este aumento no se observó para el resto de las sustancias, podría atribuirse a que el pelo con mayor antigüedad presenta mayor daño y un aumento de la porosidad, lo que favorece la eliminación de las sustancias incorporadas a su interior.

De las 209 muestras de pelo de mujeres que fueron analizadas con el método de *screening* para determinar la exposición a drogas y fármacos intraútero (Artículo 4), más de la mitad (53,6%, n= 112) habían sido sometidas a algún tratamiento cosmético (tinte o mechas), y un 29,2% (n= 61) presentaron al menos un resultado positivo a alguna de las sustancias incluidas en el método de *screening*. Sin embargo, el porcentaje de resultados positivos fue similar en ambos tipos de cabello, tratados o no tratados cosméticamente, pues un 14,8% (n= 31) de los resultados positivos se obtuvieron en pelos que habían sido tratados cosméticamente, y un 14,4% (n= 30) de los resultados positivos en pelos no tratados. Además, no hubo diferencias en el porcentaje de cabellos que había sido sometidos a tratamientos cosméticos y los que no entre los casos con concentraciones superiores al *cut-off* de la SoHT para la determinación de consumo crónico de drogas de abuso. Concretamente, de los 12 casos con concentraciones superiores al *cut-off* de la SoHT, 7 de las muestras habían sufrido algún tratamiento cosmético y 5 no. Asimismo, de los 26 casos con resultados positivos a drogas de abuso y con valores de concentración inferiores al *cut-off* de la SoHT, 11 habían sido tratados cosméticamente y 15 no.

4.2. Interpretación de los resultados en pelo

Tabla 5. Concentraciones detectadas en dos mechones (con y sin tratamiento cosmético de decoloración) del mismo individuo analizados con el método de *screening* desarrollado en esta Tesis Doctoral, y el porcentaje de diferencia encontrado en el pelo tratado cosmético en relación al pelo no tratado.

Pelo sin tratamiento cosmético			Pelo con tratamiento cosmético			% de diferencia
Segmento	Compuesto	Concentración (pg/mg)	Segmento	Compuesto	Concentración (pg/mg)	
S1 (2cm)	Zolpidem	121,7	S1 (2cm)	Zolpidem	-	100,0%
	Citalopram	15086,5		Citalopram	193,8	98,7%
	Paroxetina	362,0		Paroxetina	5,6	98,4%
	Morfina	2025,6		Morfina	326,5	83,9%
	Codeína	888,7		Codeína	68,6	92,3%
	6-AM	5490,4		6-AM	2911,1	47,0%
	Metadona	192,8		Metadona	19,7	89,8%
	Fentanilo	12,5		Fentanilo	-	100,0%
	Anfetamina	130,7		Anfetamina	60,5	53,7%
	BE	16676,1		BE	741,2	95,6%
	Cocaína	19583,3		Cocaína	1005,7	94,9%
	Nordiazepam	7,1		Nordiazepam	-	100,0%
S2 (2cm)	Zolpidem	150,4	S2 (2cm)	Zolpidem	-	100,0%
	Citalopram	9112,8		Citalopram	110,2	98,8%
	Paroxetina	140,5		Paroxetina	< LOQ	-
	Morfina	2615,4		Morfina	285,5	89,1%
	Codeína	873,3		Codeína	55,7	93,6%
	6-AM	7920,1		6-AM	2835,8	64,2%
	Metadona	151,3		Metadona	<LOQ	-
	Fentanilo	28,3		Fentanilo	-	100,0%
	Anfetamina	172,8		Anfetamina	45,0	74,0%
	BE	>20000		BE	338,3	-
	Cocaína	>20000		Cocaína	584,3	-
	Nordiazepam	11,7		Nordiazepam	-	100,0%

S3 (2cm)	Zolpidem	140,1	S3 (2cm)	Zolpidem	-	100,0%
	Citalopram	7308,2		Citalopram	101,6	98,6%
	Paroxetina	96,3		Paroxetina	<LOQ	-
	Morfina	2333,0		Morfina	219,1	90,6%
	Codeína	696,6		Codeína	45,5	93,5%
	6-AM	8841,5		6-AM	1993,1	77,5%
	Metadona	166,3		Metadona	<LOQ	-
	Fentanilo	9,1		Fentanilo	-	100,0%
	Anfetamina	182,1		Anfetamina	67,7	62,8%
	BE	>20000		BE	295,4	-
	Cocaína	>20000		Cocaína	537,3	-
	Nordiazepam	12,5		Nordiazepam	-	100,0%

4.2.5. Correlación dosis/concentración en pelo

Todos estos factores que pueden influir en los resultados analíticos en pelo (variaciones interindividuales en el ratio de crecimiento y en el color del pelo, la forma de consumo de las sustancias, el grado de contaminación externa, los tratamientos cosméticos, etc) dificultan la interpretación de los resultados y no permiten establecer una buena correlación entre las dosis consumidas y los resultados cuantitativos detectados en pelo [125-128]. Si bien algunos autores han encontrado ciertas correlaciones intraindividuales, suele existir una alta variabilidad interindividual [129-131].

Ropero-Miller et al. [129] realizaron un estudio controlado en el que administraron a 8 individuos dosis bajas la primera semana y dosis altas la segunda, alternando cada día cocaína por vía subcutánea (75 mg/70 kg y 150 mg/70 kg, respectivamente) con codeína por vía oral (60 mg/70 kg y 120 mg/70 kg, respectivamente). Encontraron para cada individuo una correlación entre la dosis administrada de estas sustancias y las concentraciones encontradas en pelo, ya que la concentración media detectada a dosis bajas fue aproximadamente la mitad de la encontrada a dosis altas. Sin embargo, observaron una elevada variabilidad interindividual en la disposición de cocaína

y codeína en pelo, y en las concentraciones máximas detectadas para ambos compuestos a las dosis estudiadas. Este mismo comportamiento fue observado por Scheidweiler et al. [130] en un estudio similar. Poletini et al. [131] realizaron la administración controlada de metanfetamina a 7 voluntarios que recibieron dosis bajas (10 mg) y altas (20 mg) 4 veces durante 1 semana, observando también correlaciones intraindividuales, ya que la concentración en pelo a dosis alta fue el doble de la encontrada a dosis baja. Sin embargo, tampoco en este caso fue posible establecer correlaciones interindividuales, ya que los valores de concentración máxima y de área bajo la curva fueron muy diferentes para cada individuo.

En cambio, Kintz et al. [125] no pudieron establecer una correlación entre las dosis recibidas (30-800 mg/día) y las concentraciones de opioides detectados en el pelo de 20 individuos incluidos en un programa de mantenimiento de heroína (coeficiente de correlación ($r= 0,346$), a pesar de realizarse la administración de la heroína bajo condiciones controladas. No obstante, observaron que aquellos compuestos con una mayor vida media en plasma presentaron mejor correlación con la dosis ($r= 0,12$; $0,25$ y $0,64$ para heroína, 6-AM y morfina, respectivamente). Musshoff et al. [132], en un estudio en el que se evaluaron las mismas sustancias, encontraron una mejor correlación entre las dosis recibidas (10 a 1000 mg/día) y las concentraciones de opioides en el pelo de 46 individuos incluidos en un programa de mantenimiento de heroína ($r= 0,66$). Como en el estudio anterior, aquellas sustancias con una mayor vida media en plasma presentaron mejores valores de correlación ($r= 0,42$; $0,59$ y $0,69$ para heroína, 6-AM y morfina, respectivamente).

En la aplicación del método para NPS y anfetaminas clásicas desarrollado en esta Tesis Doctoral (Artículo 2) se analizaron 9 muestras de pacientes a tratamiento crónico con el antidepresivo trazodona. Se analizaron los 2 cm proximales de cada mechón ya que los pacientes habían recibido las mismas dosis diarias (de 50 a 500 mg) durante al menos los dos meses previos a la toma de muestra. No se pudo establecer una correlación significativa entre las dosis diarias administradas y las concentraciones de trazodona detectadas (Figura 3), pero sí se encontró dicha correlación entre las dosis diarias y las

concentraciones del metabolito mCPP (Figura 4), si bien el número de casos analizados fue reducido. El grado de correlación encontrado fue similar al calculado por Welp et al. [126] para las dosis diarias declaradas por 95 individuos y las concentraciones de cocaína, heroína, metadona y derivados anfetamínicos en sus muestras de pelo ($r = 0,45-0,59$, dependiendo del compuesto). Estos autores mejoraron el grado de correlación ($r = 0,63-0,87$) cuando incluyeron el color del pelo, el sexo y la raza en el cálculo.

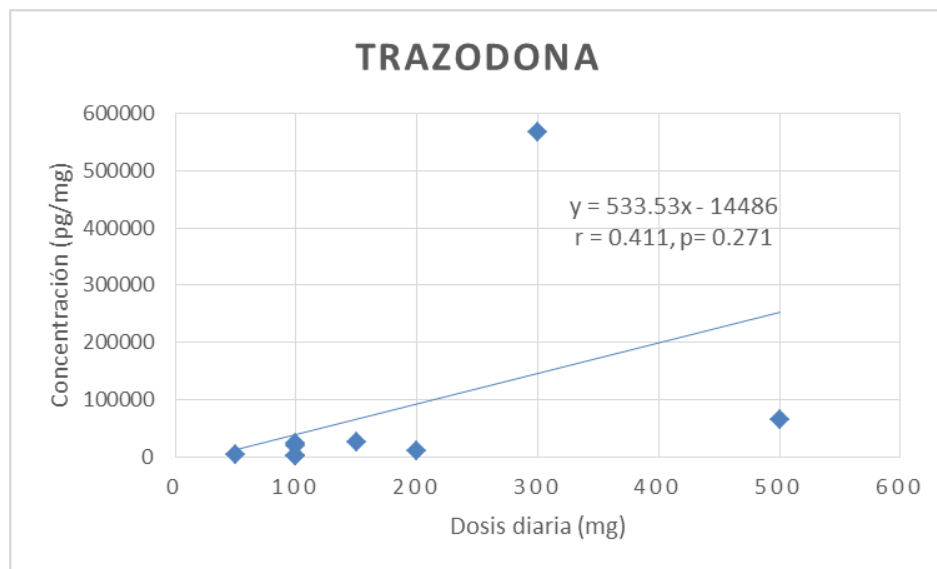


Figura 3. Estudio de la correlación entre las dosis de trazodona recibidas y las concentraciones de este compuesto encontradas en el análisis de 9 cabellos de pacientes a tratamiento diario con este antidepresivo.

4.2. Interpretación de los resultados en pelo

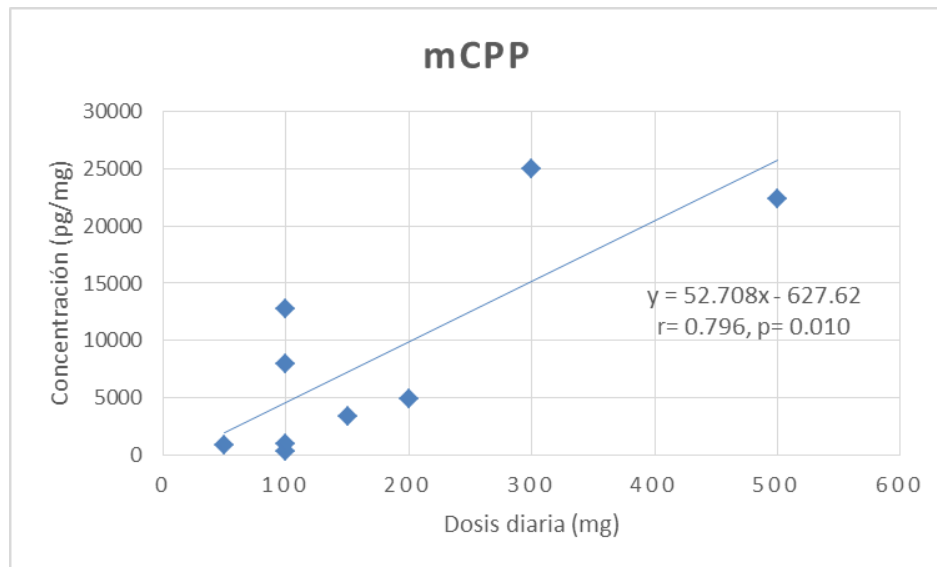


Figura 4. Estudio de la correlación entre las dosis de trazodona recibidas y las concentraciones del metabolito mCPP encontradas en el análisis de 9 cabellos de pacientes a tratamiento diario con dicho antidepresivo.

4.3. APLICACIÓN DE LOS ANÁLISIS DE PELO: EXPOSICIÓN A DROGAS INTRAÚTERO

Los análisis de pelo han sido utilizados en el estudio de la exposición prenatal a drogas de abuso, fármacos, alcohol y tabaco debido a que esta matriz biológica presenta una amplia ventana de detección y permite un estudio retrospectivo del consumo. La exposición a estas sustancias durante el embarazo puede causar problemas tanto en la madre como en el feto. Así están descritas complicaciones obstétricas tales como infecciones y abortos; problemas en el desarrollo fetal, tales como retraso en el crecimiento intrauterino, prematuridad, malformaciones, daños neurofisiológicos y síndrome de abstinencia; y problemas a largo plazo en el niño, tales como disfunciones conductuales [133-139].

En esta Tesis Doctoral se han analizado muestras de pelo materno de 209 mujeres con el método de *screening* previamente desarrollado (Artículo 1). Los resultados analíticos fueron comparados con la información proporcionada por las madres en el cuestionario estructurado que respondieron después del parto, y con los parámetros clínicos neonatales (Artículo 4), demostrando la eficacia de esta muestra para determinar la exposición intraútero.

4.3. Exposición a drogas intraútero

Tabla 6. Revisión bibliográfica del uso del pelo como matriz biológica para la determinación de la exposición intraútero a drogas, fármacos, alcohol y tabaco.

Referencia	Sustancias	Técnica analítica	LOQ en pelo (ng/mg)	Población	Tipo de muestra	Resultados
Graham, 1989 [140]	BE	RIA	5 ng/mL	N= 16, con declaración de consumo de cocaína (ocasional o frecuente) durante el embarazo	Orina materna	Todas las muestras fueron negativas
					Cabello neonatal (n= 7)	5 de los 7 casos mostraron signos clínicos de consumo de cocaína durante el embarazo (BE= 200-27500 ng/g)
					Cabello materno	Consumidoras ocasionales (n= 3): BE= 32-1210 ng/g Consumidoras frecuentes (n= 13): BE= 640-29089 ng/g
Callahan, 1992 [141]	COC, BE	EMIT, FPIA, RIA y GC-MS	150 ng/mL	N= 59, con sospecha de consumo de cocaína	Orina neonatal (n=46)	38% de las muestras fueron positivas
					Mieconio (n= 56)	52% de las muestras fueron positivas
					Cabello neonatal (n= 53)	42,3% de las muestras fueron positivas (78% de las que reconocieron consumo)
					Cabello materno (3 segmentos de 3,9 cm)	67,8% de las muestras fueron positivas

						Entrevista personal	69,5% reconocieron el consumo
DiGregorio, 1993 [142]	COC, BE, CEt	GC-MS	-	N= 18		Cabello materno	15 muestras fueron positivas a COC y BE 10 muestras fueron positivas a CEt
						Entrevista personal	13 mujeres admitieron el consumo de cocaína (todas con resultado positivo en pelo) y 10 el consumo de alcohol (9 con resultado positivo en pelo)
Kintz, 1993 [143]	Nicotina MOR	GC-MS	LOD= 0,01 y 0,1	N= 40, con declaración de consumo de heroína (n= 9) y tabaco (n= 40) durante el embarazo		Orina neonatal	4 muestras fueron positivas a heroína (MOR y 6-AM) 16 muestras fueron positivas a tabaco (cotinina)
						Cabello neonatal (n=9)	Todas las muestras fueron positivas, con concentraciones de 0,11-11,8 y 0,61-3,47 ng/mg para nicotina y MOR, respectivamente
						Cabello materno	Todas las muestras fueron positivas, con concentraciones de 0,37-63,5 y 0,62-27,1 ng/mg para nicotina y MOR, respectivamente
Potter,	COC, BE	RIA y GC-MS	-	N= 1, con		Orina neonatal	Negativa

4.3. Exposición a drogas intraútero

1994 [144]	Nicotina, cotinina				declaración de consumo de cocaína y tabaco durante el embarazo	Meconio Cabello neonatal Cabello materno	Negativa a cocaína y trazas de nicotina Negativo para COC y positivo a nicotina y cotinina (3,0 y 0,1 ng/mg, respectivamente) Positivo a COC (0,8-3,1 ng/mg de BE) y tabaco (11,8-23,4 y 0,2-0,3 ng/mg, para nicotina y cotinina, respectivamente)
Sallee, 1995 [145]	COC, BE	RIA	-	N= 67		Orina materna Cabello neonatal	34 muestras positivas 28 muestras positivas
Chiarotti, 1996 [146]	COC, BE	RIA y GC-MS	-	N= 615, 549 fueron partos a término y 66 abortos espontáneos		Pelo púbico	1,9% de resultados positivos, de los cuales el 6,0% eran casos de aborto espontáneo y el 1,4% eran casos de parto a término
Strano-Rossi, 1996 [147]	COC, BE	RIA y GC-MS	2	N= 123, neonatos con patologías o malformaciones		Cabello neonatal Entrevista personal	2,4% de resultados positivos (2,5-4 ng/mg de BE y trazas de cocaína) 1 mujer admitió consumo de opiáceos y metadona durante el embarazo, y 1 admitió consumo de heroína antes del embarazo

Kline, 1997 [148]	COC, BE	RIA	0,2	N= 397	Orina materna (n= 377)	5 mujeres admitieron consumo de tabaco
						20% de resultados positivos
Ursitti, 1997 [149]	COC, BE	RIA	-	N= 182, con sospecha de consumo de cocaína	Cabello materno (1 segmento que representa todo el embarazo)	59% de resultados positivos
					Entrevista personal	14,4% admitió consumo en los 6 meses previos
					Orina materna	Negativas
Markovic, 2000 [150]	COC, BE	RIA	-	N= 789, con menos de 22 semanas de gestación	Cabello neonatal	30% fueron positivos para BE
					Orina materna	7,9% de resultados positivos
					Cabello materno	24,1% de resultados positivos
Ostrea, 2001 [151]	COC Opiáceos	RIA y GC-MS	0,001- 0,5	N= 59	Entrevista personal	3,7% admitieron consumo en el último mes y 8,4% anteriormente
					Meconio	Cocaína: 67,8%; opiáceos: 32,2% y cannabis: 10,2%
					Cabello materno	Cocaína: 78%; opiáceos: 33,9% y

4.3. Exposición a drogas intraútero

	Cannabis					(n= 58)	cannabis: 13,6%
Jacqz-Aigrain, 2002 [152]	Nicotina, cotinina	RIA	-	N= 182, con declaración de consumo de tabaco durante el embarazo	Entrevista personal (n= 58)		Cocaína: 50,8%; opiáceos: 28,8% y cannabis: 30,5%
					Cabello neonatal		5,4±6,1 y 1,2±1,1 ng/mg de nicotina y cotinina, respectivamente
					Cabello materno		30,7±23,2 y 2,1±2,3 ng/mg de nicotina y cotinina, respectivamente
							Se encuentra una correlación entre las concentraciones de cotinina en el cabello materno y neonatal, y entre el número de cigarrillos consumidos y las concentraciones de cotinina en cabello materno y neonatal
Savitz, 2002 [153]	COC, BE	Screening inmunológico y LC-MS	0,02-0,05	N= 763	Orina materna (n= 742 fueron recogidas entre las semanas 24-29 de gestación; y 531 tras el parto)		0,67% de resultados positivos en las muestras de orina recogidas entre las semanas 24-29 de gestación, y 1,13% en las muestras de orina recogidas postparto
					Cabello materno (n= 559)		2,68% de resultados positivos
					Entrevista		0,26% admitieron consumo durante el

						personal	embarazo
Bar-Oz, 2003 [154]	COC, BE	Screening inmunoquímico y GC-MS	0,2	N= 185		Meconio	COC: 27,6%; BE: 27,0%; opiáceos: 12,4%; cannabis: 29,2%; BZDs: 1,1%; metadona: 1,1%; barbitúricos: 0,5%
	Cannabis					Cabello neonatal	COC: 23,2%; BE: 20,5%; opiáceos: 12,4%; cannabis: 18,4%; BZDs: 1,1%; metadona: 1,1%; barbitúricos: 0,5%
Vinner, 2003 [155,156]	Opiáceos	FPIA o EMIT y GC-MS	2	N= 17, mujeres con historial de consumo de drogas		Orina neonatal	Opiáceos: 35,3%; cannabis: 41,2%; cocaína: 11,8%; metadona: 47,1%
	Cannabis					Orina materna	Opiáceos: 35,3%; cannabis: 52,9%; cocaína: 11,8%; metadona: 41,2%
	Cocaína					Meconio	Opiáceos: 52,9%; cannabis: 47,1%; cocaína: 11,8%; metadona: 35,3%
	Anfetaminas					Cabello neonatal	Opiáceos: 64,7%; cannabis: 11,8% (sólo fue posible analizar 2 muestras, ambas con resultado positivo); cocaína: 11,8%; metadona: no hubo muestra disponible para hacer el análisis.
	LSD						
	BZDs Metadona					Cabello materno	Opiáceos: 64,7%; cannabis: 23,5% (sólo fue posible analizar 4 muestras, todas con resultado positivo); cocaína: 11,8%; metadona: 17,6%

4.3. Exposición a drogas intraútero

Caprara, 2005 [157]	FAEEs	GC-MS	0,008-0,22 pmol/mg	N= 61	Cabello neonatal (n= 56)	No se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones totales de FAEs en cabello de los neonatos expuestos a alcohol durante el embarazo y los no expuestos
Eyler, 2005 [158]	COC, EME, Ecgonina etil éster, norcocaína, CEt, BE y m-hidroxIBE	GC-MS	-	N= 115, 51 con sospecha de consumo de cocaína durante el embarazo	Entrevista personal	65% declararon consumo social de alcohol antes el embarazo 39% (24 mujeres) declararon consumo de alcohol en el embarazo (16 sólo durante el primer trimestre y 5 durante todo el embarazo)
					Orina neonatal	32 muestras fueron positivas
					Líquido amniótico	18 muestras fueron positivas, aunque el número de muestras obtenido fue muy bajo ya que fueron muy difíciles de obtener en la práctica clínica
					Sangre del cordón umbilical	9 muestras fueron positivas, aunque el número de muestras obtenido fue muy bajo ya que fueron muy difíciles de obtener en la práctica clínica
					Meconio	25 muestras fueron positivas
					Cabello materno (tres segmentos)	28 muestras fueron positivas (en 8 casos la muestra de cabello no estaba

Morrison, 2005 [159]	COC, BE Opiáceos A, MA, MDMA, MDEA Metadona BZDs Barbitúricos	ELISA y GC-MS	0,2-1	N= 47, 22 con diagnóstico de gastroquisis y 25 con feto normal	Cabello materno (tres segmentos de 3 cm)	Entrevista personal	disponible para el análisis)
						38 admitieron consumo durante el embarazo No admitieron el consumo durante el embarazo el 25% de las mujeres con sospecha previa de consumo (n= 51) y ninguna de las mujeres del grupo de no sospechosas (n= 64) 13% que admitieron uso en la entrevista personal no presentaron resultados positivos en ninguna muestra biológica, mientras que 17% de las que no admitieron uso fueron positivas en alguna muestra biológica	
						4 mujeres (18%) con fetos con diagnóstico de gastroquisis tenían un resultado positivo en el segmento correspondiente al primer trimestre del embarazo (3 a cocaína y 1 a metanfetamina) Ninguna muestra del grupo de mujeres con fetos normales presentaron resultados positivos	

4.3. Exposición a drogas intraútero

Mitsuhiro, 2006 [160,161]	COC Cannabis	ELISA y GC-MS	0,025-0,2	N= 1000, adolescentes embarazadas (11-19 años)	Cabello materno (tercer trimestre) Entrevista personal	6% de resultados positivos (COC: 1,7%; cannabis: 4,0%; COC+cannabis: 0,3%) Ninguna admitió consumo
García-Bournissen, 2007 [162]	MA	ELISA y GC-MS	-	N= 11, con consumo de MA reconocido	Cabello neonatal Cabello materno (un segmento de 1-2 cm)	10 casos positivos (0-22,73 ng/mg, mediana: 1,63 ng/mg) 11 resultados positivos (0,13-51,97 ng/mg, mediana: 1,75 ng/mg) Los niveles de concentración de MA en el pelo de las madres se correlacionan significativamente con los niveles de concentración encontrados en los cabellos de los neonatos
Wurst, 2008 [163]	EtG y EtS FAEEs	LC-MSMS y GC-MS	0,0023-0,004	N= 103	Orina materna Cabello materno (un segmento de 6 cm) Entrevista personal	1 muestra fue positiva a EtG (ninguna a EtS) 19 muestras fueron positivas: 16 a EtG (12 con valores que reflejaban consumo social, entre 7-25 pg/mg) y 3 a FAEEs 91,3% (94 mujeres) declararon abstinencia durante el embarazo 8,7% (9 mujeres) declararon consumo de

							alcohol durante el embarazo, 6 con una frecuencia de 1 vez al mes y 3 con una frecuencia de 2-4 veces al mes Sólo 2 de los casos con EtG positivo en pelo y ninguno de los casos con FAEEs positivo en pelo habían declarado consumo en la entrevista
Falcon, 2010 [164]	MOR, 6-AM, COD COC, BE, CEt A, MA, MDA, MDMA THC, THCCOOH	GC-MS	0,1-0,2	N= 142, mujeres con 12 semanas de gestación que requieren la interrupción voluntaria del embarazo	Sangre materna (n= 131) Cabello materno (un segmento de 4 cm) Entrevista personal	Cannabinoides: 3,0%; COC: 5,3%; Opiáceos: 1,5%; Policonsumo: 0,8% Cannabinoides: 18,3%; COC: 11,3%; opiáceos: 2,8%; MDMA: 1,4%; policonsumo: 4,9% 41,2% declararon consumo de tabaco 77% declararon consumo de alcohol 1 mujer (0,7%) declaró consumo de cocaína y cannabis	
Favretto, 2010 [165]	Venlafaxina	HPLC-HRMS	0,2	N= 2, gemelos monocigóticos con exposición a venlafaxina durante el embarazo	Cabello neonatal	2 muestras positivas (Neonato 1: 10 ng/mg y Neonato 2: 12 ng/mg) También se detectaron 4 metabolitos	

4.3. Exposición a drogas intraútero

Grekin, 2010 [166]	Cocaína	GC-MSMS y LC-MSMS	-	N= 300	Orina	9,7% de resultados positivos a cualquier sustancia (2,5% sólo fueron positivas en orina)	
	Opiáceos					Cabello materno (un segmento de 3,8 cm)	19,4% de resultados positivos a cualquier sustancia (12,2% sólo fueron positivas en pelo)
	Anfetaminas Cannabis					Entrevista personal	13,1% reconocieron el consumo, pero sólo 4,7% presentaron un resultado analítico positivo en alguna muestra biológica 18,6% negaron el consumo pero presentaron un resultado analítico positivo en alguna de las dos matrices
Moller, 2010 [167]	Opiáceos	RIA	-	N= 396	Meconio	18,4% de resultados positivos (9,1% sólo lo fueron en meconio)	
					Cabello neonatal	11,8% de resultados positivos (2,5% sólo lo fueron en cabello)	
Morini, 2010 [168]	EtG y EtS FAEEs	LC-MSMS y GC-MS	0,003-0,12	N= 99	Meconio	EtG: 82,8%; EtS: 19,2%; y FAEEs: 22,2%	
					Cabello neonatal	Todas las muestras negativas para todos los analitos estudiados (EtG y FAEEs)	
					Cabello materno (9 cm)	Todas las muestras negativas para todos los analitos estudiados (EtG y FAEEs)	

Su, 2010 [169]	Ketamina Norketamina	GC-MS	0,05	N= 1	Cabello neonatal (2 cm)	Ketamina: 141 pg/mg y norketamina: 63 pg/mg El neonato fue pequeño para la edad gestacional, con retraso del crecimiento intrauterino, notable hipotonía y respuestas reflejas pobres
Falcon, 2012 [170]	MOR, 6-AM, COD COC, BE, CEt A, MA, MDA, MDMA THC, THCCOOH	GC-MS	0,002-0,5	N= 280, mujeres con 12 semanas de gestación que requieren la interrupción voluntaria del embarazo	Cabello materno (4 cm) Placenta	28,9% de resultados positivos (81 muestras) Opiáceos: 2,5%; cocaína: 10,0%; cannabis: 21,4%; MDMA: 1,1%; policonsumo: 5,3% 6,4% de resultados positivos (18 muestras) Cocaína: 2,8%; cannabis: 3,2%; policonsumo: 0,35%
					Restos de tejido fetal	6,4% de resultados positivos (18 muestras) Cocaína: 3,2%; cannabis: 2,8%; policonsumo: 0,35%
					Entrevista personal (n= 175)	35,2% declararon consumo de tabaco 34,8% declararon consumo de alcohol

4.3. Exposición a drogas intraútero

Friguls, 2012 [171,172]	MOR, 6-AM, COD COC, BE, CEt A, MA, MDA, MDMA THC, THCCOOH	Screening inmunológico y GC-MS	0,002-0,5	N= 107	Cabello materno (un segmento de 3 cm)	3 mujeres (1,7%) admitieron consumo esporádico de cannabis, 1 (0,57%) admitió consumo de cocaína y 1 (0,57%) consumo de cocaína y cannabis
<p>Cocaína: 6,4%; cannabis: 10,3%; MDMA: 0,9%; policonsumo:1,9% (1 caso con cannabis y cocaína; y otro con cannabis y MDMA)</p>						
<p>Meconio (se analizó cuando el cabello fue positivo)</p>						
<p>Cocaína: 5,6%; cannabis: 2,8%</p> <p>Se confirmaron 6 de los 7 casos positivos a cocaína y 3 de los 11 casos positivos a cannabis (aunque en 3 de esos casos no se dispuso de una muestra de meconio adecuada para el estudio)</p> <p>63,6% declararon consumo de tabaco 35,5% declararon consumo de alcohol 17% declararon el uso de analgésicos y el 15% de ansiolíticos</p> <p>1,9% declararon consumo de drogas durante el embarazo, concretamente 1 a cocaína (0,9%) y 1 a cannabis (0,9%)</p>						

Joya, 2012 [173]	MOR, 6-AM, COD COC, BE, CEt A, MA, MDA, MDMA THC, THCCOOH	Screening inmunoquímico y GC-MS	0,002- 0,5	N= 347	Cabello materno (un segmento de 3 cm)	2,6% fueron resultados positivos a cocaína
						Entrevista personal
Ondersma, 2012 [174]	Cocaína Opiáceos Anfetaminas Cannabis PCP	Screening inmunoquímico y GC-MS	-	N= 400	Orina materna	26,8% de las mujeres incluidas en el estudio fueron positivas en alguna de las muestras biológicas analizadas
					Cabello materno (3,8 cm)	
Morini, 2013 [175]	EtG FAEEs	LC-MSMS	0,003	N= 151	Meconio	18 muestras (11,9%) fueron positivas a FAEEs y 9 muestras (6,0%) fueron positivas a EtG
					Uñas maternas (2 mm)	Todas las muestras fueron negativas a EtG
					Cabello materno (6 cm)	Todas las muestras fueron negativas a EtG

4.3. Exposición a drogas intraútero

David, 2014 [176]	COC, BE MOR, COD, dihidroCOD Cannabis MDMA Ketamina BZDs Barbitúricos	ELISA y GC-MS	LOD: 0,2	N= 517, 356 presentaban malformaciones neonatales y 161 no las presentaban	Entrevista personal Cabello materno (tres segmentos de 3 cm)	39,7% declararon consumo de alcohol durante el embarazo 14,9% presentaron un resultado positivo a alguna droga Cocaína: 3,5%; cannabis: 13,2%; anfetaminas: 0,2%; ketamina: 0,2%; policonsumo: 1,9%
					Entrevista personal	13,7% declararon consumo de tabaco 15,1% declararon consumo de alcohol 20,3% declararon consumo de medicamentos sin receta 33,3% declararon consumo de medicamentos con receta Ninguna declaró consumo de drogas
Gutierrez, 2015 [177]	EtG	LC-MSMS	0,008	N= 85, 43 controles y 42 con declaración de exposición prenatal a alcohol	Cabello materno (6 cm) Entrevista personal	33,1% de resultados positivos, 14% del grupo control y 19,1% con declaración de consumo de prenatal a alcohol Opioides: 93% del grupo control y 66,7% del otro grupo; cannabis: 32,6% y 54,8%; cocaína: 30,2% y 31,0%; BZDs: 18,6% y 21,4%; anfetaminas: 14,0% y 26,2%;

Joya, 2015 [178]	EtG FAEEs	UHPLC-MSMS	0,007	N= 80	Meconio Cabello materno (tres segmentos de 3 cm)	<p>tabaco: 81,4% y 78,6%</p> <p>EtG: 62,5%; FAEEs: 17,2%; EtG+FAEEs: 41,4%</p> <p>EtG <7 pg/mg: 27,5%; EtG entre 7-30 pg/mg: 45,0%; EtG >30 pg/mg: 27,5%</p> <p>Todas las abstinentes durante el embarazo tuvieron valores negativos de EtG y FAEEs en meconio</p> <p>De todas las mujeres con consumo social durante el embarazo, un 88,9% y un 27,8% fueron positivos también en meconio para EtG y FAEEs, respectivamente</p> <p>De todas las mujeres con un consumo excesivo de alcohol durante el embarazo, un 90,9% y un 63,6% fueron positivos también en meconio para EtG y FAEEs, respectivamente</p> <p>76,2% se declararon abstinentes durante el embarazo, pero un 53,7% con valores de EtG en pelo >7 pg/mg</p> <p>23,8% declararon consumo de alcohol durante el embarazo, pero un 5% con</p>
---------------------	--------------	------------	-------	-------	---	--

4.3. Exposición a drogas intraútero

					valores de EtG en pelo <7 pg/mg
<p>A: Anfetamina; BE: Benzoilecgonina; BZDs: benzodiazepinas; COC: Cocaína; COD: Codeína; EME: Ecgoninametilester; EtG: Etglucurónido; EtS: Etilsulfato; FAEs: ésteres etílicos de los ácidos grasos; LSD: Dietilamida de ácido lisérgico; MA: Metanfetamina; MDA: Metilendioxianfetamina; MDEA: Metilendioxietilamfetamina; MDMA: Metilendioximetanfetamina; MOR: Morfina; OH-THC: Hidroxitetrahidrocannabinol; PCP: 1-(1-fenilciclohexil)piperidina); THC: Δ^9-tetrahidrocannabinol; THCCOOH: Carboxi-Δ^9-tetrahidrocannabinol; 6-AM: 6-monoacetilmorfina</p> <p>ELISA: Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas; EMIT: Técnica de inmunoensayo por multiplicación enzimática; FPIA: inmunoensayo de polarización fluorescente; RIA: Radioinmunoensayo</p>					

En la Tabla 6 se muestra una revisión bibliográfica de los trabajos en los que se emplea el pelo como matriz biológica para la determinación de la exposición intraútero a drogas, fármacos, alcohol y tabaco. En estos estudios se compara la eficacia de la detección de drogas en pelo con la de otras matrices biológicas (tradicionales y alternativas) y/o con la entrevista personal a la madre. El análisis de pelo suele asociarse con un mayor número de resultados positivos cuando se compara con el resto de matrices biológicas [140-144,147-151,153,158,160,161,163,164,166,170-173,176,178] y, especialmente, cuando se compara con la entrevista personal [142,147,148,150,151,153,160,161,163,164,170-174,176,178]. Esto es debido a que el pelo presenta una ventana de detección mayor al resto de matrices biológicas empleadas (meconio, orina, sangre, etc), y a que las mujeres tienden a negar o subestimar su consumo al contestar a las entrevistas personales, debido a que temen las repercusiones legales o sociales [179,180].

En el estudio presentado en esta Tesis Doctoral también se ha detectado una mayor exposición intraútero mediante el análisis de pelo comparado con la entrevista personal para todas las drogas y fármacos incluidos en la metodología analítica, a excepción del alcohol. Además, para 175 de estos casos se recogieron también muestras de meconio, placenta y cordón umbilical, que fueron analizadas para determinar el consumo de heroína, cocaína y metadona [181]. El pelo ha proporcionado los mayores niveles de prevalencia para las tres sustancias, lo que ha permitido establecer a esta matriz biológica como la más sensible para detectar la exposición intraútero. La subestimación del consumo de alcohol mediante el análisis de pelo también fue observada por otros autores [168,175,178], y puede ser atribuida a la ingesta esporádica de alcohol durante el embarazo que es más fácilmente admitido por las madres en la entrevista personal que el consumo de otras sustancias de abuso, debido a su mayor aceptación social. Además, las concentraciones detectadas en pelo para un consumo social de EtG son mucho menores (7-30 pg/mg) a las detectadas para otras drogas, debido a las características químicas de este compuesto (sustancia ácida y muy polar) que dificultan su incorporación en esta matriz biológica. Por ello, Morini et al. [168]

recomendaron el meconio como la matriz de elección para la determinación de la exposición prenatal a alcohol.

El análisis de pelo materno proporciona una estimación directa del consumo materno durante el embarazo y una estimación indirecta de la exposición fetal. El cabello neonatal ha sido empleado por diversos autores [140,141,143-145,147,149,152,154-157,162,165,167-169], pero presenta una serie de desventajas con respecto al pelo materno como la pequeña cantidad de muestra disponible para el análisis (frecuentemente sólo están disponibles unos pocos miligramos) y el rechazo por parte de los padres a la recogida de esta muestra por razones estéticas o culturales [179]. Además, el pelo neonatal comienza a formarse en los últimos 3 o 4 meses de embarazo, por lo que su análisis refleja la exposición del último trimestre, y por tanto, su ventana de detección puede ser menor a la del meconio [180]; asimismo, no presenta un ratio de crecimiento constante durante la etapa prenatal [182], lo que dificulta la estimación temporal del consumo. Como se puede observar en la Tabla 6, el número de casos detectados de consumo de sustancias de abuso durante el embarazo es menor cuando se emplea cabello neonatal que cuando se emplea cabello materno [140,141,144,162].

En la mayoría de los trabajos previamente publicados se realiza la determinación de una sola sustancia o grupo [140-142,145-150,152,153,157,158,162,165,167,169,177], y pocos determinan varias sustancias simultáneamente [151,154-156,159,164,166,170-174,176]. El uso de métodos analíticos multianalito es especialmente relevante en los análisis de pelo, como se señaló previamente, ya que generalmente la cantidad de muestra recogida es baja y el uso de estos métodos permite obtener más información sobre los hábitos de consumo, empleando la menor cantidad de muestra posible y reduciendo costes. En esta Tesis Doctoral se obtuvo información sobre el consumo de drogas de abuso (cocaína, opiáceos, anfetaminas, cannabis, LSD, escopolamina y ketamina) y fármacos de uso común (metadona, antidepresivos, benzodiacepinas e hipnóticos) durante el embarazo, empleando la misma alícuota de pelo materno (50 mg) y el mismo método analítico. Sin embargo, para la determinación de la exposición a

alcohol mediante el análisis del EtG fue necesario el análisis de una segunda alícuota de pelo (50 mg), que sólo estuvo disponible en 51 casos.

Asimismo y siempre que la cantidad de cabello recogida fue suficiente para realizar la segmentación (n= 88), se determinó la exposición en cada uno de los tres trimestres del embarazo mediante el análisis segmental de las muestras. El análisis segmental permite evaluar la evolución del consumo a lo largo del embarazo, y pocos autores lo han realizado [141,158,159,176,178], pese a que los problemas originados por este consumo son diferentes en función del trimestre en el que se produzca [136].

La selección de los casos incluidos en este estudio (N= 209) se realizó de forma aleatoria, lo que ha permitido establecer una estimación de consumo del 15,4% para las drogas de abuso (12,4% cocaína, 3,8% THC, 1% opiáceos y 1% ketamina) y del 22,5% para los fármacos (11% benzodiazepinas, 9,1% antidepresivos y 3,3% metadona), entre las mujeres que habían dado a luz en el área de Vigo de Mayo a Julio de 2011. En cambio, es frecuente encontrar en la bibliografía estudios donde se analizaron poblaciones concretas, como poblaciones de riesgo o con antecedentes de consumo [140-145,147,149,151,152,154-156,158,159,162,165,167,169,176,177], y donde se incluyeron un menor número de casos [140-145,147,149,151,152,154-159,162-165,168,169,171,172,175,177,178]. La selección aleatoria y el número de casos estudiados han permitido evaluar las posibles correlaciones entre los valores analíticos en pelo de drogas y fármacos, los parámetros clínicos de los neonatos y las respuestas maternas a la entrevista. Este tipo de correlaciones están pobremente estudiadas en la bibliografía, especialmente para el consumo de fármacos durante el embarazo [155,156,159,165,176], a pesar de la alta incidencia detectada en este estudio para estos compuestos y los problemas que su consumo puede originar en el desarrollo fetal [136,139]. Sin embargo, no fue posible establecer una correlación significativa entre los valores analíticos en pelo para ninguna de las sustancias analizadas y la clínica neonatal. La única correlación estadísticamente significativa encontrada se estableció entre la declaración de consumo de tabaco de las madres en la entrevista y los parámetros clínicos de tamaño y peso de los recién nacidos.

4.3. Exposición a drogas intraútero

Por tanto, el pelo ha probado ser la matriz que permite obtener la mejor estimación de la exposición prenatal a drogas y fármacos (a excepción del alcohol), ya que permite identificar adecuadamente a los neonatos expuestos y, con ello, mejorar su tratamiento y seguimiento. Esta matriz permite estudiar la prevalencia a lo largo de todo el embarazo mediante el análisis de segmentos y establecer el perfil de consumo durante toda la gestación. Su uso en el primer trimestre del embarazo puede también permitir detectar e intervenir en estos casos de forma temprana para minimizar las consecuencias del consumo materno en el feto.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Sachs H, Kintz P. Testing for drugs in hair. Critical review of chromatographic procedures since 1992. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* (1998) 713:147-161.
- [2] Vincenti M, Salomone A, Gerace E, Pirro V. Application of mass spectrometry to hair analysis for forensic toxicological investigations. *Mass Spectrom Rev* (2013) 32(4):312-332.
- [3] Vincenti M, Salomone A, Gerace E, Pirro V. Role of LC-MS/MS in hair testing for the determination of common drugs of abuse and other psychoactive drugs. *Bioanalysis* (2013) 5(15):1919-1938.
- [4] Society of Hair Testing. Recommendations for hair testing in forensic cases. *Forensic Sci Int* (2004) 145:83–84.
- [5] Cooper GAA, Kronstrand R, Kintz P. Society of Hair Testing guidelines for drug testing in hair. *Forensic Sci Int* (2012) 218(1-3):20-24.
- [6] Kintz P, Villain M, Ludes B. Testing for the undetectable in drug-facilitated sexual assault using hair analyzed by tandem mass spectrometry as evidence. *Ther Drug Monit* (2004) 26:211-214.
- [7] Villain M, Chèze M, Tracqui A, Ludes B, Kintz P. Windows of detection of zolpidem in urine and hair: application to two drug facilitated sexual assaults. *Forensic Sci Int* (2004) 143(2-3):157-161.
- [8] Villain M, Chèze M, Tracqui A, Ludes B, Kintz P. Testing for zopiclone in hair application to drug-facilitated crimes. *Forensic Sci Int* (2004) 145(2-3): 117-121.
- [9] Cui X, Xiang P, Zhang J, Shi Y, Shen B, Shen M. Segmental hair analysis after a single dose of zolpidem: comparison with a previous study. *J Anal Toxicol* (2013) 37(6):369-375.
- [10] Shima N, Sasaki K, Kamata T, Matsuta S, Katagi M, Miki A, Zaitso K, Sato T, Nakanishi T, Tsuchihashi H, Suzuki K. Single-hair analysis of zolpidem on the supposition of its single administration in drug-facilitated crimes. *Forensic Toxicol* (2015) 33:122-130.
- [11] Concheiro M, Villain M, Bouchet S, Ludes B, López-Rivadulla M, Kintz P. Windows of detection of tetrazepam in urine, oral fluid, beard, and hair,

- with a special focus on drug-facilitated crimes. *Ther Drug Monit* (2005) 27(5):565-570.
- [12] Laloup M, Fernandez Mdel M, Wood M, Maes V, De Boeck G, Vanbeckevoort Y, Samyn N. Detection of diazepam in urine, hair and preserved oral fluid samples with LC-MS-MS after single and repeated administration of Myolastan and Valium. *Anal Bioanal Chem* (2007) 388(7):1545-1556.
- [13] Wilkins D, Rollins DE, Seaman J, Haughey H, Krueger G, Foltz R. Quantitative determination of codeine and its major metabolites in human hair by gas chromatography-positive ion chemical ionization mass spectrometry: a clinical application. *Journal Anal Toxicol* (1995) 19:269-274.
- [14] Gwent SH, Wilson JF, Tsanaclis LM, Wicks JF. Time course of appearance of cotinine in human beard hair after a single dose of nicotine. *Ther Drug Monit* (1995) 17(2):195-198.
- [15] Callaghan RR, Wilson JF, Cartwright J. An assessment of the routes of incorporation of opiates into beard hair after a single oral dose of codeine. *Ther Drug Monit* (1996) 18(6):724-728.
- [16] Henderson GL, Harkey MR, Zhou C, Jones RT, Jacob P III. Incorporation of isotopically labeled cocaine and metabolites into human hair: 1. dose-response relationships. *J Anal Toxicol* (1996) 20(1):1-12.
- [17] Rollins DE, Wilkins DG, Krueger GG. Codeine disposition in human hair after single and multiple doses. *Eur J Clin Pharmacol* (1996) 50(5):391-397.
- [18] Negrusz A, Moore CM, Kern JL, Janicak PG, Strong MJ, Levy NA. Quantitation of clonazepam and its major metabolite 7-aminoclonazepam in hair. *Journal Anal Toxicol* (2000) 24:614-620.
- [19] Negrusz A, Moore CM, Hinkel KB, Stockham TL, Verma M, Strong MJ, Janicak PG. Deposition of 7-aminoflunitrazepam and flunitrazepam in hair after a single dose of Rohypnol. *J Forensic Sci* (2001) 46(5):1143-1151.
- [20] Negrusz A, Bowen AM, Moore CM, Dowd SM, Strong MJ, Janicak PG. Deposition of 7-aminoclonazepam and clonazepam in hair following a single dose of Klonopin. *J Anal Toxicol* (2002) 26(7):471-478.

- [21] Kintz P, Villain M, Cirimele V, Pépin G, Ludes B. Windows of detection of lorazepam in urine, oral fluid and hair, with a special focus on drug-facilitated crimes. *Forensic Sci Int* (2004) 145(2-3):131-135.
- [22] Villain M, Chèze M, Dumestre V, Ludes B, Kintz P. Hair to document drug-facilitated crimes: four cases involving bromazepam. *J Anal Toxicol* (2004) 28(6):516-519.
- [23] Chèze M, Duffort G, Deveaux M, Pépin G. Hair analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry in toxicological investigation of drug-facilitated crimes: report of 128 cases over the period June 2003-May 2004 in metropolitan Paris. *Forensic Sci Int* (2005) 153(1):3-10.
- [24] Bernert JT, Alexander JR, Sosnoff CS, McGuffey JE. Time course of nicotine and cotinine incorporation into samples of nonsmokers' beard hair following a single dose of nicotine Polacrilex. *Journal Anal Toxicol* (2011) 35:1-7.
- [25] Xiang P, Sun Q, Shen B, Chen P, Liu W, Shen M. Segmental hair analysis using liquid chromatography-tandem mass spectrometry after a single dose of benzodiazepines. *Forensic Sci Int* (2011) 204(1-3):19-26.
- [26] Xiang P, Sun Q, Shen B, Shen M. Disposition of ketamine and norketamine in hair after a single dose. *Int J Legal Med* (2011) 125(6):831-840.
- [27] Schröder J, Rothe M, Pragst F. Ethyl glucuronide concentrations in beard hair after a single alcohol dose: evidence for incorporation in hair root. *Int J Legal Med* (2012) 126:791-799.
- [28] Cordero R, Paterson S. Simultaneous quantification of opiates, amphetamines, cocaine and metabolites and diazepam and metabolite in a single hair sample using GC-MS. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* (2007) 850(1-2):423-431.
- [29] Kim JY, Jung KS, Kim MK, Lee JI, In MK. Simultaneous determination of psychotropic phenylalkylamine derivatives in human hair by gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* (2007) 21(11):1705-1720.
- [30] Klys M, Rojek S, Kulikowska J, Bozek E, Scislowski M. Usefulness of multiparameter opiates-amphetamines-cocainics analysis in hair of drug

- users for the evaluation of an abuse profile by means of LC-APCI-MSMS. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* (2007) 854(1-2):299-307.
- [31] Hegstad S, Khiabani HZ, Kristoffersen L, Kunoe N, Lobmaier PP, Christophersen AS. Drug screening of hair by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Anal Toxicol* (2008) 32(5):364-372.
- [32] Moore C, Marinetti L, Coulter C, Crompton K. Analysis of pain management drugs, specifically fentanyl, in hair: application to forensic specimens. *Forensic Sci Int* (2008) 176(1):47-50.
- [33] Pelander A, Ristimaa J, Rasanen I, Vuori E, Ojanpera I. Screening for basic drugs in hair of drugs addicts by liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *Ther Drug Monit* (2008) 30(6):717-724.
- [34] Wu YH, Lin KL, Chen SC, Chang YZ. Simultaneous quantitative determination of amphetamines, ketamine, opiates and metabolites in human hair by gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* (2008) 22(6):887-897.
- [35] Bucelli F, Fratini A, Bavazzano P, Comodo N. Quantification of drugs of abuse and some stimulants in hair samples by liquid chromatography-electrospray ionization ion trap mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* (2009) 877(31):3931-3936.
- [36] Guthery B, Bassindale T, Bassindale A, Pillinger CT, Morgan GH. Qualitative drug analysis of hair extracts by comprehensive two-dimensional gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr A* (2010) 1217(26):4402-4410.
- [37] Kronstrand R, Nystrom I, Forsman M, Kall K. Hair analysis for drugs in driver's license regranting. A Swedish pilot study. *Forensic Sci Int* (2010) 196(1-3):55-58.
- [38] Merola G, Gentili S, Tagliaro F, Macchia T. Determination of different recreational drugs in hair by HS-SPME and GC-MS. *Anal Bioanal Chem* (2010) 397(7):2987-2995.
- [39] Nielsen MK, Johansen SS, Dalsgaard PW, Linnet K. Simultaneous screening and quantification of 52 common pharmaceuticals and drugs of abuse in hair using UPLC-TOF-MS. *Forensic Sci Int* (2010) 196(1-3):85-92.

- [40] Domínguez-Romero JC, García-Reyes JF, Molina-Díaz A. Screening and quantification of multiclass drugs of abuse and pharmaceuticals in hair by fast liquid chromatography electrospray time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* (2011) 879(22):2034-2042.
- [41] Favretto D, Vogliardi S, Stocchero G, Nalesso A, Tucci M, Ferrara SD. 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. *J Chromatogr A* (2011) 1218(38):6583-6595.
- [42] Miyaguchi H, Inoue H. Determination of amphetamine-type stimulants, cocaine and ketamine in human hair by liquid chromatography/linear ion trap-Orbitrap hybrid mass spectrometry. *Analyst* (2011) 136(17):3503-3511.
- [43] Aleksa K, Walasek P, Fulga N, Kapur B, Gareri J, Koren G. Simultaneous detection of seventeen drugs of abuse and metabolites in hair using solid phase microextraction (SPME) with GC-MS. *Forensic Sci Int* (2012) 218(1-3):31-36.
- [44] Broecker S, Herre S, Pragst F. General unknown screening in hair by liquid chromatography-hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC-QTOF-MS). *Forensic Sci Int* (2012) 218(1-3):68-81.
- [45] Di Corcia D, D'Urso F, Gerace E, Salomone A, Vicenti M. Simultaneous determination in hair of multiclass drugs of abuse (including THC) by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* (2012) 899:154-159.
- [46] Rust KY, Baumgartner MR, Dally AM, Kraemer T. Prevalence of new psychoactive substances: a retrospective study in hair. *Drug Test Anal* (2012) 4(6):402-408.
- [47] Zhu KY, Leung KW, Ting AK, Wong ZC, Ng WY, Choi RC, Dong TT, Wang T, Lau DT, Tsim KW. Microfluidic chip based nano liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry for the determination of abused drugs and metabolites in human hair. *Anal Bioanal Chem* (2012) 402(9):2805-2815.

- [48] Sergi M, Napoletano S, Montesano C, Iofrida R, Curini R, Compagnone D. Pressurized-liquid extraction for determination of illicit drugs in hair by LC-MS-MS. *Anal Bioanal Chem* (2013) 405(2-3):725-735.
- [49] Chang YJ, Chao MR, Chen SC, Chen CH, Chang YZ. A high-throughput method based on microwave-assisted extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry for simultaneous analysis of amphetamines, ketamine, opiates, and their metabolites in hair. *Anal Bioanal Chem* (2014) 406(9-10):2445-2455.
- [50] Elian AA, Hackett J, Donovan KT. Analysis of amphetamines and synthetic cathinones in hair samples using LC-Tandem mass spectrometry and solid-phase extraction. *LC-GC Europe* (2014) 32(3):458-465.
- [51] Gottardo R, Sorio D, Musile G, Trapani E, Seri C, Serpelloni G, Tagliaro F. Screening for synthetic cannabinoids in hair by using LC-QTOF-MS: a new and powerful approach to study the penetration of these new psychoactive substances in the population. *Med Sci Law* (2014) 54(1):22-27.
- [52] Imbert L, Dulaurent S, Mercerole M, Morichon J, Lachatre G, Gaulier JM. Development and validation of a single LC-MS/MS assay following SPE for simultaneous hair analysis of amphetamines, opiates, cocaine and metabolites. *Forensic Sci Int* (2014) 234:132-138.
- [53] Koster RA, Alffenaar JW, Greijdanus B, Vandernagel JE, Uges DR. 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. *Ther Drug Monit* (2014) 36(2):234-243.
- [54] Maublanc J, Dulaurent S, Morichon J, Lachâtre G, Gaulier JM. Identification and quantification of 35 psychotropic drugs and metabolites in hair by LC-MS/MS: application in forensic toxicology. *Int J Leg Med* (2014) 129(2):259-268.
- [55] Montesano C, Johansen SS, Nielsen MK. Validation of a method for the targeted analysis of 96 drugs in hair by UPLC-MS/MS. *J Pharm Biomed Anal* (2014) 88:295-306.
- [56] Strano-Rossi S, Odoardi S, Fisichella M, Anzillotti L, Gottardo R, Tagliaro F. Screening for new psychoactive substances in hair by ultra high performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* (2014) 1372C:145-156.

- [57] Pichini S, Rotolo MC, García J, Girona N, Leal L, García-Algar O, Pacifici R. Neonatal withdrawal syndrome after chronic maternal consumption of 4-methylethcathinone. *Forensic Sci Int* (2014) 245C:e33-e35.
- [58] Wyman JF, Lavins ES, Engelhart D, Armstrong EJ, Snell KD, Boggs PD, Taylor SM, Norris RN, Miller FP. Postmortem tissue distribution of MDPV following lethal intoxication by "bath salts". *J Anal Toxicol* (2013) 37(3):182-185.
- [59] Martin M, Muller JF, Turner K, Duez M, Cirimele V. Evidence of mephedrone chronic abuse through hair analysis using GC/MS. *Forensic Sci Int* (2012) 218(1-3):44-48.
- [60] Shah SA, Deshmukh NI, Barker J, Petróczi A, Cross P, Archer R, Naughton DP. Quantitative analysis of mephedrone using liquid chromatography tandem mass spectroscopy: application to human hair. *J Pharm Biomed Anal* (2012) 61:64-69.
- [61] Park M, Yeon S, Lee J, In S. Determination of XLR-11 and its metabolites in hair by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* (2015) 114:184-189.
- [62] Sporkert F, Pragst F, Bachus R, Masuhr F, Harms L. Determination of cathinone, cathine and norephedrine in hair of Yemenite khat chewers. *Forensic Sci Int* (2003) 133(1-2):39-46.
- [63] Barroso M, Costa S, Dias M, Vieira DN, Queiroz JA, López-Rivadulla M. Analysis of phenylpiperazine-like stimulants in human hair as trimethylsilyl derivatives by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* (2010) 1217(40):6274-6280.
- [64] Kikura-Hanajiri R, Kawamura M, Saisho K, Kodama Y, Goda Y. The disposition into hair of new designer drugs; methylone, MBDB and methcathinone. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* (2007) 855(2):121-126.
- [65] Kim J, Park Y, Park M, Kim E, Yang W, Baek S, Lee S, Han S. Simultaneous determination of five naphthoylindole-based synthetic cannabinoids and metabolites and their deposition in human and rat hair. *J Pharm Biomed Anal* (2015) 102:162-175.

- [66] Kim J, In S, Park Y, Park M, Kim E, Lee S. Deposition of JWH-018, JWH-073 and their metabolites in hair and effect of hair pigmentation. *Anal Bioanal Chem* (2013) 405(30):9769-9778.
- [67] Hernández-Carrasquilla M. Gas chromatography–mass spectrometry analysis of anabolic compounds in bovine hair: evaluation of hair extraction procedures. *Anal Chim Acta* (2001) 434:59-66.
- [68] Nielsen MKK, Johansen SS, Dalsgaard PW, K. Linnet, Simultaneous screening and quantification of 52 common pharmaceuticals and drugs of abuse in hair using UPLC-TOF-MS. *Forensic Sci Int* (2010) 196 (1-3):85-92.
- [69] Pragst F, Balikova MA. State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse. *Clin Chim Acta* (2006) 370(1-2):17-49.
- [70] Barroso M, Gallardo E, Vieira DN, López-Rivadulla M, Queiroz JA. Hair: a complementary source of bioanalytical information in forensic toxicology. *Bioanalysis* (2011) 3(1):67-79.
- [71] Musshoff F, Madea B. New trends in hair analysis and scientific demands on validation and technical notes. *Forensic Sci Int* (2007) 165(2-3):204-215.
- [72] Cooper GAA. Hair testing is taking root. *Ann Clin Biochem* (2011) 48:516-530.
- [73] Balikova M. Hair analysis for drugs of abuse. Plausibility of interpretation. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* (2005) 149(2):199-207.
- [74] Musshoff F, Madea B. Analytical pitfalls in hair testing. *Anal Bioanal Chem* (2007) 388(7):1475-1494.
- [75] Baumgartner WA, Hill VA. Hair analysis for drugs of abuse: decontamination issues. En: Sunshine I (ed.) *Recent Developments in Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology*. New York, EEUU: Marcel Dekker (1992):577-597.
- [76] Tsanaclis L, Wicks JFC. Differentiation between drug use and environmental contamination when testing for drugs in hair. *Forensic Sci Int* (2008) 176:19-22.

- [77] Wang WL, Cone EJ. Testing human hair for drugs of abuse. IV. Environmental cocaine contamination and washing effects. *Forensic Sci Int* (1995) 70(1-3):39-51.
- [78] Thorspecken J, Skopp G, Pötsch L. In vitro contamination of hair by marijuana smoke. *Clin Chem* (2004) 50(3):596-602.
- [79] Moosmann B, Roth N, Auwarter V. Hair analysis for THCA-A, THC and CBN after passive in vivo exposure to marijuana smoke. *Drug Test Anal* (2014) 6(1-2):199-125.
- [80] Romano G, Barbera N, Spadaro G, Valenti V. Determination of drugs of abuse in hair: Evaluation of external heroin contamination and risk of false positives. *Forensic Sci Int* (2003) 131(2-3):98-102.
- [81] Stout PR, Roper Miller JD, Baylor MR, Mitchell JM. External contamination of hair with cocaine: Evaluation of external cocaine contamination and development of performance-testing materials. *J Anal Toxicol* (2006) 30(8):490-500.
- [82] Moosmann B, Roth N, Auwärter V. Hair analysis for Δ^9 -tetrahydrocannabinolic acid A (THCA-A) and Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) after handling cannabis plant material. *Drug Test Anal* (2015) [DOI: 10.1002/dta.1830].
- [83] Moosmann B, Valcheva T, Neukamm MA, Angerer V, Auwärter V. Hair analysis of synthetic cannabinoids: does the handling of herbal mixtures affect the analyst's hair concentration? *Forensic Toxicol* (2015) 33(1):37-44.
- [84] Bush DM. The U.S. mandatory guidelines for federal workplace drug testing programs: current status and future considerations. *Forensic Sci Int* (2008) 174(2-3):111-119.
- [85] Harkey MR. Anatomy and physiology of hair. *Forensic Sci Int* (1993) 63(1-3):9-18.
- [86] Myers RJ, Hamilton JB. Regeneration and rate of growth of hairs in man. *Ann N Y Acad Sci* (1951) 53:562-568.
- [87] Barman J, Pecoraro V, Astore I. Method, technique and computations in the study of the trophic state of the human scalp hair. *J Invest Dermatol* (1964) 42:421-425.

- [88] Pecoraro V, Astore I, Barman J, Araujo IC. The normal trichogram in the child before the age of puberty. *J Invest Dermatol* (1964) 42:427-430.
- [89] Miyazawa N, Uematsu T. Analysis of ofloxacin in hair as a measure of hair growth and as a time marker for hair analysis. *Ther Drug Monit* (1992) 14:525-528.
- [90] Potsch L. A discourse on human hair fibers and reflections on the conservation of drug molecules. *Int J Legal Med* (1996) 108:285-293.
- [91] Pragst F, Rothe M, Spiegel K, Sporket F. Illegal and therapeutic drug concentrations in hair segments- a timetable of drug exposure? *Forensic Sci Rev* (1998) 10:81-112.
- [92] Van Neste D. Thickness, medullation and growth rate of female scalp hair are subject to significant variation according to pigmentation and scalp location during ageing. *Eur J Dermatol* (2004) 14:28-32.
- [93] Lee SH, Kwon OS, Oh JK, Park WS, Moon SE, Eun HC. Bleaching phototrichogram: an improved method for hair growth assesment. *J Dermatol* (2005) 32:782-787.
- [94] Tajima M, Hamada C, Arai T, Miyazawa M, Shibata R, Ishino A. Characteristic features of Japanese women's hair with aging and with progressing hair loss. *J Dermatol Sci* (2007) 45:93-103.
- [95] Cooper GAA. Anatomy and physiology of hair, and principles for its collection. En: Kintz P, Salomone A, Vicenti M (eds.) *Hair analysis in clinical and forensic toxicology*. San Diego, EEUU: Academic Press (2015):1-22.
- [96] Kintz P, Mangin P. Opiate concentrations in human head, axillary and pubic hair. *J Forensic Sci* (1993) 38:657-662.
- [97] Offidani C, Strano Rossi S, Chiarotti M. Drug distribution in the head, axillary and pubic hair of chronic addicts. *Forensic Sci Int* (1993) 63:105-108.
- [98] Cone EJ, Darwin WD, Wang WL. The occurrence of cocaine, heroin and metabolites in hair of drug abusers. *Forensic Sci Int* (1993) 63:55-68.
- [99] Cirimele V, Kintz P, Mangin P. Testing human hair for cannabis. *Forensic Sci Int* (1995) 70:175-182.

- [100] Han E, Yang W, Lee J, Park Y, Kim E, Lim M, Chung H. Correlation of methamphetamine results and concentrations between head, axillary, and pubic hair. *Forensic Sci Int* (2005) 147:21-24.
- [101] Kintz P. Contribution of in utero drug exposure when interpreting hair results in young children. *Forensic Sci Int* (2015) 249:314-317.
- [102] LeBeau MA, Montgomery MA, Brewer JD. The role of variations in growth rate and sample collection on interpreting results of segmental analysis of hair. *Forensic Sci Int* (2011) 210:110-116.
- [103] Kronstrand R, Forstberg-Peterson S, Kagedal B, Ahlner J, Larson G. Codeine concentration in hair after oral administration is dependent on melanin content. *Clin Chem* (1999) 45(9):1485-1494.
- [104] Mieczkowski T, Newel R. A statistical examination of hair color as a potential biasing factor in hair analysis. *Forensic Sci Int* (2000) 107:13-38.
- [105] Borges CR, Roberts JC, Wilkins DG, Rollins DE. Cocaine, benzoylecgonine, amphetamine, and N-acetylamphetamine binding to melanine subtypes. *J Anal Toxicol* (2003) 27(3):125-134.
- [106] Rollins DE, Wilkins DG, Krueger GG, Augsburger MP, Mizuno A, O'Neal C, Borges CR, Slawson MH. The effect of hair color on the incorporation of codeine into human hair. *J Anal Toxicol* (2003) 27(8):545-551.
- [107] Roper-Miller JD, Huestis MA, Stout PR. Cocaine analytes in human hair: evaluation of concentration ratios in different cocaine sources, drug-user populations and surface-contaminated specimens. *J Anal Toxicol* (2012) 36(6):390-398.
- [108] Borges CR, Wilkins DG, Rollins DE. Amphetamine and N-acetylamphetamine incorporation into hair: an investigation of the potential role of drug basicity in hair color bias. *J Anal Toxicol* (2001) 25(4):221-227.
- [109] Mieczkowski T. Assessing the potential of a "color effect" for hair analysis of 11-nor-9-carboxy- Δ^9 -tetrahydrocannabinol: Analysis of a large sample of hair specimens. *Life Sci* (2003) 74(4):463-469.
- [110] Huestis MA, Gustafson RA, Moolchan ET, Barnes A, Bourland JA, Sweeney SA, Hayes EF, Carpenter PM, Simth ML. Cannabinoid concentrations in hair from documented cannabis users. *Forensic Sci Int* (2007) 169(2-3):129-136.

- [111] Jurado C, Kintz P, Menendez M, Repetto M. Influence of the cosmetic treatment of hair on drug testing. *Int J Legal Med* (1997) 110(3):159-163.
- [112] Skopp G, Potsch L, Moeller MR. On cosmetically treated hair-aspects and pitfalls of interpretation. *Forensic Sci Int* (1997) 84(1-3):43-52.
- [113] Cirimele V, Kintz P, Mangin P. Drug concentrations in human hair after bleaching. *J Anal Toxicol* (1995) 19(5):331-332.
- [114] Yegles M, Marson Y, Wennig R. Influence of bleaching on stability of benzodiazepines in hair. *Forensic Sci Int* (2000) 107(1-3):87-92.
- [115] Pritchett JS, Phinney KW. Influence of chemical straightening on the stability of drugs of abuse in hair. *Journal Anal Toxicol* (2015) 39:13-16.
- [116] Cuypers E, Flinders B, Bosman IJ, Lusthof KJ, Van Asten AC, Tytgat J, Heeren RMA. Hydrogen peroxide reactions on cocaine in hair using imaging mass spectrometry. *Forensic Sci Int* (2014) 242:103-110.
- [117] Pötsch L, Skopp G. Stability of opiates in hair fibers after exposure to cosmetic treatment. *Forensic Sci Int* (1996) 81:95-102.
- [118] Baeck S, Han E, Chung H, Pyo M. Effects of repeated hair washing and a single hair dyeing on concentrations of methamphetamine and amphetamine in human hairs. *Forensic Sci Int* (2011) 206:77-80.
- [119] Martins LF, Yegles M, Thieme D, Wenning R. Influence of bleaching on the enantiomeric disposition of amphetamine-type-stimulants in hair. *Forensic Sci Int* (2008) 176:38-41.
- [120] Takayama N, Tanaka S, Kizu R, Hayakawa K. High performance liquid chromatography study on effects of permanent wave, dye and decolorant treatments on methamphetamine and amphetamine in hair. *Biomed Chromatogr* (1999) 13:257-314.
- [121] Crunelle CL, Yegles M, De Doncker M, Dom G, Cappelle D, Maudens KE, van Nuijs ALN, Covaci A, Neels H. Influence of repeated permanent coloring and bleaching on ethyl glucuronide concentrations in hair from alcohol-dependent patients. *Forensic Sci Int* (2015) 247:18-22.
- [122] Morini L, Zucchell A, Poletini A, Politi L, Groppi A. Effect of bleaching on ethyl glucuronide in hair: An in vitro experiment. *Forensic Sci Int* (2010) 198(1-3):23-27.

- [123] Ettliger J, Kirchen L, Yegles M. Influence of thermal hair straightening on ethyl glucuronide content in hair. *Drug testing and analysis* (2014) 6(Suppl 1):74-77.
- [124] Kerekes I, Yegles M. Coloring, Bleaching, and Perming: Influence on EtG Content in Hair. *Ther Drug Monit* (2013) 35(4):527-529.
- [125] Kintz P, Bundeli P, Brenneisen R, Ludes B. Dose-concentration relationships in hair from subjects in a controlled heroin-maintenance program. *J Anal Toxicol* (1998) 22(3):231-236.
- [126] Welp EA, Bosman I, Landendam MW, Totté M, Maes RA, van Ameijden EJ. Amount of self-reported illicit drug use compared to quantitative hair results in community-recruited Young drug users in Amsterdam. *Addiction* (2003) 98(7):987-994.
- [127] Moore C, Feldman M, Harrison E, Rana S, Coulter C, Kuntz D, Agrawal A, Vincent M, Soares J. Disposition of hydrocodone in hair. *J Anal Toxicol* (2006) 30(6):353-359.
- [128] De Kesel PM, Lambert WE, Stove CP. Paraxanthine/Caffeine Concentration Ratios in Hair: An Alternative for Plasma-Based Phenotyping of Cytochrome P450 1A2? *Clin Pharmacokinet* (2015) 54(7):771-781.
- [129] Roper Miller JD, Goldberger BA, Cone EJ, Joseph RE Jr. The disposition of cocaine and opiate analytes in hair and fingernails of humans following cocaine and codeine administration. *J Anal Toxicol* (2000) 24(7):496-508.
- [130] Scheidweiler KB, Cone EJ, Moolchan ET, Huestis MA. Dose-related distribution of codeine, cocaine, and metabolites into human hair following controlled oral codeine and subcutaneous cocaine administration. *J Pharmacol Exp Ther* (2005) 313(2):909-915.
- [131] Poletti A, Cone EJ, Gorelick DA, Huestis MA. Incorporation of methamphetamine and amphetamine in human hair following controlled oral methamphetamine administration. *Anal Chim Acta* (2012) 726:35-43.
- [132] Musshoff F, Lachenmeier K, Wollersen H, Lichtermann D, Madea B. Opiate concentrations in hair from subjects in a controlled heroin-maintenance program and from opiate-associated fatalities. *J Anal Toxicol* (2005) 29:345-352.

- [133] Finnegan LP, Kaltenbach K. Neonatal abstinence syndrome. En: Hoekelman RA, Friedman SB, Nelson NM (eds.) Primary Pediatric Care. St Louis, EEUU: Mosby Year Book (1992):1367-1378.
- [134] Bell GL, Lau K. Perinatal and neonatal issues of substance abuse. *Pediatr Clin North Am* (1995) 42:261-281.
- [135] Shankaran S, Lester BM, Das A, et al. Impact of maternal substance use during pregnancy on childhood outcome. *Semin Fetal Neonatal Med* (2007) 12:143-150.
- [136] Keegan J, Parva M, Finnegan M, et al. Addiction in pregnancy. *J Addict Dis* (2010) 2:175-191.
- [137] Farst KJ, Valentine JL, Whit Hall R. Drug testing for newborn exposure to illicit substances in pregnancy: pitfalls and pearls. *Int J Pediatr* (2011) 2011:951616.
- [138] Narkowicz S, Płotka J, Polkowska Ż, Biziuk M, Namieśnik J. Prenatal exposure to substance of abuse: a worldwide problem. *Environ Int* (2013) 54:141-163.
- [139] Ross EJ, Graham DL, Money KM, Stanwood GD. Developmental consequences of fetal exposure to drugs: what we know and what we still must learn. *Neuropsychopharmacol* (2015) 40(1):61-87.
- [140] Graham K, Koren G, Klein J, Schneiderman J, Greenwald M. Determination of gestational cocaine exposure by hair analysis. *JAMA* (1989) 262(23):3328-3330.
- [141] Callahan CM, Grant TM, Phipps P, Clark G, Novack AH, Streissguth AP, Raisys VA. Measurement of gestational cocaine exposure: sensitivity of infants' hair, meconium, and urine. *J Pediatr* (1992) 120:763-768.
- [142] DiGregorio GJ, Barbieri EJ, Ferko AP, Ruch EK. Prevalence of cocaethylene in the hair of pregnant women. *Journal Anal Toxicol* (1993) 17(7):445-446.
- [143] Kintz P, Mangin P. Evidence of gestational heroin or nicotine exposure by analysis of fetal hair. *Forensic Sci Int* (1993) 63(1-3): 99-104.
- [144] Potter S, Klein J, Valiante G, Stack DM, Papageorgiou A, Stott W, Lewis D, Koren G, Zelazo PR. Maternal cocaine use without evidence of fetal exposure. *J Pediatr* (1994) 125(4):652-654.

- [145] Sallee FR, Katikaneni LP, McArthur PD, Ibrahim HM, Nesbitt L, Sethuraman G. Head growth in cocaine-exposed infants: relationship to neonate hair level. *J Dev Behav Pediatr* (1995) 16(2):77-81.
- [146] Chiarotti M, Strano-Rossi S, Offidani C, Fiori A. Evaluation of cocaine use during pregnancy through toxicological analysis of hair. *J Anal Toxicol* (1996) 20(7):555-558.
- [147] Strano-Rossi S, Chiarotti M, Fiori A, Auriti C, Seganti G. Cocaine abuse in pregnancy: its evaluation through hair analysis in pathological new-borns. *Life Sci* (1996) 59(2):1909-1915.
- [148] Kline J, Ng SK, Schittini M, Levin B, Susser M. Cocaine use during pregnancy: sensitive detection by hair assay. *Am J Public Health* (1997) 87(3):352-358.
- [149] Ursitti F, Klein J, Koren G. Clinical utilization of the neonatal hair test for cocaine: a four-year experience in Toronto. *Biol Neonate* (1997) 72(6):345-351.
- [150] Markovic N, Ness RB, Cefilli D, Grisso JA, Stahmer S, Shaw LM. Substance use measures among women in early pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* (2000) 183(3):627-632.
- [151] Ostrea EM Jr, Knapp DK, Tannenbaum L, Ostrea AR, Romero A, Salari V, Ager J. Estimates of illicit drug use during pregnancy by maternal interview, hair analysis, and meconium analysis. *J Pediatr* (2001) 138(3):344-348.
- [152] Jacqz-Aigrain E, Zhang D, Maillard G, Luton D, André J, Oury JF. Maternal smoking during pregnancy and nicotine and cotinine concentrations in maternal and neonatal hair. *Br J Obstet Gynaecol* (2002) 109:909-911.
- [153] Savitz DA, Henderson L, Dole N, Herring A, Wilkins DG, Rollins D, Thorp JM Jr. Indicators of cocaine exposure and preterm birth. *Obstet Gynecol* (2002) 99:458-465.
- [154] Bar-Oz B, Klein J, Karaskov T, Koren G. Comparison of meconium and neonatal hair analysis for detection of gestational exposure to drugs of abuse. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* (2003) 88:F98-F100.

- [155] Vinner E, Vignau J, Thibault D, Codaccioni X, Brassart C, Humbert L, Lhermitte M. Hair analysis of opiates in mothers and newborns for evaluating opiate exposure during pregnancy. *Forensic Sci Int* (2003) 133:57-62.
- [156] Vinner E, Vignau J, Thibault D, Codaccioni X, Brassart C, Humbert L, Lhermitte M. Neonatal hair analysis contribution to establishing a gestational drug exposure profile and predicting a withdrawal syndrome. *Ther Drug Monit* (2003) 25(4):421-432.
- [157] Caprara DL, Klein J, Koren G. Baseline measures of fatty acid ethyl esters in hair of neonates born to abstaining or mild social drinking mothers. *Ther Drug Monit* (2005) 27:811-815.
- [158] Eyler FD, Behnke M, Wobie K, Garvan CW, Tebbett I. Relative ability of biologic specimens and interviews to detect prenatal cocaine use. *Neurotoxicol Teratol* (2005) 27(4):677-687.
- [159] Morrison JJ, Chitty LS, Peebles D, Rodeck CH. Recreational drugs and fetal gastroschisis: maternal hair analysis in the peri-conceptual period and during pregnancy. *BJOG* (2005) 112(8):1022-1025.
- [160] Mitsuhiro SS, Chalem E, Barros MC, Guinsburg R, Laranjeira R. Teenage pregnancy: use of drugs in the third trimester and prevalence of psychiatric disorders. *Rev Bras Psiquiatr* (2006) 28(2):122-125.
- [161] Mitsuhiro SS, Chalem E, Barros MC, Guinsburg R, Laranjeira R. Prevalence of cocaine and marijuana use in the last trimester of adolescent pregnancy: socio-demographic, psychosocial and behavioral characteristics. *Addict Behav* (2007) 32(2):392-397.
- [162] Garcia-Bournissen F, Rokach B, Karaskov T, Koren G. Methamphetamine detection in maternal and neonatal hair: implications for fetal safety. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* (2007) 92(5):F351-F355.
- [163] Wurst FM, Kelso E, Weinmann W, Pragst F, Yegles M, Poromaa IS. Measurement of direct ethanol metabolites suggests higher rate of alcohol use among pregnant women than found with the AUDIT- a pilot study in a population-based sample of Swedish women. *Am J Obstet Gynecol* (2008) 198(4):407.e1-5.
- [164] Falcon M, Valero F, Pellegrini M, Rotolo MC, Scaravelli G, Joya J, Vall O, Garcia-Algar O, Luna A, Pichini S. Exposure to psychoactive substances

- in women who request voluntary termination of pregnancy assessed by serum and hair testing. *Forensic Sci Int* (2010) 196(1-3):22-26.
- [165] Favretto D, Stocchero G, Vogliardi S, Frison G, Trevisanuto D, Castagna F, Ferrara SD. Neonatal hair analysis by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry to reveal gestational exposure to venlafaxine. *Ther Drug Monit* (2010) 32(1):30-39.
- [166] Grekin ER, Svikis DS, Lam P, Connors V, LeBreton JM, Streiner DL, Smith C, Ondersma SJ. Drug use during pregnancy: validating the drug abuse screening test against physiological measures. *Psychol Addict Behav* (2010) 24(4):719-723.
- [167] Moller M, Karaskov T, Koren G. Opioid detection in maternal and neonatal hair and meconium: characterization of an at-risk population and implications to fetal toxicology. *Ther Drug Monit* (2010) 32:318-323.
- [168] Morini L, Marchei E, Vagnarelli F, Garcia Algar O, Groppi A, Mastrobattista L, Pichini S. Ethyl glucuronide and ethyl sulfate in meconium and hair-potential biomarkers of intrauterine exposure to ethanol. *Forensic Sci Int* (2010) 196:74-77.
- [169] Su Pen-Hua; Chang Yan-Zin; Chen Jia-Yuh. Infant with in utero ketamine exposure: quantitative measurement of residual dosage in hair. *Pediatr Neonatol* (2010), 51(5):279-284.
- [170] Falcon M, Pichini S, Joya J, Pujadas M, Sanchez A, Vall O, García Algar O, Luna A, de la Torre R, Rotolo MC, Pellegrini M. Maternal hair testing for the assessment of fetal exposure to drug of abuse during early pregnancy: Comparasion with testing in placental and fetal remains. *Forensic Sci Int* (2012) 2018:92-96.
- [171] Friguls B, Joya X, Garcia-Serra J, Gómez-Culebras M, Pichini S, Martinez S, Vall O, Garcia-Algar O. Assessment of exposure to drugs of abuse during pregnancy by hair analysis in a Mediterranean island. *Addiction* (2012) 107:1471-1479.
- [172] García-Serra J, Ramis J, Simó S, Joya X, Pichini S, Vall O, García-Algar O. Matrices biológicas alternativas para detectar la exposición prenatal a drogas de abuso en el tercer trimestre de la gestación. *An Pediatr (Barc.)* (2012) 77(5):323-328.

- [173] Joya X, Gomez-Culebras M, Callejón A, Friguls B, Puig C, Ortigosa S, Morini L, García-Algar O, Vall O. Cocaine use during pregnancy assessed by hair analysis in a Canary Islands cohort. *BMC Pregnancy Childbirth* (2012) 12:2-8.
- [174] Ondersma SJ, Svikis DS, LeBreton JM, Streiner DL, Grekin ER, Lam PK, Connors-Burge V. Development and preliminary validation of an indirect screener for drug use in the perinatal period. *Addiction* (2012) 107:2099-2106.
- [175] Morini L, Marchei E, Tarani L, Trivelli M, Rapisardi G, Elicio MR, Ramis J, Garcia-Algar O, Memo L, Pacifici R, Groppi A, Danesino P, Pichini S. Testing ethylglucuronide in maternal hair and nails for the assessment of fetal exposure to alcohol: comparison with meconium testing. *Ther Drug Monit* (2013) 35(3):402-407.
- [176] David AL, Holloway A, Thomasson L, Syngelaki A, Nicolaides K, Patel RR, Sommerlad B, Wilson A, Martin W, Chitty LS. A case-control study of maternal periconceptual and pregnancy recreational drug use and fetal malformation using hair analysis. *PLoS One* (2014) 9(10):e111038.
- [177] Gutierrez HL, Hund L, Shrestha S, Rayburn WF, Leeman L, Savage DD, Bakhireva LN. Ethylglucuronide in maternal hair as a biomarker of prenatal alcohol exposure. *Alcohol* (2015) 49:617-623.
- [178] Joya X, Marchei E, Salat-Batlle J, Garcia-Algar O, Calvaresi V, Pacifici R, Pichini S. Fetal exposure to ethanol: relationship between ethyl glucuronide in maternal hair during pregnancy and ethyl glucuronide in neonatal meconium. *Clin Chem Lab Med* (2015) [DOI: 10.1515/cclm-2015-0516].
- [179] Gray T, Huestis M. Bioanalytical procedures for monitoring in utero drug exposure. *Anal Bioanal Chem* (2007) 388:1455-1465.
- [180] Lozano J, Garcia-Algar O, Vall O, de la Torre R, Scaravelli G, Pichini S. Biological matrices for the evaluation of in utero exposure to drugs of abuse. *Ther Drug Monit* (2007) 29(6):711-734.
- [181] Concheiro M, González-Colmenero E, Lendoiro E, Concheiro-Guisán A, de Castro A, Cruz-Landeira A, López-Rivadulla M. Alternative matrices for cocaine, heroin, and methadone in utero drug exposure detection. *Ther Drug Monit* (2013) 35(4):502-509.

[182]Maurer HH. Analytical toxicology. EXS (2010) 100:317-337.

5. CONCLUSIONES/ CONCLUSIONS

1. A screening LC-MSMS method was developed and validated for the simultaneous identification and quantification of thirty-five licit and illicit drugs and metabolites in hair. The method showed to be specific and sensitive, achieving at least the SoHT cut-off recommendations for opiates, amphetamines, cocaine and cannabis. THC was included for the first time in a screening methodology in hair using the same extraction procedure and detection technique as the rest of compounds.
2. A confirmation LC-MSMS method was developed and validated for the determination of four classical amphetamines and eight new synthetic drugs with stimulant effects in hair. Moreover, two medicines (trazodone and phenazone), which produce mCPP as a metabolite, were also included to distinguish between licit and illicit use of this synthetic piperazine. The method was specific and sensitive, achieving LOQs lower than the SoHT cut-off recommendations for amphetamine derivatives. The method was applied to nine hair specimens from patients under trazodone daily treatment, and a significant positive correlation between the given doses and mCPP concentrations in hair was observed.
3. Different parameters that may influence interpretation of hair results were assessed. Specifically, the effect of external contamination and hair cosmetic treatments was evaluated. The case report dealing with an alleged drug-facilitated sexual assault with scopolamine emphasized the importance of the decontamination procedure and the analysis of the wash solvents in the interpretation of hair results. The analysis of a hair specimen with and without bleaching showed a dramatic decreased of drug concentrations for the thirteen substances detected. However, comparing results obtained after the analysis of a wide number of specimens from the study to evaluate *in utero* drug exposure, similar number of positive results was obtained between cosmetic treated and non-treated hair.

4. Usefulness of hair analysis for the determination of in utero drug exposure was evaluated by testing 209 maternal hair samples. Maternal hair showed to be more sensitive than maternal interview to detect drug use during pregnancy for all the analyzed drugs of abuse and medicines, except for alcohol. A total prevalence of 15.4% for drugs of abuse was found, being cocaine the most frequent detected drug, but not the most reported in the interview. For medicines, a total prevalence of 22.5% was found, mainly benzodiazepines and antidepressants; and for alcohol a prevalence of 3.9% was detected. No statistically significant differences were found in the neonatal outcomes between exposed and non-exposed newborns to the drugs included in the analytical methodology. However, statistically significant lower newborn weight and length were found in neonates from declared smokers compared with non-smokers.



El principal objetivo de esta Tesis Doctoral ha sido el desarrollo y validación de métodos multianálisis en pelo. Concretamente, se ha desarrollado y validado un método de *screening* que permite la determinación simultánea de las principales drogas de abuso (opioides, cocaína y su principal metabolito, cannabis, anfetaminas, LSD y ketamina) y fármacos de uso común (benzodiazepinas, antidepresivos e hipnóticos) mediante LC-MS/MS. También se ha desarrollado y validado un método analítico para la determinación simultánea de anfetaminas clásicas, drogas emergentes con efectos estimulantes y dos fármacos que producen mCPP como metabolito, mediante LC-MS/MS. En ambos métodos se han obtenido límites de cuantificación al menos iguales a los recomendados por la SoHT.

Otro de los objetivos de esta Tesis Doctoral ha sido la evaluación de diferentes factores que pueden influir en la interpretación de los resultados analíticos en pelo, especialmente el efecto de la contaminación externa y de los tratamientos cosméticos en diferentes casos reales.

Finalmente como último objetivo se ha estudiado la utilidad del pelo como matriz biológica para el estudio de la exposición fetal a drogas de abuso y fármacos, mediante el análisis de 209 muestras de pelo materno. El análisis del cabello materno presentó mayor sensibilidad para la detección de la exposición intraútero que la entrevista materna (a excepción del alcohol). Asimismo, el cabello materno permitió identificar un mayor número de casos positivos en comparación con otras matrices biológicas.