

Análisis por LC/MS de cocaína en peces cebras (*Danio rerio*) expuestos al alcaloide

Sebastian ORTIZ BLANCO

Trabajo de grado presentado  
para Optar al Título de Químico

Directora:

Elena E. STASHENKO, Química, *Ph.D.*

Codirector:

Andrés Fernando GONZÁLEZ SUÁREZ, Químico, *M.Sc.*

Universidad Industrial de Santander  
Facultad de Ciencias, Escuela de Química  
Centro de Investigación en Biomoléculas, CIBIMOL  
Bucaramanga  
2023

## Dedicatoria

De Sebastian Ortiz:

*“Mi familia, pareja y amigos tuvieron que aguantar que me aislara por horas a estudiar, experimentar y reflexionar, por consecuencia, muchas veces estuve ausente para ellos. Han sido fuente de apoyo, amor, felicidad y aliento al menos por un lustro. Siempre estuvieron ahí cuando los necesité, y también cuando no. Les quiero dedicar este trabajo que culmina mi primera etapa profesional, y dedicar de una vez, las que vendrán.*

*A mis padres Isidro Ortiz y Luz Amparo Blanco, por apoyar me siempre en todos mis proyectos e ideas. Por sus consejos, perseverancia y dedicación para sacar adelante sus dos hijos. A mi hermana Diana Ortiz, por estar siempre ahí para escuchar y dar consejo. A mi pareja María Camila por acompañarme durante toda la carrera, dentro y fuera de las aulas, siendo un pilar muy importante para mí, fuente de respeto y admiración. A todos mis amigos de vida y carrera, solo por mencionar algunos, Diego, Mateo, Valentina, Lucho, Yinna y Carlos, gracias por hacerme reír y compartir conmigo nuevas experiencias.”*

### Agradecimientos

Como mencionó Peter FRANKOPAN: “*La mayoría de los libros incluyen una sección de agradecimientos para que el autor exprese su gratitud a quienes le ayudaron a dar vida a su obra*”, por ello, dejo este apartado para esas personas que marcaron e influenciaron de forma positiva mi desarrollo profesional e investigación.

Agradezco sinceramente a mis directores del trabajo de grado *Ph.D.* Elena E Stashenko y *M.Sc.* Andrés F. González por compartir sus conocimientos, apreciaciones, recomendaciones, lectura crítica y corrección de este documento. Al profesor de la escuela de química UIS y subdirector del centro de investigación CENIVAM, *Ph.D.* Jairo Rene Martínez, por sus comentarios y críticas constructivas, principalmente, desde los aspectos de fisicoquímica y estadística aplicada. A los profesores de la facultad de ciencias UIS que me enseñaron durante toda la carrera, y despertaron esa curiosidad científica tan importante para el profesional químico, solo por mencionar algunos: Prof. Rosa Claudia López, Prof. Gerardo Bautista, Prof. Luz Yolanda Vargas, Prof. Alirio Palma, Prof. Angela Montaña, Prof. Arnold Romero y Prof. Adriana Albarracín.

Agradezco el apoyo económico recibido por: el laboratorio de cromatografía y espectrometría de masas (CROMMASS UIS), el proyecto BPIN-2018000100044 del Sistema General de Regalías (SGR) de Colombia, la facultad de ciencias UIS, la escuela de química UIS, el programa Bio-Reto XXI 15:50, el Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación (Minciencias) y al programa Ecosistema Científico - Colombia Científica, fondo Francisco José de Caldas contrato RC-FP44842-212-2018. Agradezco a los coordinadores *Ph.D.* Lady J. Sierra, *M.Sc.* Rogerio A. Saavedra y Zuleima Sandoval por su gestión en los proyectos mencionados.

Agradezco a los compañeros que están o estuvieron vinculados al centro de investigación durante el desarrollo de mi trabajo de investigación, que, con su conocimiento, alegría y experiencias me permitieron mejorar como profesional.

**Tabla de contenido**

	<b>Pág.</b>
Introducción .....	18
Planteamiento del problema.....	21
Justificación .....	23
1. Objetivos.....	24
1.1  Objetivo general.....	24
1.2  Objetivos específicos .....	24
2. Marco teórico .....	25
2.1  Las drogas de uso ilícito como contaminantes emergentes .....	25
2.1.1  Clorhidrato de cocaína.....	27
2.2  Modelo de pez cebra ( <i>Danio rerio</i> ) .....	29
2.3  Técnicas de extracción y de análisis instrumental .....	30
2.3.1  Dispersión de la matriz en fase sólida.....	30
2.3.2  Cromatografía gaseosa y líquida de alta eficiencia.....	32
2.3.3  Espectrometría de masas.....	35
2.4  Metabolismo de la cocaína.....	42
3. Parte experimental .....	47
3.1  Materiales, reactivos y equipos de laboratorio. ....	47
3.1.1  Materiales.....	47
3.1.2  Reactivos.....	47
3.1.3  Condiciones instrumentales LC/MS .....	47
3.1.4  Equipos para preparación de muestras.....	48

3.2	Exposición controlada de peces cebra al alcaloide.....	48
4.	Metodología.....	50
4.1	Etapa 1 – Implementación de un método de extracción MSPD para la cocaína y sus metabolitos en peces.....	51
4.1.1	Evaluación del solvente de extracción.....	51
4.1.2	Evaluación de condiciones de extracción MSPD para la cocaína y sus metabolitos.....	52
4.2	Etapa 2 – Implementación de LC/MS para el análisis de la cocaína y sus metabolitos.....	53
4.2.1	Preparación de solución estándar.....	53
4.2.2	Cuantificación y detección de cocaína y sus metabolitos.....	53
4.2.3	Evaluación del voltaje de la interfaz de electronebulización.....	54
4.3	Etapa 3 - Exposición controlada de peces cebra al alcaloide.....	54
4.3.1	Evaluación de bioacumulación del alcaloide por espécimen.....	54
4.3.2	Evaluación de bioacumulación del alcaloide en el tiempo.....	55
4.4	Determinación de la bioacumulación de la cocaína y sus metabolitos en peces cebras.....	55
4.4.1	Preparación de las muestras.....	55
4.4.2	Extracción y análisis de la cocaína y sus metabolitos.....	56
5.	Resultados y discusión.....	57
5.1	Implementación de un método de extracción MSPD para la cocaína y sus metabolitos en peces.....	57
5.1.1	Selección del solvente de extracción.....	57
5.1.2	Selección de condiciones de extracción MSPD para la cocaína y sus metabolitos.....	59
5.2	Etapa 2 – Implementación de LC/MS para el análisis de la cocaína y sus metabolitos.....	65
5.2.1	Análisis por LC/MS de material de referencia certificado (MRC).....	65

5.2.2 Evaluación del voltaje de la interfaz de electronebulización.....	70
5.3 Bioacumulación de la cocaína y sus metabolitos en peces cebras.....	73
6. Conclusiones.....	81
Referencias bibliográficas.....	82
Apéndices.....	107

**Lista de tablas**

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1.</b> Detección de algunas drogas de uso ilícito encontradas en diferentes matrices.....	26
<b>Tabla 2.</b> Sustancias encontradas en muestras de basuco incautadas.....	28
<b>Tabla 3.</b> Resultados de análisis de varianza (ANOVA) del diseño experimental 2 <sup>3</sup> para la cocaína, benzoilecgonina, ecgonina metil éster y su respuesta combinada. ....	59
<b>Tabla 4.</b> Resultados de las curvas de calibración en extracto de pez barbo de cocaína, benzoilecgonina y ecgonina metil éster (LC/MS en modo SIM) .....	62
<b>Tabla 5.</b> Propiedades cromatográficas de la cocaína, benzoilecgonina y ecgonina metil éster (LC/MS en modo SIM).....	65
<b>Tabla 6.</b> Resultados de las curvas de calibración externa de cocaína, benzoilecgonina y ecgonina metil éster (LC/MS en modo SIM).....	67
<b>Tabla 7.</b> Propiedades espectrométricas de masas obtenidas por LC/MS de las moléculas protonadas [M+H] <sup>+</sup> en modo SIM. ....	67
<b>Tabla 8.</b> Resultados de cuantificación de cocaína y sus metabolitos en peces cebra expuestos al alcaloide. ....	73
<b>Tabla 9.</b> Resultados de cuantificación en el tiempo de cocaína y sus metabolitos en peces cebra expuestos al alcaloide .....	77

**Lista de figuras**

	<b>Pág.</b>
<b>Figura 1.</b> Representación general de la técnica MSPD.....	31
<b>Figura 2.</b> Esquema general de los principales procesos que ocurren en la interfaz de ionización por <i>electrospray</i> (ESI).....	38
<b>Figura 3.</b> Diagrama del espectrómetro de masas <i>Q Exactive plus</i> (ThermoScientific) .....	41
<b>Figura 4.</b> Rutas metabólicas de la cocaína en humanos.....	45
<b>Figura 5.</b> Esquema general de la metodología experimental. ....	50
<b>Figura 6.</b> Diseño experimental de exposición de los peces cebra a la cocaína.....	54
<b>Figura 7.</b> Resultados de eficiencia de extracción (%) en función del solvente con la técnica de extracción MSPD. ....	57
<b>Figura 8.</b> Comparación de la respuesta instrumental entre el gel de sílice y la alúmina para la extracción MSPD de la cocaína y sus metabolitos.....	61
<b>Figura 9.</b> Comparación entre la eficiencia de recuperación y la cantidad de sílice-C <sub>18</sub> añadida durante la limpieza del extracto MSPD. ....	64
<b>Figura 10.</b> Corriente iónica extraída obtenida mediante LC/MS (modo SIM) de material de referencia certificado de cocaína y sus metabolitos.....	66
<b>Figura 11.</b> Estructura química básica de la cocaína y sus metabolitos.....	68
<b>Figura 12.</b> Relación entre la intensidad relativa y la energía de colisión para [M+H] <sup>+</sup> y los cuatro iones-producto en el caso de la cocaína.....	69
<b>Figura 13.</b> Relación entre área cromatográfica y el potencial del capilar de electronebulización (Vspray) para la cocaína y sus metabolitos.....	71

**Figura 14.** Comparación de la corriente iónica extraída en modo SIM para la cocaína y sus metabolitos en pez cebra con las sustancias de referencia..... 74

**Figura 15.** Comparación entre los porcentajes de cocaína bioacumulada, cantidad remanente en el agua y la cantidad de exposición por pez en los días evaluados..... 78

**Lista de Apéndices**

	<b>Pág.</b>
Apéndice A. Aval para manipular y utilizar especímenes de <i>Danio rerio</i> por parte del comité de ética en investigación científica de la Universidad Industrial de Santander (CEINCI-UIS). 107	
Apéndice B. Protocolos para sacrificio de los peces, minimización de los riesgos de afectación a los investigadores durante la ejecución del trabajo de grado y manejo de residuos biológicos y químicos.....	110
Apéndice C. Diagramas de Pareto para la respuesta combinada (A) de cocaína (B), benzoilecgonina (C) y ecgonina metil éster (D), obtenidos del análisis de varianza (ANOVA) del diseño experimental MSPD .....	113
Apéndice D. Fragmentogramas de masas de ecgonina metil éster (A), benzoilecgonina (B) y cocaína (C) obtenidos por LC/MS, operado en modo SIM de los iones $[M+H]^+$ , con energías de colisión aplicadas de 50, 30 y 30 eV, respectivamente.....	115
Apéndice E. Relación entre la intensidad relativa y la energía de colisión para $[M+H]^+$ y los cuatro iones-producto en el caso de la benzoilecgonina.....	119
Apéndice F. Relación entre la intensidad relativa y la energía de colisión para $[M+H]^+$ y los tres iones-producto en el caso de la ecgonina metil éster.....	120
Apéndice G. Efecto de la energía aplicada en la cámara de colisiones sobre la relación de intensidades del ion $[M+H]^+$ y el ion-fragmento principal de la cocaína, benzoilecgonina y ecgonina metil éster. ....	121
Apéndice H. Patrones isotópicos de ecgonina metil éster (A), benzoilecgonina (B) y cocaína (C) obtenidos por LC/MS, operado en modo <i>full scan</i> de los iones $[M+H]^+$ .....	122

### Siglas y definiciones

**AF:** *Ammonium Formate* en inglés, en español es formiato de amonio.

**ANOVA:** *Analysis of Variance* en inglés, en español análisis estadístico de las varianzas.

**BE:** *benzoylecgonine* en inglés, en español benzoilecgonina.

**CI:** *Chemical Ionization* en inglés, en español ionización química.

**COC:** *cocaine* en inglés, en español cocaína.

**C-Trap:** término utilizado en el espectrómetro de masas *Q Exactive plus* para referirse a la trampa de iones de la cual salen los iones moleculares o iones-producto hacia el *Orbitrap*.

**Detector DAD:** *Diode Array Detector* en inglés, en español detector espectroscópico de arreglo de diodos.

**EI:** *Electron Ionization* en inglés, en español ionización electrónica.

**EIC:** *Extracted Ion Current* en inglés, en español corriente iónica extraída de la corriente iónica total.

**EME:** *ecgonine methyl ester* en inglés, en español ecgonina metil éster.

**ESI:** *Electrospray Ionization* en inglés, en español ionización por electronebulización.

**eV:** unidad de energía *electronvolt* en inglés, equivale a la energía cinética adquirida por un electrón acelerado por un potencial eléctrico de 1 voltio en el vacío.

**FA:** *Formic Acid* en inglés, en español es ácido fórmico.

**FAB:** *Fast Atom Bombardment* en inglés, en español ionización por bombardeo con átomo acelerados.

**FI:** *Field Ionization* en inglés, en español ionización inducida por el campo eléctrico.

**FID:** *Flame Ionization Detector* en inglés, en español detector de ionización en llama.

**FT-ICR:** *Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance detector* en inglés, en español detector de resonancia ion-ciclotrón con transformada de Fourier.

**Full scan:** modo de adquisición de información del analizador/detector de masas en un rango de masas definido, en este trabajo se utilizó el rango  $m/z$  80-1000.

**FWHM:** *Full Width at Half Maximum* en inglés, en español ancho completo a la mitad del máximo; está definido como el ancho a la mitad de la altura de un pico simétrico.

**GC:** *Gas Chromatography* en inglés, en español cromatografía de gases.

**HRMS:** *High Resolution Mass Spectrometry* en inglés, en español espectrometría de masas de alta resolución.

**HCD:** *High energy Collision Dissociation cell* en inglés, en español celda de disociación por colisiones de alta energía; también llamado cámara de colisiones.

**HPLC:** *High Performance Liquid Chromatography* en inglés, en español cromatografía líquida de alta eficiencia.

**IT:** *Ion Trap* en inglés, en español analizador de trampa de iones.

**IUPAC:** *International Union of Pure and Applied Chemistry* en inglés, en español unión internacional de química pura y aplicada; es la autoridad reconocida internacionalmente en el desarrollo de estándares para denominación de terminología química.

**LD:** *Lethal Dosis* en inglés, en español dosis letal; es la dosis de una sustancia o radiación que resulta mortal para un conjunto de organismos de prueba.

**LOD:** *Limit Of Detection* en inglés, en español límite de detección; según la IUPAC es la cantidad más pequeña registrada de un analito presente en la muestra que es significativamente diferente al ruido de fondo.

**LOQ:** *Limit Of Quantification* en inglés, en español límite de cuantificación; según la IUPAC es la cantidad cuantitativa más pequeña de un analito presente en la muestra que es fiablemente diferente al ruido de fondo.

**m/z:** abreviatura en inglés de *mass-to-charge*, en español relación masa sobre carga; representa el valor de masa de un ion sobre su carga, comúnmente, la carga es igual a uno para moléculas pequeñas, por lo cual, se asume directamente como la masa del ion.

**MAE:** *microwave-assisted extraction* en inglés, en español extracción asistida con microondas.

**MALDI:** *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization* en inglés, en español ionización/desorción mediante láser asistida por la matriz.

**MRM:** *Multiple Reaction Monitoring* en inglés, en español monitoreo de reacciones múltiples; es un modo de adquisición de información del analizador de masas altamente selectivo, comúnmente utilizado en sistemas *tándem* QqQ, donde se seleccionan individualmente iones moleculares, se fragmentan y seleccionan sus iones-producto.

**MSPD:** *Matrix Solid-phase Dispersion* en inglés, en español dispersión de la matriz en fase sólida.

**PFE:** *pressurized fluid extraction* en inglés, en español extracción con líquido presurizado.

**PTAR:** acrónimo de planta de tratamiento de aguas residuales.

**Q:** abreviatura en inglés de *Quadrupole*, en español analizador cuadrupolar.

**SFE:** *supercritical fluid extraction* en inglés, en español extracción con fluido supercrítico.

**silice-C<sub>18</sub>:** abreviatura de gel de sílice modificada con grupos octadecilo.

**SIM:** *Single Ion Monitoring* en inglés, en español monitoreo de ion seleccionado; es un modo de adquisición de información del analizador de masas donde se seleccionan individualmente iones moleculares, se fragmentan y detectan todos sus iones-producto.

**SNC:** acrónimo de sistema nervioso central.

**SPE:** *solid phase extraction* en inglés, en español extracción en fase sólida; método de extracción utilizado únicamente para matrices líquidas, generalmente utilizado en el análisis de aguas.

**TIC:** *Total Ion Current* en inglés, en español es la corriente iónica total medida por el analizador de masas.

**TLC:** *Thin Layer Chromatography* en inglés, en español cromatografía en capa fina.

**ToF:** *Time-of-Flight analyzer* en inglés, en español analizador de tiempo de vuelo.

**Vspray:** abreviatura para el voltaje aplicado al capilar de electronebulización.

## Resumen

**Título:** Análisis por LC/MS de cocaína en peces cebra (*Danio rerio*) expuestos al alcaloide\*

**Autores:** Sebastian ORTIZ BLANCO, Elena E. STASHENKO y Andrés Fernando GONZÁLEZ SUÁREZ\*\*

**Palabras clave:** MSPD, LC/MS, contaminante, cocaína, *Danio rerio*.

Las drogas ilícitas representan un riesgo para los ecosistemas porque pueden contener impurezas y adulterantes potencialmente tóxicos para los seres vivos. La cocaína es un contaminante ambiental detectado en aguas superficiales, potables y residuales. La cocaína se metaboliza en benzoilecgonina y ecgonina metil éster por diferentes rutas metabólicas. En este trabajo, se determinó por cromatografía líquida acoplada con un detector de masas de alta resolución (LC/MS) la bioacumulación de cocaína y sus metabolitos en peces cebra expuestos al alcaloide.

Peces cebra (8) fueron expuestos a la cocaína ( $20 \text{ ng L}^{-1}$ ) durante dos semanas; al mismo tiempo que un grupo control. La cocaína y sus metabolitos fueron extraídos por dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD) y analizados por UHPLC-ESI<sup>+</sup>-Q-Orbitrap. Se utilizaron los modos de adquisición completa (*full scan*) y monitoreo de iones seleccionados (SIM), con diferentes voltajes de capilar (1.5 hasta 5.5 kV). Los patrones de fragmentación de los analitos fueron obtenidos con diferentes energías de colisión (10 hasta 70 eV). Material de referencia de cocaína y sus metabolitos fueron utilizados para la cuantificación.

La mayor eficiencia de extracción para la cocaína y sus metabolitos se obtuvo utilizando alúmina como soporte sólido, en relación muestra:soporte sólido de 1:8, y mezcla 50:50 CH<sub>3</sub>OH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> como solvente de extracción (7 mL). La mayor respuesta instrumental para la cocaína y sus metabolitos se obtuvo usando 1.5 kV en la interfaz de electro nebulización. Fragmentos típicos de la cocaína y sus metabolitos se detectaron usando 30 eV como energía de colisión.

Cocaína ( $2.1 \pm 0.36 \text{ ng/g}$  peso fresco) y benzoilecgonina ( $3.0 \pm 0.54 \text{ ng/g}$  peso fresco) fueron bioacumulados por peces cebra. EME no se detectó en el pez cebra. Reportamos por primera vez la presencia de cocaína y benzoilecgonina en peces cebras expuestos al alcaloide. Además, este es el primer reporte de extracción MSPD para la cocaína y sus metabolitos en peces.

---

\* Trabajo de Grado

\*\* Facultad de Ciencias básicas y exactas. Escuela de Química. Programa académico.

Directora: Elena E. Stashenko. *Ph.D.*. Codirector: Andrés Fernando González Suárez. *M.Sc.*

### Abstract

**Title:** LC/MS analysis of cocaine in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to the alkaloid\*

**Authors:** Sebastian ORTIZ BLANCO, Elena E. STASHENKO & Andrés Fernando GONZÁLEZ SUÁREZ\*\*

**Keywords:** MSPD, LC/MS, pollutant, cocaine, *Danio rerio*.

Illicit drugs were considered as potential harmful pollutants in aquatic ecosystems because contain impurities and adulterants with unknown biological functions. Cocaine (COC) is an environmental pollutant commonly detected in surface, drinking and wastewater. COC is metabolized to benzoylecgonine (BE) and ecgonine methyl ester (EME) by different metabolic pathways. In this work, we determined by Liquid Chromatography couple to High-Resolution Mass Spectrometry detector (LC/MS) the bioaccumulation of COC and its metabolites in zebrafish exposed to the alkaloid.

Zebrafish (8) was exposed to COC (20 ng L<sup>-1</sup>) during two weeks; at the same time control group were used. COC and its metabolites were isolated from zebrafish by matrix-solid phase dispersion (MSPD) extraction and analyzed by UHPLC-ESI<sup>+</sup>-Q-Orbitrap. Acquisition mode full scan and Single Ion-Monitoring (SIM) were used, with different capillary voltages at the ESI interface (1.5 to 5.5 kV). The fragmentation patterns were obtained at different HCD-cell energies (10 to 70 eV). COC, BE and EME certified reference material were used for quantification.

The high extraction efficiency was obtained using alumina as solid support, 1:8 as ratio sample:solid support, and mix 50:50 CH<sub>3</sub>OH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (7 mL) as eluent solvent. The highest LC peak area in the extracted ion chromatograms (EIC) of the [M+H]<sup>+</sup> ions were obtained using 1.5 kV of spray voltage. Typical fragments of BE, COC and EME were detected at 30, 30 and 50 eV HCD-cell energy, respectively.

COC (2.1 ± 0.36 ng/g fresh-weight) and BE (3.0 ± 0.54 ng/g fresh-weight) were bioaccumulated by zebrafish. EME were not detected in the zebrafish tissues. We report at the first time the presence of COC and BE in zebrafish after exposition to the alkaloid. Also, it's the first report of MSPD extraction for the analyte's isolation in fish tissues.

---

\* Undergraduate research project

\*\* Faculty of Sciences. School of Chemistry. Undergraduate program.

Supervisor: Elena E. Stashenko. *Ph.D.* co-Supervisor: Andrés Fernando González Suárez. *M.Sc.*

## Introducción

El uso de la planta de coca hace parte de las tradiciones de los indígenas suramericanos (Mortimer, 2013). El nombre de la planta proviene del quechua “Khoka” que significa “el árbol”, pero Jean-Baptiste LAMARCK fue quien le dio su nombre botánico, *Erythroxylon coca* (Mulé, 1976). El alcaloide principal de la planta fue aislado por el químico Friedrich GAEDECKE, pero Albert NIEMANN fue quien lo llamó cocaína (COC) (Ashley, 1976; Niemann, 1860). Los médicos Karl KÖLLER y William HALSTED, independientemente, usaron la COC como analgésico en cirugías oculares y descubrieron sus efectos sobre el sistema nervioso central (SNC) (Ruiz Franco, 2011). Debido a sus aplicaciones clínicas interesantes, la COC comenzó a ser producida por las empresas farmacéuticas, inicialmente por *Merck*, como una sustancia útil contra la dependencia de la morfina y principalmente, como anestésico local (NIDA & NIMH, 1973).

En Europa el uso de la hoja de coca se difundió entre la bohemia, artistas, escritores, filósofos y siquiátras. August BARTHOLDI, Herbert G. WELLS, Julio VERNE y Sigmund FREUD (Shaffer, 1984), entre otras celebridades, usaban la COC o sus productos derivados, rutinariamente, en virtud de sus efectos euforizantes y estimulantes. El producto a base de la planta de coca insignia fue el famoso vino Mariani, elaborado por Angelo MARIANI en 1863, como un tónico revitalizante. Parte de su éxito comercial se debió a su trabajo publicitario basado en el uso de las imágenes de consumidores prominentes y célebres de la época y sus testimonios, entre ellos, el papa Pío X (Mariani & Uzanne, 2019). Gracias a esto, comenzó la creación de varios productos comerciales a base de coca, entre los cuales se puede destacar el surgimiento de la famosa marca de refrescos Coca-Cola, que se comercializó en Estados Unidos, inicialmente, como un jarabe expectorante (Ruiz Franco, 2011). La coca, y, en particular, la COC ha tenido impacto en la cultura

contemporánea de tal forma que se encuentran referencias sobre esta en obras literarias como “El extraño caso del Dr. Jekyll y Mr. Hyde”, de Robert Louis STEVENSON, y sobre Sherlock Holmes, de Arthur Conan DOYLE (Musto, 1968). A pesar de su “éxito” comercial, ya sea debido a su uso recreativo o farmacéutico, cientos de casos por sobredosis de COC comenzaron a reportarse, lo que provocó que la hoja de coca y la COC, se prohibieran en los Estados Unidos (*Harrison Act*, 1914) y luego se catalogaron como drogas ilícitas (Terry, 1915).

La COC es hoy en día una sustancia de abuso de uso ilícito, que puede bioacumularse en los tejidos de mamíferos como humanos (Levisky *et al.*, 2000; Magalhães *et al.*, 2013; Poklis *et al.*, 1987), perros (Misra *et al.*, 1976) y ratones (Nayak *et al.*, 1976), además, provoca efectos fisiológicos y morfológicos adversos por su uso individual (Baumann *et al.*, 1995; Brewer *et al.*, 2008; Nzerue *et al.*, 2000; Portugal-Cohen *et al.*, 2010) o combinado con otras drogas (Foltin, 1995). Su disposición, biotransformación y excreción han sido objeto de numerosos estudios científicos (Misra *et al.*, 1975; Fish & Wilson, 1969; Mulé & Misra, 1977; Montesinos, 1965; Zhan *et al.*, 2003) que demuestran que la droga se metaboliza principalmente en benzoilecgonina (BE) y ecgonina metil éster (EME).

La COC y sus metabolitos se consideran contaminantes emergentes en los sistemas acuáticos debido a su presencia ubicua (Bijlsma *et al.*, 2016; Campestrini & Jardim, 2017; Causanilles *et al.*, 2017; Fantuzzi *et al.*, 2018; Fernández-Rubio *et al.*, 2019; Zuccato *et al.*, 2005). Estos contaminantes pueden tener consecuencias graves sobre los ecosistemas acuáticos, por lo que actualmente el estudio de sus interacciones con organismos acuáticos es un tema de alto interés científico. Algunos estudios con peces expuestos a estos contaminantes han reportado daño muscular (Capaldo *et al.*, 2018), cambios hormonales (Gay *et al.*, 2016) y morfológicos (Capaldo

*et al.*, 2019), alteración en el ritmo cardiaco (Mersereau *et al.*, 2015), cambios en el perfil proteico de embriones (Parolini *et al.*, 2017, 2018) y bioacumulación (Capaldo *et al.*, 2012).

Con base en lo anterior y en los reportes de contaminación con sustancias de origen antropogénico en organismos de ecosistemas acuáticos (Bean *et al.*, 2018; H.-Y. Kim *et al.*, 2017; Miller *et al.*, 2019; Ondarza *et al.*, 2019; Rojo *et al.*, 2019), se planteó el presente trabajo de investigación, que permite entender aún más la interacción de la COC con el pez cebra, que es un modelo biológico bien conocido y utilizado ampliamente en investigaciones biomédicas (Vargas-Vargas, 2017). En la presente investigación se estudió la bioacumulación de la COC y sus metabolitos, en peces cebra expuestos a un ambiente con COC y se planteó una metodología de extracción de la COC y sus metabolitos en pez usando la dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD). MSPD es una técnica rápida, sencilla y no requiere equipos especiales; el análisis cuantitativo de extractos se llevó a cabo por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC/MS).

### Planteamiento del problema

Hoy en día, las drogas ilícitas, entre otras muchas implicaciones, se consideran contaminantes ambientales emergentes debido a su presencia ubicua (Bijlsma *et al.*, 2016; Campestrini & Jardim, 2017; Causanilles *et al.*, 2017; Fantuzzi *et al.*, 2018; Fernández-Rubio *et al.*, 2019; Zuccato *et al.*, 2005). Las drogas ilícitas representan un potencial riesgo para los ecosistemas, porque pueden contener impurezas y adulterantes potencialmente tóxicos para el ambiente y sus habitantes. En el caso de la COC y sus metabolitos, se ha reportado su presencia y persistencia en diferentes fuentes hídricas (Causanilles *et al.*, 2017; Fantuzzi *et al.*, 2018; Fernández-Rubio *et al.*, 2019; Huerta-Fontela *et al.*, 2008), entre ellas, aguas superficiales (1,2 y 25 ng/L de COC y BE, respectivamente) (Zuccato *et al.*, 2005), residuales (1,1 y 1,4 µg/L de COC y BE, respectivamente) (Bijlsma *et al.*, 2016) y potables (34 y 515 ng/L de COC y BE, respectivamente) (Campestrini & Jardim, 2017).

La siembra de coca en Colombia ha ido creciendo en los últimos años, llegando a 204 mil ha cultivadas en el 2021 (UNODC, 2022a), incentivado, principalmente, por el aumento de valor del dólar y del oro; también, el número de consumidores creció (Insulza, 2014; OEA, 2019; PARES, 2020). La producción de la COC se ha intensificado en los últimos años, lo que aumenta el riesgo potencial para los ecosistemas acuáticos, ya que, durante la producción del alcaloide se utilizan sustancias nocivas como el permanganato de potasio, el ácido sulfúrico y el éter de petróleo, entre otras, que se desechan directamente al ambiente y se encuentran en el producto final a nivel de trazas (Cartier *et al.*, 1997).

El tráfico marítimo de clorhidrato de COC usando lanchas rápidas o semi sumergibles se ha convertido en uno de los métodos de transporte más utilizado por las organizaciones al margen de la ley (Armada de Colombia, 2020; PARES, 2020), lo que representa un riesgo grande

para los ecosistemas acuáticos, dado que, su naufragio intensional o no, expondría directamente a los organismos acuáticos a la COC en concentraciones altas. Un semi sumergible puede transportar hasta diez toneladas métricas de COC (Ramirez & Bunker, 2015). Por último, su uso recreativo, mayoritariamente, en las ciudades, también implica un riesgo para los sistemas acuáticos porque entre un 10 % y 20 % de la cantidad de COC consumida no se metaboliza y se excreta directamente a las aguas grises que terminan contaminando las fuentes hídricas (Goldstein *et al.*, 2009).

### Justificación

Estudios desarrollados con peces expuestos a la COC (Capaldo *et al.*, 2012, 2018, 2019; Gay *et al.*, 2016; Mersereau *et al.*, 2015; Parolini *et al.*, 2017, 2018) han reportado daños musculares (exposición a 20 ng/L de COC), cambios hormonales y morfológicos (exposición a 20 ng/L de COC), alteración en el ritmo cardiaco (exposición a 5 mg/L de COC), cambios en el perfil proteico de embriones (exposición entre 0,01-10 µg/L de COC), y bioacumulación (exposición a 20 ng/L de COC). La investigación sobre las interacciones de la COC con organismos acuáticos es un tema de interés científico actual, porque permite estudiar las consecuencias de la presencia del alcaloide en los ecosistemas acuáticos. El pez cebra es un modelo biológico bien conocido, utilizado ampliamente en investigaciones biomédicas (Darland & Dowling, 2001), que ha demostrado efectos provocados por COC. Sin embargo, no se han encontrado estudios asociados con la bioacumulación de la COC o sus metabolitos en el pez luego de la exposición prolongada al alcaloide.

El presente trabajo de investigación proporciona información sobre la bioacumulación de la COC o sus metabolitos en el pez cebra luego de su exposición al alcaloide y permitirá entender este proceso. El trabajo plantea una metodología de preparación de muestras en el pez cebra, usando la técnica de extracción MSPD, que es rápida, sencilla y coherente con los postulados de la química verde (porque reduce la cantidad de reactivos y solventes utilizados). El análisis de la COC y sus metabolitos en el pez cebra se llevó a cabo por cromatografía líquida de ultra-alta eficiencia (UHPLC) con un sistema de detección de espectrometría de masas de alta resolución (*Orbitrap*).

## 1. Objetivos

### 1.1 *Objetivo general*

Estudiar la bioacumulación de cocaína en peces cebras expuestos a un ambiente contaminado con el alcaloide, usando la extracción MSPD y el análisis por LC/MS.

### 1.2 *Objetivos específicos*

Implementar el método de extracción MSPD para la cocaína y sus metabolitos en pez cebras, estudiando las variables cantidad y tipo de soporte sólido, y el tipo y volumen de solvente de elución.

Implementar el método de análisis instrumental LC/MS para la cocaína y sus metabolitos extraídos del pez cebras teniendo en cuenta el voltaje del capilar.

Cuantificar la cocaína y sus metabolitos en peces cebras expuestos a un ambiente contaminado con el alcaloide.

## 2. Marco teórico

### 2.1 *Las drogas de uso ilícito como contaminantes emergentes*

Los contaminantes emergentes son sustancias químicas que aparecen en fuentes hídricas y presentan un potencial riesgo para los ecosistemas (Mandaric *et al.*, 2015). Se trata de sustancias de origen antropogénico que se utilizan de forma habitual (*e.g.*, fármacos) o de manera adictiva. Se usa el término “droga de uso ilícito” para referirse a toda sustancia que esté legalmente prohibida y cuyo uso no tenga fines médicos aprobados.

Cada país ha elaborado sus normativas listas de sustancias que deben estar controladas, principalmente, por sus efectos sobre la salud, como lo es el *Control Substances Act* en los Estados Unidos. Sin embargo, estas limitaciones o prohibiciones han permitido, principalmente, que las sustancias de uso ilícito o sus derivados se comercialicen en el “mercado negro” con precios muy altos en donde se producen, distribuyen y se consumen en ausencia total de supervisión médica o profesional (UNODC, 2018). Algunas sustancias de uso ilícito pueden obtenerse a partir de sustancias lícitas, de tal forma, que las fuentes de origen de las drogas controladas divergen notoriamente. Un diagrama que presenta cómo las sustancias lícitas (*e.g.*, sustancias farmacéuticas y plaguicidas) e ilícitas (*e.g.*, drogas controladas) se distribuyen por todo el ambiente, se encuentra en el trabajo realizado por DAUGHTON y RUHOY (Daughton & Ruhoy, 2008).

Las drogas controladas son contaminantes ambientales que se diferencian principalmente de los fármacos por no contar con información precisa cuantitativa y de trazabilidad sobre su origen, no tienen una identidad química conocida (esto es válido para las drogas “de diseño”), contienen impurezas y adulterantes potencialmente tóxicos para el ambiente. La información toxicológica y farmacocinética de estas sustancias en organismos vivos (en especial, en ambientes acuáticos) está ausente en la mayoría de los casos, tampoco existen estrategias de su eliminación

del ambiente. Al ser la contaminación con estas sustancias una fuente de exposición que conduzca a posibles problemas de la salud pública, la comunidad científica investiga, por ejemplo, la presencia e incidencia de dichas sustancias en diferentes fuentes hídricas (Bean *et al.*, 2018; H.-Y. Kim *et al.*, 2017; Miller *et al.*, 2019; Ondarza *et al.*, 2019; Rojo *et al.*, 2019).

En la **Tabla 1**, se puede observar como la cocaína (COC) y sus metabolitos, benzoilecgonina (BE) y ecgonina metil éster (EME) , se encuentran presentes y persisten en diferentes fuentes hídricas (Causanilles *et al.*, 2017; Fantuzzi *et al.*, 2018; Fernández-Rubio *et al.*, 2019; Huerta-Fontela *et al.*, 2008) como aguas superficiales (1,2 y 25 ng/L de COC y BE, respectivamente) (Zuccato *et al.*, 2005), residuales (1,1 y 1,4 µg/L de COC y BE, respectivamente) (Bijlsma *et al.*, 2016) y potables (34 y 515 ng/L de COC y BE, respectivamente) (Campestrini & Jardim, 2017). Estas sustancias son contaminantes ubicuos en los ecosistemas acuáticos, en Colombia provienen de la actividad ilícita, acompañada por su transporte y disposición directa en el mar (PARES, 2020) y su uso recreativo en las ciudades, por encontrarlas en aguas residuales (Bijlsma *et al.*, 2016).

**Tabla 1.**

*Detección de algunas drogas de uso ilícito encontradas en diferentes matrices.*

Sustancia	Agua			Biosólido	Aire	Dinero	Tejido animal
	Residual	Superficial	Potable				
<b>Analgésicos</b>							
6-AM	x ✓	x ✓	x			✓	
Codeína	✓✓✓	✓✓	x x ✓			x	
Morfina	✓✓✓	✓	x		x	✓	
Heroína	x x ✓	x	x		✓	✓✓	
Metadona	✓✓✓	✓	✓✓		x		
<b>Estimulantes</b>							
Metanfetamina	✓✓✓	✓	x x ✓	✓	x ✓	✓	
MDMA	✓✓	✓	✓		x ✓		

Continuación **Tabla 1**

Sustancia	Agua			Biosólido	Aire	Dinero	Tejido animal
	Residual	Superficial	Potable				
<b>Estimulantes</b>							
Cocaína	✓✓	✓	x ✓		✓✓	✓✓✓	✓
Benzoilecgonina	✓✓✓	✓	✓		✓	✓	
Ecgonina metil éster	x ✓✓						
<b>Alucinógenos</b>							
LSD	x x ✓	x	x		x		
Ketamina	x x ✓	x	x				
<b>Canabinoides</b>							
CBN					✓✓	x ✓	
CBD					x ✓	x ✓	
THC	✓✓	✓✓	x		✓✓	x ✓	

"x": su incidencia es baja, a mayor número de "x" hay más información al respecto.

"✓": su incidencia es alta, a mayor número de "✓" hay más información al respecto.

*Nota.* Adaptado de (Whitacre, 2011).

### 2.1.1 Clorhidrato de cocaína

Las drogas controladas contienen cantidades apreciables de impurezas y contaminantes, potencialmente tóxicos para el ambiente. Algunas de estas sustancias son añadidas intencionalmente y pueden llegar a cantidades verdaderamente altas, *e.g.*, la COC distribuida en la calle puede contener más de un 50 % de impurezas (Siegel, 2015). Estas sustancias pueden ser clasificadas como adulterantes, diluyentes, productos de síntesis (precursores, productos intermedios), impurezas naturales (*e.g.*, otros alcaloides, diferentes a COC, presentes en la hoja de coca) y productos de degradación (*e.g.*, productos de oxidación durante el almacenamiento). Para el “basuco” (basura sucia de cocaína) o COC de calle, se pueden encontrar adulterantes como la procaína y la lidocaína, analgésicos utilizados en odontología, y otras sustancias, que tienen como finalidad intensificar los efectos de la droga; diluyentes como la creatina, que es un suplemento dietético, entre otras sustancias, que se añaden para aumentar el peso de droga

que se distribuye para incrementar así las ganancias. Estas sustancias se llaman agentes de corte o *cutting agents*; también, se encuentran impurezas como el ácido benzoico, producto de descomposición de COC. Otras sustancias encontradas en el basuco incautado se presentan en la

**Tabla 2.**

**Tabla 2.**

*Sustancias encontradas en muestras de basuco incautadas.*

Sustancia	Descripción	Uso común	Clasificación		
			Adulterante	Diluyente	Impureza
Aspirina	Antiinflamatorio	Alivia el dolor	✓		
Ácido bórico	Antiséptico local	Medicación contra el acné		✓	
Cafeína	Estimulante	Ingrediente alimenticio	✓		
Diazepam	Sedante	Medicación para trastornos de sueño	✓		
Sacarosa	Azúcar	Ingrediente alimenticio		✓	
Almidón	Carbohidrato	Ingrediente alimenticio		✓	
Acetaminofén	Antiinflamatorio	Alivia el dolor	✓		
Truxilinas	Alcaloides				✓
Ecgonina metil éster	Metabolito de la cocaína				✓
Benzoilecgonina	Metabolito de la cocaína				✓

*Nota.* Adaptado de (Siegel, 2015).

El clorhidrato de cocaína es la sal de COC, se encuentra típicamente como un polvo cristalino de color blanco y soluble en agua (1 g/0,4 mL H<sub>2</sub>O) (UNODC, 2012). Es un producto semi-sintético obtenido después de la extracción de COC de las hojas de coca y se trafica en el mundo como clorhidrato con pureza del 80 % al 98 % (UNODC, 2012). Algunas otras sustancias, reactivos o disolventes, que se usan en la producción de COC durante su análisis pueden ser detectados, entre ellos, figuran: norcocaína, clorhidrato de benzoilo, permanganato de potasio,

ácido sulfúrico y éter de petróleo. Por ejemplo, CARTIER y col. (Cartier *et al.*, 1997) describieron la detección de solventes residuales en muestras de COC y heroína.

## 2.2 Modelo de pez cebra (*Danio rerio*)

El pez cebra (*Danio rerio*) o *zebrafish* (en inglés), es un pez pequeño de agua dulce, de la familia *Cyprinidae*, originario de la India y distribuido por todo el mundo con fines comerciales o de investigación (Vargas-Vargas, 2017). Crece rápidamente (en tres meses aproximadamente), su precio en el mercado local es relativamente bajo (comercialmente, \$3000 COP c/u), al igual que su mantenimiento (S. Kim *et al.*, 2009). Es un pez “sociable”, por lo cual, se recomienda mantenerlo en grupos de 6-15 ejemplares por litro (Castranova *et al.*, 2011). Los parámetros fisicoquímicos del agua para su buen mantenimiento son los siguientes: pH 6,8-7,5; temperatura 26-28,5 °C; dureza del agua 50-100 mg/L CaCO<sub>3</sub>; concentración de oxígeno disuelto >6 mg/L; alcalinidad 50-150 mg/L CaCO<sub>3</sub> y concentración de nitritos (0,1 mg/L) y nitratos (50 mg/L), entre otros (Avdesh *et al.*, 2012). Su mantenimiento es mínimo y no requiere personal técnico/especializado para su manipulación. Por estas razones, el pez cebra se ha convertido en un modelo de gran utilidad en investigaciones biomédicas por todo el mundo (Allende *et al.*, 2011; Briggs, 2002; Hill *et al.*, 2005; Lieschke & Currie, 2007; Paw, 2003).

Hoy en día, el pez cebra es un organismo ampliamente utilizado en investigaciones sobre el desarrollo y genética de vertebrados, porque responde a estímulos asociados, entre muchos otros, a las drogas como COC (Darland & Dowling, 2001). El pez cebra se ha convertido en un modelo importante en investigaciones biológicas sobre los mecanismos de adicción a las drogas. Estudios desarrollados por LÓPEZ-PATIÑO y col. (López Patiño, Yu, Cabral, *et al.*, 2008; López Patiño, Yu, Yamamoto, *et al.*, 2008) demostraron como el pez cebra sufre síntomas de abstinencia a la COC, como la ansiedad, hiperactividad y movimientos erráticos (con dosis entre 5 µg/L y 50

mg/L de clorhidrato de COC); responde al tratamiento con benzodiazepina; para la disminución de estos efectos negativos, además, que exhibe un dimorfismo sexual en la respuesta hacia la COC (dosis 0,5 mg/L de clorhidrato de COC). Se realizaron estudios sobre los efectos de COC en embriones de pez cebra (Barreto-Valer *et al.*, 2012, 2013; López-Bellido *et al.*, 2013; Parolini *et al.*, 2017, 2018), que mostraron variaciones en sus neuro-receptores (dosis 0,5 mg/L de clorhidrato de COC), su citotoxicidad (dosis 0,01-10 µg/L de COC) y la alteración en el perfil proteico (dosis 0,3-1 µg/L de COC), entre otros efectos.

### **2.3 Técnicas de extracción y de análisis instrumental**

#### **2.3.1 Dispersión de la matriz en fase sólida**

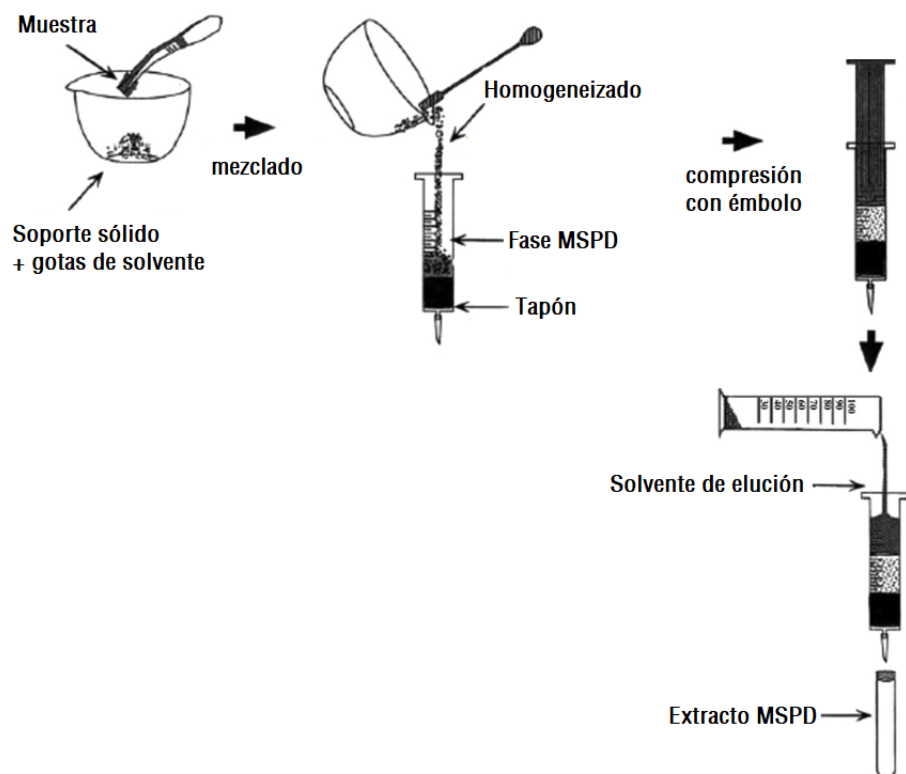
La preparación de la muestra es uno de los pasos más importantes en la cadena analítica, llega a ocupar a veces más de un 80 % del tiempo total del análisis. La reproducibilidad, la sensibilidad, la selectividad y la confiabilidad del experimento dependen del éxito en la preparación de la muestra (Stashenko & Martínez, 2011).

La complejidad de la mayoría de las muestras biológicas hace necesario una preparación de muestras exhaustiva, con limpieza (*clean-up*), para garantizar la separación y detección sensible y confiable de los analitos *target*. La mayoría de los procedimientos de preparación de muestras utilizan varios pasos, pueden ser largos, consumen recursos, pueden ocurrir pérdidas de analitos, y tal vez, contaminación cruzada. En comparación con otras técnicas de extracción para muestras semisólidas y sólidas, entre ellas, la extracción con fluido supercrítico (SFE), la extracción asistida con radiación de microondas (MAE) y la extracción con ultrasonido, la técnica de extracción por dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD) se lleva a cabo en condiciones ambientales y no requiere ningún tipo de instrumental especial, costoso o sofisticado (Pawliszyn, 2012).

La técnica MSPD fue introducida en 1986 por BARKER (Barker *et al.*, 1986), para la extracción de analitos de matrices semisólidas y sólidas. La muestra se mezcla y dispersa con un soporte sólido, posteriormente, la mezcla homogeneizada se empaqueta en una pequeña columna, de la cual los analitos se eluyen luego con un solvente apropiado. La dispersión de la matriz en la superficie del sorbente incrementa el área superficial de la muestra expuesta al solvente, sin perder eficiencia de extracción (Barker *et al.*, 1990). En la **Figura 1**, se encuentra la representación general del proceso.

### Figura 1.

*Representación general de la técnica MSPD.*



*Nota.* Adaptado de (Pawliszyn, 2012).

Los siguientes son algunos soportes sólidos, a saber: el gel de sílice modificada con grupos octadecilo (C<sub>18</sub>), sílices no derivatizadas (*e.g.*, gel de sílice, arena), fibras de grafito, Florisil®

y alúmina. El proceso de dispersión de la muestra es manual, siendo esto, probablemente, una de las principales limitaciones de la técnica. La cantidad de soporte sólido depende de la cantidad de la muestra y la duración del mezclado depende de su rigidez.

Existen dos protocolos de elución para utilizar: (1) la elución de las interferencias (paso de lavado o *clean-up*) y posterior elución de los analitos; y (2) la elución directa de los analitos, de tal forma, que las interferencias sean selectivamente retenidas. Cuando se requiera una limpieza extra, se puede acoplar directamente la columna MSPD a un cartucho SPE, *e.g.*, ubicar el adsorbente sólido SPE en la parte inferior de la columna MSPD para remover interferencias (Ramos *et al.*, 2004).

La técnica MSPD ha sido ampliamente utilizada para el análisis de sustancias exógenas (*e.g.*, drogas, plaguicidas y otros contaminantes traza) y endógenas (*e.g.*, componentes de bacterias o células) en matrices sólidas, semisólidas y viscosas (Barker *et al.*, 1989). Esta metodología es rápida, sencilla y no requiere equipo especial, además, se reduce la cantidad de muestra y de reactivos para utilizar, es una alternativa buena que concuerda con los lineamientos de la química verde.

### **2.3.2 Cromatografía gaseosa y líquida de alta eficiencia**

A inicios del siglo XX, Mikhail TSWETT separó pigmentos naturales por la elución de un extracto de plantas en una columna rellena con un absorbente, el denominó este proceso cromatografía (Zechmeister, 1946). Hoy en día, se define a la cromatografía como un proceso de separación de sustancias mediante su interacción con dos fases, la fase móvil y la fase estacionaria, generalmente, en una columna cromatográfica, aunque hay también cromatografía de capa delgada (TLC) y en papel. Una forma de entender el proceso de separación en cromatografía es imaginarlo como una serie continua y dinámica de distribuciones del soluto entre la fase móvil y la fase

estacionaria, representadas por las constantes de distribución de cada analito (soluto) (Jennings *et al.*, 1997).

Debido que la retención de un analito en la columna se ve influenciada esencialmente por su afinidad tanto por la fase móvil como la fase estacionaria, la salida del analito de la columna dependerá de la rapidez con la cual se establezca su equilibrio dinámico entre las dos fases (Giddings & Eyring, 1955). Los cromatogramas como gráficas suelen reportarse en función del tiempo, ya que, permiten evidenciar la separación que sufren los analitos en la columna a través de sus picos, caracterizados por las alturas/áreas y sus posiciones en la escala de tiempo (tiempo de retención,  $t_R$ ).

Los conceptos generales de cromatografía incluyen: tiempos de retención ( $t_R$ ), resolución ( $R_s$ ), factor de retención ( $k$ ), ancho del pico cromatográfico ( $W_t$ ), constante de distribución ( $K_D$ ) y la relación volumétrica de fases ( $\beta$ ) (Jennings *et al.*, 1997). La temperatura de la columna en cromatografía gaseosa (GC) es un parámetro muy importante para tener en cuenta experimentalmente porque tiene un efecto sobre la variación del factor de retención. En la cromatografía líquida (LC), la separación se lleva a cabo a temperatura ambiente y la retención de los analitos y la selectividad están controladas, principalmente, por el cambio la polaridad de la fase móvil (Martin & Synge, 1941). En GC, la retención y selectividad están principalmente controladas por la temperatura, la naturaleza química y polaridad de la fase estacionaria (Knox, 1978).

### **Cromatografía líquida de alta eficiencia**

La cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) es una técnica que se desarrolló a finales de los años 60. Un ejemplo de esto fue el trabajo de LIPSKY (Preiss & Lipsky, 1967). El flujo y el cambio de la composición química de la fase móvil permiten romper el equilibrio de

distribución entre las dos fases, para que los analitos, que ingresan simultáneamente, puedan ser separados, según sus constantes de distribución. En fase reversa, los analitos muy polares van a interactuar muy débilmente con la fase estacionaria, eluirán primero de la columna; por el contrario, los analitos que tengan menor polaridad y mayor interacción con la fase estacionaria, tendrán tiempos de retención más largos.

HPLC es una técnica que permite separar sustancias no volatilizables; por esta técnica pueden ser analizadas mezclas de sustancias con alta polaridad, peso molecular alto que no son estables térmicamente y pueden formar iones en solución. La principal diferencia de HPLC con GC se encuentra en el uso de un líquido como eluyente en lugar de un gas. Esto implica dos cosas: (1) los líquidos pueden ser entre 20-100 veces más viscosos que un gas, por lo cual, se requiere aumentar la presión de entrada de la fase móvil; (2) la velocidad de difusión de un líquido puede ser entre 3000-30000 veces más lenta que la de un gas, de modo que las columnas en los sistemas HPLC pueden ser entre 50-200 veces más cortas que las columnas GC (Knox, 1978). Una mejora en la separación de analitos por LC, se logra con cromatografía líquida de ultra-alta eficiencia (UHPLC), la cual requiere menor cantidad de solventes, pero presiones de la fase móvil más altas (41-100 MPa) en comparación con HPLC convencional (13-34 MPa) (Batoool & Mena, 2020; de la Guardia & Armenta, 2011).

El análisis cromatográfico de drogas de uso ilícito, como COC y sus metabolitos, presenta una serie de retos, debido a la volatilidad baja de algunos analitos de interés (*e.g.*, BE y EME) y a la presencia de contaminantes e interferencias. La cromatografía es una técnica versátil para el análisis de mezclas complejas y se puede combinar con técnicas de preparación de muestras, como la derivatización de los analitos; permite también el acoplamiento con la espectrometría de masas (GC/MS, LC/MS).

GC ha sido el método tradicional para el análisis de drogas de uso ilícito y sus metabolitos en muestras biológicas, *e.g.*, muestras de orina (Von Minden & D'Amato, 1977; Wallace *et al.*, 1976), utilizando detectores de ionización en llama (FID). Para la detección específica e identificación confirmatoria, sin embargo, se han utilizado detectores selectivos de espectrometría de masas (MS), en modo monitoreo de iones seleccionados (SIM) (Lachenmeier *et al.*, 2003; Stashenko, 2012). Los analitos que pueden ser analizados por la técnica GC/MS deben ser estables a temperaturas relativamente altas (250 - 300 °C), volatilizables, no experimentar ninguna modificación química, y, por lo general, su peso molecular debe ser inferior a 500-550 Da. Menos del 10 % de las moléculas existentes cumplen estas condiciones (Stashenko & Martínez, 2011). La técnica HPLC ha ido “ganando” el campo para el monitoreo y detección de drogas y sus metabolitos. Hoy en día, se encuentra mucha literatura científica sobre el análisis y monitoreo de COC y sus metabolitos en simultáneo, usando HPLC-DAD (Brunetto *et al.*, 2005) o LC/MS (Andrés-Costa *et al.*, 2016; Castiglioni *et al.*, 2006, 2008; Gheorghe *et al.*, 2008; Helou *et al.*, 2018; Langman *et al.*, 2009; Miller *et al.*, 2019; Ondarza *et al.*, 2019; van Nuijs *et al.*, 2009), en diferentes matrices. Desde finales de los años 80, el desarrollo de LC/MS se ha enfocado mucho en su aplicación en bioquímica, porque puede analizar moléculas altamente polares (*e.g.*, bases orgánicas como aminas, péptidos, proteínas y alcaloides), incluyendo especies iónicas.

### **2.3.3 Espectrometría de masas**

La espectrometría de masas (MS) es una técnica para el análisis estructural de compuestos químicos. Su desarrollo inicial está vinculado con los trabajos de Sir J.J THOMSON, considerado el padre de la espectrometría de masas. Las aplicaciones de esta técnica son amplias, van desde la química ambiental, síntesis orgánica, análisis de productos naturales hasta control de procesos, petroquímica y química forense, entre otros. Aunque la técnica ha demostrado gran madurez,

se encuentra en constante desarrollo e innovación, principalmente, en el área del acoplamiento con otras técnicas analíticas como la cromatografía y electroforesis capilar para el análisis de biomoléculas.

El evento central de la espectrometría de masas es la ionización del analito, acompañado frecuentemente de su fragmentación. La ionización puede ocurrir en fase gaseosa, *e.g.*, ionización con electrones, ionización química o ionización por campo (EI, CI y FI, respectivamente), o en fase condensada, *e.g.*, ionización por electronebulización (ESI), ionización por bombardeo con átomos acelerados (FAB) o ionización/desorción mediante láser asistida por la matriz (MALDI). A partir de un espectro de masas, se puede obtener la siguiente información: (1) la masa molecular; (2) los grupos funcionales presentes; (3) la composición elemental, *i.e.* fórmula exacta (si se dispone de un equipo de alta resolución) y (4) hasta la estereoquímica de una molécula (Stashenko, 2009).

El método de ionización en la espectrometría de masas acoplada a cromatografía de gases (GC/MS) más utilizado para moléculas orgánicas termoestables y volatilizables es la ionización con electrones. Un electrón acelerado transfiere energía a una molécula en fase gaseosa ( $10^{-5}$ – $10^{-6}$  Torr), lo que conduce a la pérdida de un electrón de la molécula y la formación de un ion molecular ( $M^+$ ), que es un catión-radical. La energía de electrones estándar para este método es 70 eV, ya que, proporciona la eficiencia de ionización y su reproducibilidad más altas. La eficiencia de ionización por electrones no es muy alta: una molécula se ioniza entre  $10^4$ - $10^6$  moléculas, según la naturaleza química de la sustancia. A pesar de esto, este modo de ionización es muy sensible, sobre todo, cuando se usa el método de adquisición de corrientes iónicas SIM (Stashenko & Martínez, 2009). Las moléculas que se pueden analizar por GC/MS deben ser necesariamente compatibles con la técnica de cromatografía de gases, es decir, ser termoestables,

volatilizables y de peso molecular relativamente bajo (< 500 Da). El método de ionización por electrones es clasificado como “fuerte”, ya que, la energía transferida supera con creces la energía potencial de ionización de cualquier molécula orgánica (6-13 eV), lo cual, favorece los procesos de fragmentación del ion molecular y obtención de información estructural (Stashenko, 2009).

El método de ionización más común, que se utiliza en el acoplamiento con cromatografía líquida (LC/MS), es ionización por electronebulización. La electronebulización o *electrospray* fue introducida por FENN y col. (Yamashita & Fenn, 1984), e independientemente, por ALEKSANDROV y col. (Aleksandrov *et al.*, 1984, 1985). ESI es un método que permite transferir los iones presentes en solución hacia la fase gaseosa. Un esquema general de ESI se presenta en la **Figura 2**. En la interfaz ESI se aplica un campo eléctrico alto ( $E_c \approx 10^6$  V/m) a la punta de un capilar que logra crear un cono (denominado cono de Taylor (Taylor, 1964)), y luego, un aerosol de analito y solvente cuyas gotas están cargadas superficialmente. Una vez generadas, las gotas disminuyen su tamaño por un proceso de desolvatación o fisión, lo que provoca su ruptura secuencial hasta obtener los analitos ionizados, casi totalmente desolvatados. La fisión se da gracias a la repulsión de cargas en la superficie de la gota, la cual al igualar y superar la tensión superficial del solvente (límite de Rayleigh), logra estallar la gota (explosión de Coulomb) en gotas mucho más pequeñas (Cole, 1997).

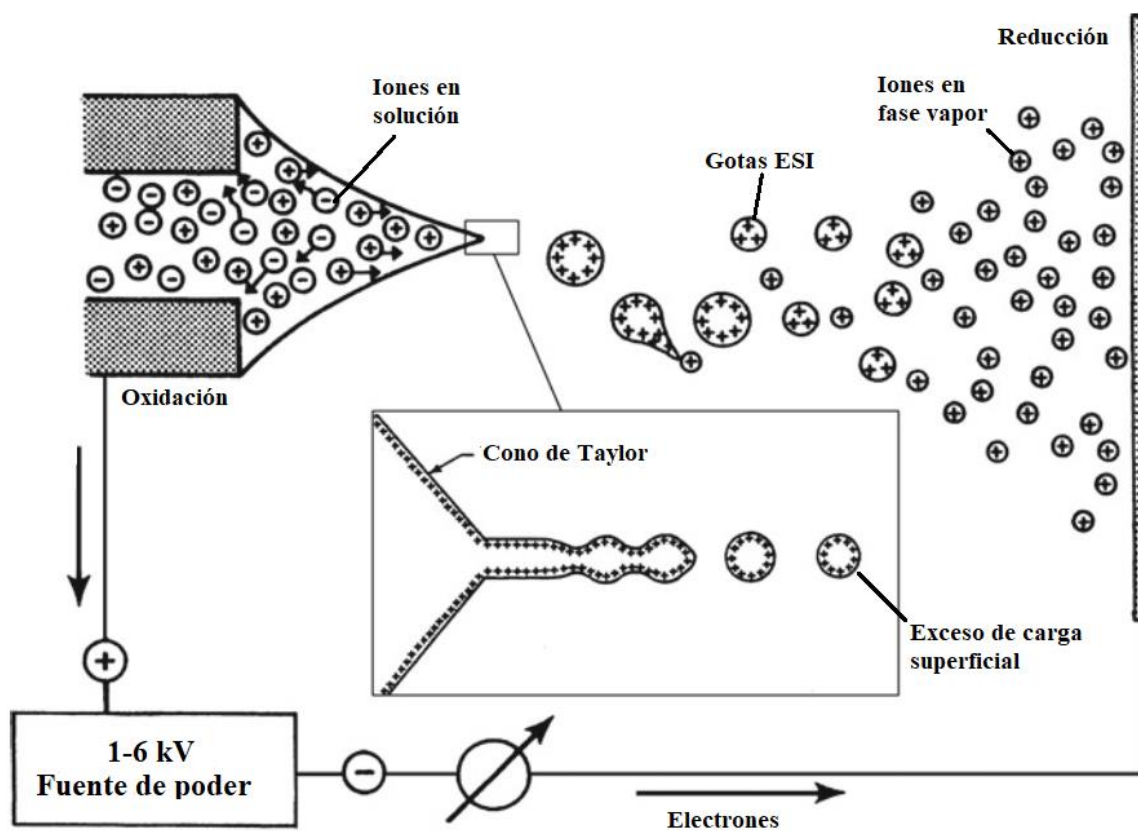
ESI es un método de ionización que se lleva a cabo a presión atmosférica. La eliminación del solvente se da por su evaporación por transferencia gradual de energía térmica, lo que disminuye la energía transferida a los iones moleculares y evita su fragmentación; por tanto, ESI se clasifica como una técnica de ionización “suave”.

Para el estudio de la fragmentación de moléculas protonadas o deprotonadas se requiere aplicar energía adicional que permita fragmentar/disociarlos. Frecuentemente se utiliza la

configuración *tándem* en el espacio (MS/MS), donde en un espacio entre analizadores se ubica la cámara (celda) de colisiones, en donde se da la energización y fragmentación de las moléculas protonadas/deprotonadas y posteriormente, la detección de sus iones-producto. El mecanismo de energización es típicamente colisión con un gas inerte ( $N_2$ , He o Ar).

### Figura 2.

Esquema general de los principales procesos que ocurren en la interfaz de ionización por electrospray (ESI).



Nota. Adaptado de (Cech & Enke, 2001).

En general en LC/MS, pueden ser analizables aquellas moléculas que ya sean iones o que sean fácilmente ionizables por protonación ( $[M+nH]^{n+}$ ), deprotonación ( $[M-nH]^{n-}$ ), adición de un catión (e.g,  $[M+nNa]^{n+}$ ) o anión (e.g,  $[M+nHCOO]^{n-}$ ). En consecuencia, para el análisis por

LC/ESI-MS es necesario conocer: (1) el pH de la fase móvil; (2) la concentración de modificadores volátiles; (3) el flujo de salida; (4) el voltaje aplicado al capilar ( $V_{\text{spray}}$ ); (5) la estructura del analito y su pKa; (6) la presencia de impurezas y (7) la composición de la fase móvil (Gross, 2017). La eficiencia de ionización por ESI depende tanto de los analitos como de los parámetros instrumentales, *e.g.*,  $V_{\text{spray}}$  de electronebulización: una molécula se ioniza entre  $1-10^5$  moléculas solubles.

La detección de los iones que ingresan al espectrómetro de masas no es trivial, dado que, se requiere diferenciar, por su relación  $m/z$ , las moléculas del analito de las moléculas que eluyen simultáneamente del sistema cromatográfico. La IUPAC (Gold, 2019), define la resolución en espectrometría de masas como la capacidad para distinguir dos picos adyacentes que difieren muy poco ( $\Delta m$ ) entre sus anchos a la altura media (FWHM). Esta definición no ha quedado fuera de debate científico, por ejemplo, Murray (Murray, 2022) resume como la definición de resolución en espectrometría de masas ha cambiado desde sus orígenes.

Al comparar analizadores de masas, generalmente, se utiliza el poder de resolución (*resolving power*) ( $m/\Delta m$ ) para medir cuantitativamente su capacidad de separar y detectar iones; siendo clasificados como analizadores de alta resolución aquellos cuyo poder de resolución es mayor de  $10^4$  (Xian *et al.*, 2012). Los analizadores con bajo poder de resolución son: deflexión magnética (B), cuadrupolo (Q), trampa de iones (IT), tiempo de vuelo (ToF) sin reflectrón o sus configuraciones *tándem* (QqQ, Q-IT, Q-ToF). Los analizadores con alto poder de resolución son: doble enfoque con campos electrostático (E) y magnético (B), ToF con reflectrón, resonancia ion-ciclotrón con transformada de Fourier (FT-ICR) y *Orbitrap*. Analíticamente el alto poder de resolución, o alta resolución, es importante porque permite distinguir la contribución de “masa” de la energía nuclear de cada isotopo, denominado defecto de masa; y determinar así la

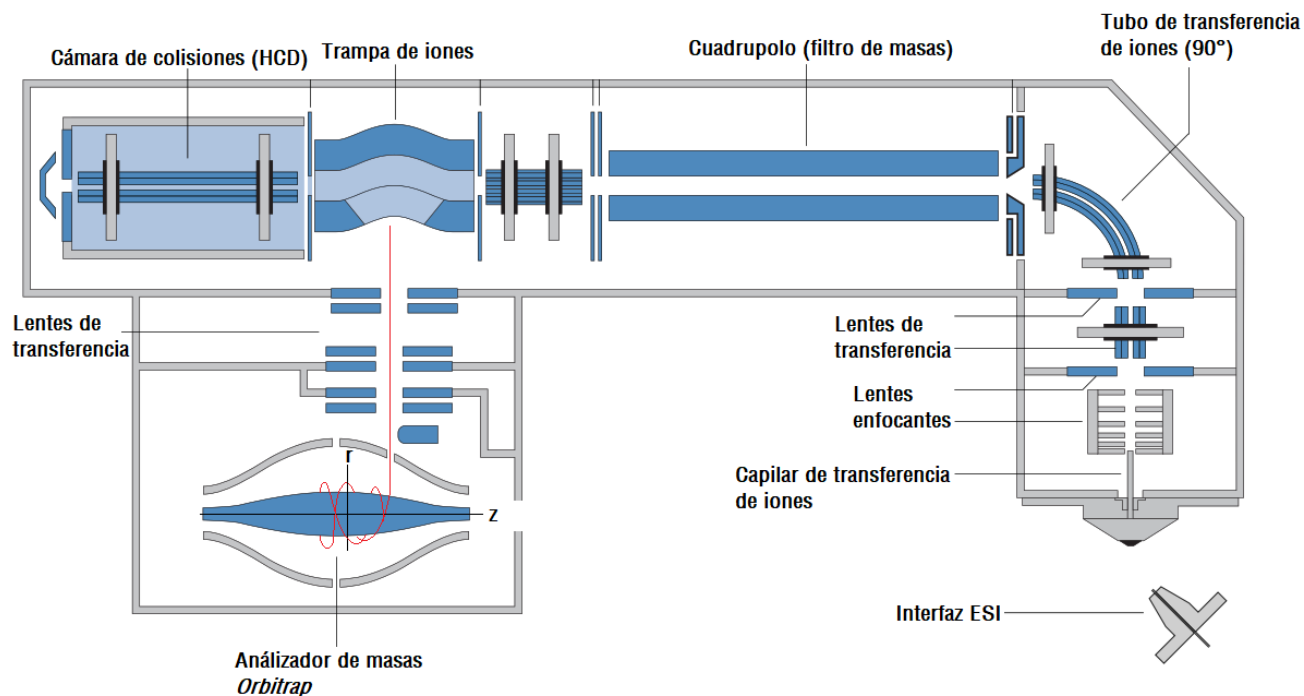
composición elemental del ion (Crutchfield & Clarke, 2017; Sleno, 2012). Para diferenciar la composición elemental entre dos señales  $m/z$  700 con  $C_3$  y  $SH_4$  ( $\Delta m \approx 3.4 \times 10^{-3}$ ), respectivamente, se requiere un poder de resolución mayor de 200 000. Otro parámetro instrumental utilizado para comparar entre analizadores de masas es la exactitud de masas ( $\Delta ppm$ ). La exactitud de masas se calcula con la *Ecuación 1*:

$$\Delta ppm = \frac{\text{masa exacta calculada} - \text{masa exacta experimental}}{\text{masa exacta calculada}} \times 10^6 \quad (1)$$

La respuesta del detector (señal instrumental) está basada en la medición de una propiedad física del sistema, *e.g.*, corriente iónica, la cual debe ser proporcional a la cantidad de analito que ingresa al detector. El detector de masas puede funcionar como detector universal (modo *full scan*), selectivo o específico (modo SIM) (Stashenko & Martínez, 2009). En este trabajo de investigación se utilizó la configuración *tándem Q-Orbitrap*, para el análisis y la detección de los iones de los analitos. El diagrama del espectrómetro de masas utilizado se presenta en la **Figura 3**.

**Figura 3.**

Diagrama del espectrómetro de masas Q Exactive plus (ThermoScientific).



Nota. Adaptado de (Michalski *et al.*, 2011).

El analizador de masas *Orbitrap* fue presentado por MAKAROV (Makarov, 2000), aplicando conocimientos sobre óptica de iones con analizadores cuadrupolares y FT-ICR. En el espectrómetro de masas *Q exactive plus*, los iones son transferidos desde la entrada del espectrómetro de masas hacia el cuadrupolo, por un conjunto de lentes colimadores y aceleradores. El cuadrupolo filtra los iones (modo SIM) según su relación  $m/z$ , variando la radio frecuencia de transmisión, y los transfiere a la trampa de iones (*C-Trap*); desde *C-Trap* pueden enviarse los iones a la cámara de colisiones (HCD) para su fragmentación o ser transferidos directamente al *Orbitrap*. Los iones moleculares y los iones-producto ingresan tangencialmente al *Orbitrap* desde *C-Trap* donde quedan atrapados orbitalmente por el campo eléctrico generado entre dos electrodos; los iones orbitan alrededor del electrodo interno con forma de huso. El analizador *Orbitrap* mide la

corriente inducida por el movimiento armónico oscilatorio de los iones en el eje axial al electrodo interno (eje Z). La frecuencia ( $\omega$ ) de estas oscilaciones depende únicamente de la relación  $m/z$  y de la curvatura del campo eléctrico ( $k_E$ ) (Hardman & Makarov, 2003; Makarov, 2000). Esto se expresa en la *Ecuación II*:

$$\omega = \sqrt{\left(\frac{e}{m/z}\right) k_E} \quad (\text{II})$$

El analizador *Orbitrap* tiene hasta 600 000 de poder de resolución, alta exactitud ( $\Delta\text{ppm}$ , 2-5) y permite medir relaciones  $m/z$  hasta 6000, por lo cual, su uso se ha centrado para proteómica y toxicología, entre otros (Hu *et al.*, 2005; Scigelova & Makarov, 2006).

Actualmente, el uso de la espectrometría de masas acoplada a técnicas cromatográficas para el análisis de drogas ilícitas ha ido creciendo, lo que se evidencia con aplicaciones y desarrollo de metodologías, solo por mencionar algunos artículos recientes (Fernández-Rubio *et al.*, 2019; Fontes *et al.*, 2019; Helou *et al.*, 2018; Ondarza *et al.*, 2019). La espectrometría de masas añade una tercera dimensión a la información obtenida en el análisis, es decir, el espectro de masas de cada componente, la “huella digital” del compuesto, que permite identificarlo inequívocamente, más aún, cuando se compara con la sustancia certificada. La sensibilidad del análisis aumenta al utilizar el modo SIM y mediante la extracción de la corriente iónica (EIC) (Gross, 2017). El uso de analizadores de alta resolución para el análisis forense es cada vez más recurrente (Filho *et al.*, 2019; Ojanperä *et al.*, 2012). En el caso de la COC, su espectro de masas y rutas de fragmentación, ya se han estudiado previamente (Smith & Casale, 2010).

#### **2.4 Metabolismo de la cocaína**

Desde su aislamiento en 1855 por parte del químico Friedrich GAEDECKE, y posteriormente, por el estudiante de doctorado del profesor Friedrich WÖHLER, Albert

NIEMANN (Ashley, 1976; Niemann, 1860), la COC ha sido una sustancia bastante estudiada en lo que respecta a su interacción con organismos vivos. Inicialmente, su estudio estaba inspirado por las leyendas asociadas con los efectos estimulantes de la hoja de coca. Pero, luego de los trabajos de Karl KÖLLER y William HALSTED, quienes demostraron independientemente el uso de COC como anestésico local en cirugías oculares y de garganta, así como en odontología (Ruiz Franco, 2011), los estudios sobre COC se enfocaron en su aplicación farmacéutica, aunque, posteriormente, se descubrió su habilidad para generar dependencia.

La COC es un estimulante psicomotor que inhibe la reabsorción de neurotransmisores como la dopamina, lo que prolonga y aumenta sus efectos; produce euforia, agitación y alucinaciones, en dosis grandes (Bell, 2013; Sofuoglu *et al.*, 2001). Su dosis letal (LD) es de un gramo por inyección intravenosa única (Muriel P. *et al.*, 2008). Su consumo crónico puede generar paranoia, aislamiento social y, en algunos casos, anorexia (Novák *et al.*, 1984). Se ha comprobado que la COC en humanos acelera el ritmo cardíaco, eleva los niveles de cortisol y aumenta la presión arterial (Baumann *et al.*, 1995; Foltin, 1995), genera daños dermatológicos, daños en los riñones, en las pupilas y en el sistema cardiovascular (Brewer *et al.*, 2008; Nzerue *et al.*, 2000; Portugal-Cohen *et al.*, 2010) y puede bioacumularse (Levisky *et al.*, 2000; Magalhães *et al.*, 2013; Poklis *et al.*, 1987).

Cuando se requiere entender o estudiar la toxicología de alguna sustancia en un organismo vivo, se deben tener en cuenta inicialmente cuatro etapas: (1) la adsorción, hace referencia a la vía de exposición de la sustancia; (2) la distribución, responde a cómo se dispone, fija o bioacumula dicha sustancia en los tejidos o fluidos fisiológicos; (3) su metabolización, que describe cómo la sustancia se transforma en nuevas sustancias, generalmente, esta transformación va dirigida hacia la obtención de productos más polares; y (4) su eliminación cuando se desechan

estos productos de transformación (metabolitos), y, a veces, la sustancia original se excreta sin modificación. Otro aspecto para tener en cuenta es la dosis a la cual se expone el organismo, ya que, esta puede determinar qué tan letal o tóxica es una droga, como lo expreso PARACELTUS (Adatsi, 2014).

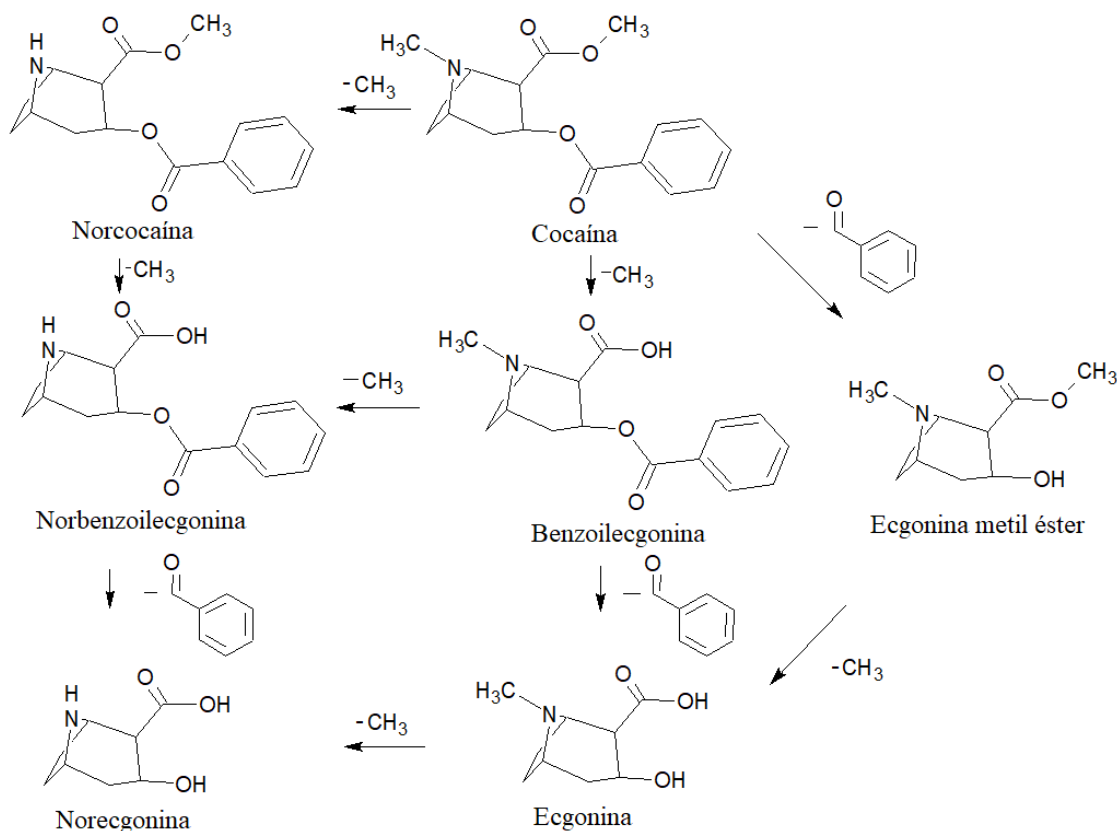
La farmacocinética de COC depende de múltiples factores como su forma fisicoquímica de consumo, la ruta de administración, la genética del individuo y la mezcla con otras sustancias, por ejemplo, el alcohol. Su tiempo de vida media en el organismo humano es de aproximadamente de 0.7-1.5 h, aunque la mayoría de la dosis se elimina en minutos. Su absorción y metabolismo se da rápidamente, y el pico de sus efectos varía dependiendo de la ruta de administración (Maurer *et al.*, 2006). Hasta el 10 % de la dosis original de COC puede ser excretada sin modificación en la orina (Koob *et al.*, 2014). Se distribuye en el organismo y puede bioacumularse, por varios días. WEISS y GAWIN (Weiss & Gawin, 1988) reportaron que un consumidor crónico puede dar positivo a un *test* de COC luego de 22 días de no consumirla.

La metabolización de COC se da a través de varios caminos enzimáticos, principalmente en el hígado y en el plasma sanguíneo, algunos de los cuales son: (1) hidrólisis de COC a BE por acción de la butirilcolinesterasa; (2) N-demetilación de COC por el citocromo P450 y formación de norcocaína, siendo ésta una de las responsables de su hepatotoxicidad; y (3) reacción con la carboxilcolinesterasa para producir EME (Misra *et al.*, 1975; Fish & Wilson, 1969; Mulé & Misra, 1977; Montesinos, 1965; Zhan *et al.*, 2003; Cone *et al.*, 1998; Chasin & Mídio, 1997). La eliminación de la COC y sus metabolitos se da principalmente por la orina, siendo BE y la EME, los metabolitos principales de eliminación (Goldstein *et al.*, 2009). Hoy en día, se dispone de suficiente literatura acerca de los mecanismos de acción (Nestler, 2004; Zhan, 2006) y sobre la dependencia generada por COC (Hutchings & Widdop, 2013; Marraffa, 2014; Rai &

Tewari, 2018; Siegrist & Wiegand, 2014). Múltiples experimentos de exposición a la COC se han desarrollado con animales, como perros (Misra *et al.*, 1976), ratones (Brazeau *et al.*, 1995; Budziszewska *et al.*, 2009; Nayak *et al.*, 1976; Schmidt *et al.*, 1995) e incluso abejas (Søvik *et al.*, 2013), para estudiar sus efectos y consecuencias. Un esquema de las rutas metabólicas de la COC en el ser humano se presenta en la **Figura 4**.

#### Figura 4.

*Rutas metabólicas de la cocaína en humanos.*



*Nota.* Adaptado de (Mulé, 1976).

El presente trabajo de investigación está enfocado en el análisis de la COC, el cual es, un contaminante potencialmente tóxico para ecosistemas acuáticos que se deposita en el medio

durante su producción, transporte y eliminación (UNODC, 2011). Debido a esto, el estudio de su interacción con especímenes vivos es de gran interés académico e importancia ambiental y social. Para estudiar dicha interacción, se escogió el pez cebra por su rápido crecimiento y bajo costo de adquisición y mantenimiento (S. Kim *et al.*, 2009), además, porque responde a la COC (Darland & Dowling, 2001). Algunos experimentos con peces cebra y COC, han reportado la aceleración del ritmo cardiaco, citotoxicidad, entre otros efectos, pero no su bioacumulación luego de exposición crónica (Barreto-Valer *et al.*, 2012, 2013; Kirla *et al.*, 2016; López Patiño, Yu, Cabral, *et al.*, 2008; López Patiño, Yu, Yamamoto, *et al.*, 2008; López-Bellido *et al.*, 2013; Mersereau *et al.*, 2015; Parolini *et al.*, 2017, 2018). El uso de una técnica de preparación de muestras rápida, sencilla, robusta y que no requiere equipo especial, como MSPD, y aplicación de técnicas analíticas *tándem*, como LC/MS, para la separación, detección e identificación específica de la COC y sus metabolitos en el pez, son elementos indispensables para la obtención de resultados confiables y reproducibles.

Gracias a la información disponible y a experiencia de trabajo con MSPD, para el análisis de alcaloides y algunos metabolitos secundarios (Agudelo *et al.*, 2018; Prada *et al.*, 2020b), así como las herramientas LC/MS disponibles en CROM-MASS-UIS, para el análisis de sustancias ilícitas, dichas técnicas se usaron en el presente trabajo de investigación. Se aprovechó la espectrometría de masas de alta resolución, para confirmar la presencia de la COC y su metabolito principal en el pez e identificarlos a través de sus fórmulas elementales (masas exactas), relaciones isotópicas, patrones de fragmentación de las moléculas ionizadas, y comparación con el material de referencia.

### 3. Parte experimental

#### 3.1 Materiales, reactivos y equipos de laboratorio.

##### 3.1.1 Materiales.

Los tubos Eppendorf™ y tubos Falcon™ de polipropileno de alta densidad (libres de ADN) y los filtros Millex-GV® de fluoruro de polivinilideno (PVDF) con tamaño de partícula de 0.22 µm se obtuvieron de ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, EE. UU.). Las jeringas hipodérmicas estériles se obtuvieron de NIPRO (Bogotá, Colombia). Los morteros y pistilos de porcelana se obtuvieron de un proveedor local.

##### 3.1.2 Reactivos.

La cocaína (≥ 99 %), la benzoilecgonina (≥ 99 %) y el cloruro de ecgonina metil éster (≥ 98 %) se obtuvieron de Lipomed (Arllesheim, Suiza). El gel de sílice (referencia Silicagel 60G), la alúmina (referencia óxido de aluminio 90 neutral), el metanol (CH<sub>3</sub>OH) grado LC/MS, el *isopropanol* (2-propanol) grado LC, el ácido fórmico (FA) Suprapur® y el diclorometano SupraSolv® se obtuvieron de Merck (Darmstadt, Alemania). El formiato de amonio (AF) (≥ 99 %) se obtuvo de Alfa Aesar (Tewksbury, MA, EE. UU.). El gel de sílice modificado con grupos octadecilo (sílice-C<sub>18</sub>) fue Selectra-Sorb® Endcapped (Bristol, PA, EE. UU.). El agua tipo I con 18 MΩcm de resistividad se obtuvo usando un sistema de purificación Synergy® UV de Millipore (Molsheim, Francia). El gas nitrógeno (> 99 %) se obtuvo de un generador NM32LA de Peak Scientific (Escocia, Reino Unido).

##### 3.1.3 Condiciones instrumentales LC/MS

La separación cromatográfica fue realizada con un sistema UHPLC *Vanquish™ Flex* (Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.), equipado con una columna *Zorbax Eclipse XDB-C18* (50 mm, L × 2,1 mm, I.D. × 1,8 µm, tamaño de partícula). El flujo de la fase móvil,

que contenía agua (0.1 % FA + 5 mM AF) [fase A] y CH<sub>3</sub>OH (0.1 % FA + 5 mM AF) [fase B], fue 300 µL/min. El gradiente inicial fue 100 % fase A, cambiando linealmente hasta 100 % fase B (8 min), se mantuvo por 4 min y retornó hasta 100 % fase A (1 min). El volumen de inyección fue de 2 µL. El sistema cromatográfico estaba conectado con un espectrómetro de masas *Q Exactive™ Plus Orbitrap* por una interfaz de electronebulización (HESI-II) de Thermo Scientific (Bremen, Alemania). Se estableció la temperatura del capilar en la interfaz (320° C) y se varió el voltaje del capilar (Vspray, 1.5 – 5.5 kV). Las masas de las moléculas protonadas de cada analito fueron filtradas por el cuadrupolo. Las moléculas filtradas se fragmentaron en la cámara de colisiones con diferentes energías normalizadas (HCD, 10 – 70 eV). El análisis de la información se realizó con el *software Thermo Xcalibur 3.1* (Thermo Scientific, San Jose, CA, EE. UU.).

### **3.1.4 Equipos para preparación de muestras**

La liofilización de los peces se realizó dentro del liofilizador *VirTis Advantage Plus* (SP Scientific, PA, EE. UU.). La sonicación, agitación y centrifugación de los extractos fueron realizados con un baño de ultrasonido *Elmasonic S15H* (Singen, Alemania), un agitador de vórtice MX-S (DLAB Scientific, CA, EE. UU.) y una microcentrífuga *MIKRO 220* (Tuttlingen, Alemania), respectivamente.

### **3.2 Exposición controlada de peces cebra al alcaloide**

Los especímenes de pez cebra (*Danio rerio*), los especímenes de pez barbo tigre (*Puntius tetrazona*) y las peceras de vidrio (7 L) se obtuvieron del comercio local. El agua potable fue recirculada por un filtro de acuario externo XP-03 (Jeneca Electromechanical, Huanggang, China) a razón de 160 L/hora. Los peces se alimentaron con hojuelas TetraMin Tropical Flakes® (Melle, Alemania) dos veces por día. El experimento cumplió con la ley colombiana (N° 84, 1989)

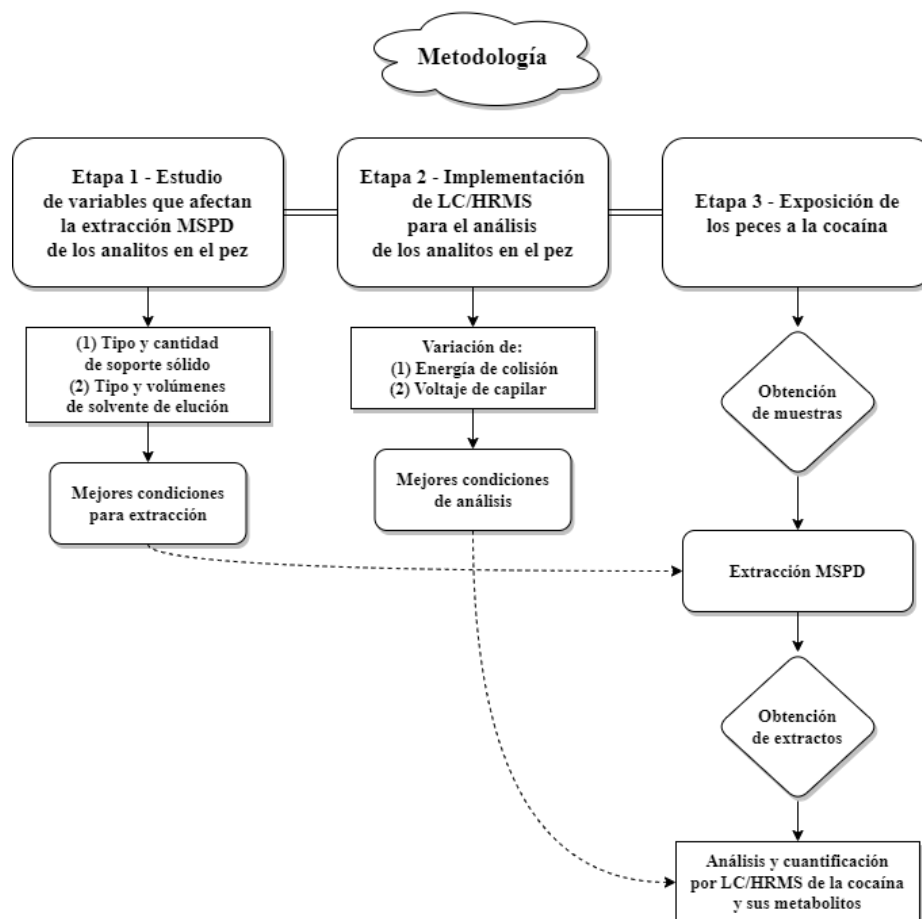
para protección de animales utilizados en experimentación científica. El proyecto fue avalado por el comité de ética de la Universidad Industrial de Santander (CEINCI – UIS), Acta N° 13 del 12 de agosto del 2022 (**Apéndice A**).

#### 4. Metodología

Con base en los objetivos del presente trabajo, se plantearon las siguientes etapas experimentales para su desarrollo. La primera etapa, establece cómo se implementó el método MSPD para la extracción de la cocaína y sus metabolitos en pez cebra y qué variables se estudiaron. La segunda etapa comprende la implementación de LC/MS para el análisis de la cocaína y sus metabolitos. Durante la tercera etapa, se cuantificó la cocaína en pez cebra utilizando la técnica MSPD y el método instrumental LC/MS. En la **Figura 5**, se observa un esquema que resume la metodología utilizada en este trabajo.

#### Figura 5.

*Esquema general de la metodología experimental.*



#### **4.1 Etapa 1 – Implementación de un método de extracción MSPD para la cocaína y sus metabolitos en peces.**

Se utilizaron peces barbo tigre (*Puntius tetrazona*), miembro de la familia *Cyprinidae* a la que pertenece también el pez cebra, como matriz de prueba. Se tomaron entre tres y cuatro peces barbo ( $2.5 \pm 0.41$  g en fresco,  $4.1 \pm 0.33$  cm longitud, 74.6 % humedad), se liofilizaron (48 horas,  $-40$  °C, 59 kPa) y maceraron manualmente hasta convertirlos en polvo. La matriz de prueba se almacenó a  $-20$  °C, protegida de la luz. Cada soporte sólido se acondicionó ( $100$  °C, 24 horas) previo experimento. Los morteros de porcelana se lavaron con solución de dicromato de potasio en ácido sulfúrico, abundante agua destilada, metanol, diclorometano y acetona en ese orden, después de cada extracción MSPD, y secaron ( $120$  °C, 1-2 horas). Para la evaluación de las variables de extracción se dopó la matriz de prueba (50 mg) con una alícuota (10  $\mu$ L) de solución dopante (100  $\mu$ g/L COC, 100  $\mu$ g/L BE y 200  $\mu$ g/L EME), 15 minutos previa extracción.

La COC y sus metabolitos fueron extraídos por MSPD, añadiendo *isopropanol* (400  $\mu$ L), dispersando manualmente la matriz y el soporte sólido hasta obtener un polvo homogéneo y seco. La mezcla se colocó en una jeringa hipodérmica (10 mL), se comprimió con el embolo y se eluyó con solvente en un tubo Falcon™ (15 mL). El extracto se evaporó a sequedad con corriente de nitrógeno y se almacenó a  $-20$  °C, protegido de la luz.

##### **4.1.1 Evaluación del solvente de extracción.**

Se adaptó el método de extracción planteado por PRADA y col. (Prada *et al.*, 2020a) para la extracción por MSPD de alcaloides en tejido animal. Se dispersó la matriz con sílice-C<sub>18</sub> en proporción 1:6 en masa (300 mg) y se varió el tipo de solvente de elución entre metanol (100 %), metanol:diclorometano (1:1 v/v) y diclorometano (100 %), usando el mismo volumen (5 mL) para

cada caso. Se realizaron réplicas (3) por cada tipo de solvente en orden aleatorio (9 en total). El MRC se preparó en extracto libre de alcaloides para determinar sus eficiencias de extracción (%Eficiencia de extracción) según la *ecuación III*.

$$\% \text{Eficiencia} = \frac{\text{Cantidad de alcaloide experimental}}{\text{Cantidad de alcaloide teórica}} \times 100 \quad (\text{III})$$

#### 4.1.2 Evaluación de condiciones de extracción MSPD para la cocaína y sus metabolitos

Se realizó un diseño experimental factorial  $2^3$ , tres variables con dos niveles cada uno (-1,1). Se asignó un número aleatorio a cada punto de la región experimental para organizar el orden de ejecución. Se evaluaron los niveles bajo y alto de las variables: (A) el tipo de soporte sólido (gel de sílice, alúmina); (B) relación muestra:soporte sólido (1:4, 1:8 en masa); y (C) el volumen de solvente de elución (3 mL, 7 mL). Se hicieron replicas (4) utilizando sílice-C<sub>18</sub> como soporte sólido en proporción 1:6 en masa y 5 mL de solvente de elución. Se utilizó la mezcla metanol:diclorometano (1:1 v/v) como solvente de elución para todos los experimentos. El análisis de varianza (ANOVA) se hizo con el *software Statgraphics Centurion XVI* (StatPoint Tech, VA, EE. UU.). La respuesta combinada se calculó según la *ecuación IV*.

$$\text{Respuesta combinada}_i = \frac{\frac{\text{Área COC}_i}{\text{Área COC}_{\text{máx}}} + \frac{\text{Área BE}_i}{\text{Área BE}_{\text{máx}}}}{2} \quad (\text{IV})$$

Siendo Área alcaloide<sub>*i*</sub> el área cromatográfica obtenida por LC/MS en modo SIM para cada punto experimental (*i*); y Área alcaloide<sub>*máx*</sub> el área cromatográfica máxima obtenida por LC/MS en modo SIM para toda la región experimental.

Se evaluó la limpieza del extracto, utilizando diferentes cantidades de sílice-C<sub>18</sub>, (10, 20 y 40 mg), y se calculó la recuperación (%Recuperación) según la *ecuación III*.

## **4.2 Etapa 2 – Implementación de LC/MS para el análisis de la cocaína y sus metabolitos.**

### **4.2.1 Preparación de solución estándar.**

Materiales de referencia (MRC) de COC, BE y EME se pesaron individualmente y se disolvieron en metanol, logrando una concentración final de 1.0 mg/mL. Las soluciones madre se almacenaron a -20 °C en oscuridad.

### **4.2.2 Cuantificación y detección de cocaína y sus metabolitos.**

Se realizaron curvas de calibración en extracto libre de alcaloides para cada analito, utilizando las condiciones de extracción que dieron la mayor respuesta analítica. Se realizaron curvas de calibración externa de COC, BE y EME por LC/MS, operado en modo SIM, para la determinación de algunas figuras de mérito instrumentales; la identificación de COC, BE y EME, se hizo según su composición elemental, la distribución isotópica, los patrones de fragmentación, y por comparación con los MRC de cada alcaloide. Las curvas de calibración se hicieron con once puntos de concentración con réplicas (5) en dos puntos intermedios (puntos cuatro y ocho). Se evaluó la formación de iones-producto característicos variando la energía de colisión aplicada (10-70 eV). El cálculo de los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) se realizó con el método recomendado por la IUPAC y la ACS (Mocak *et al.*, 1997); siendo LOD y LOQ las cantidades de analito cuya respuesta instrumental está tres y diez desviaciones estándar por encima del ruido de fondo, respectivamente. La estructura del ion  $[M+H]^+$  en el estado singlete de COC y sus metabolitos, solvatados en agua, fue optimizada con el programa Gaussian09 (Gaussian, Inc., CT, EE. UU.) (Frisch, 2016), aplicando los parámetros utilizados por AMARA y col. (Amara *et al.*, 2021).

### 4.2.3 Evaluación del voltaje de la interfaz de electronebulización.

Se evaluó la respuesta instrumental para la COC y sus metabolitos al variar el voltaje del capilar de electronebulización (1.5 kV – 5.5 kV). Se inyectaron réplicas (3) de la solución mezcla (10 ng/L COC, 10 ng/L BE y 20 ng/L EME) por cada voltaje.

### 4.3 Etapa 3 - Exposición controlada de peces cebra al alcaloide

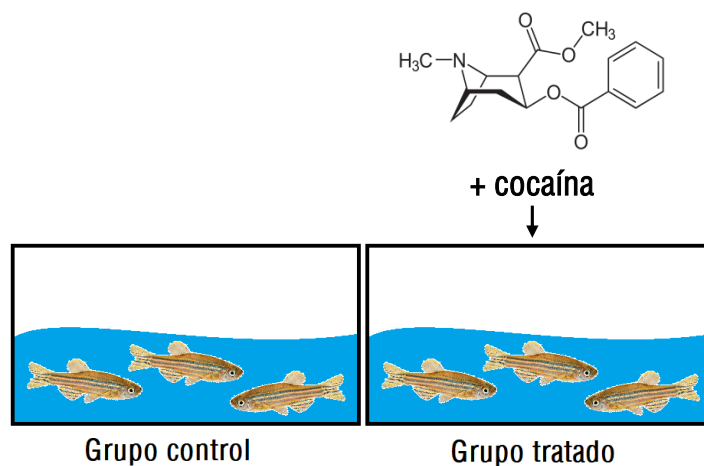
Los peces cebra se sometieron a un periodo de aclimatación de dos semanas con fotoperiodo natural de luz en agua potable.

#### 4.3.1 Evaluación de bioacumulación del alcaloide por espécimen

Los peces se dividieron en dos grupos (control y tratado), con ocho y tres peces, respectivamente. El grupo tratado fue expuesto a COC (20 ng/L) durante dos semanas añadiendo una alícuota (15  $\mu$ L) de solución *stock* de COC (10 mg/L). Se analizó individualmente cada pez como se presenta más adelante. La representación gráfica del montaje experimental se presenta en la **Figura 6**.

#### Figura 6.

*Diseño experimental de exposición de los peces cebra a la cocaína.*



### 4.3.2 Evaluación de bioacumulación del alcaloide en el tiempo

Los peces se dividieron en dos grupos (control y tratado), con nueve y tres peces, respectivamente. Se evaluó la bioacumulación del alcaloide en peces cebra para los días 0 (2 horas después de exposición), 7 y 14, tras el periodo de aclimatación. El grupo tratado fue expuesto a COC (20 ng/L) añadiendo una alícuota (15 µL) de solución *stock* de cocaína (10 mg/L) en el día 0. Al día 7, se reemplazaron 650 mL de agua “contaminada” por agua potable, previamente oxigenada, y se añadió una alícuota (1.3 µL) de la solución *stock* de COC para reestablecer la concentración teórica de exposición. Se muestrearon tres especímenes del grupo tratado para cada día de medición. Los especímenes muestreados y liofilizados fueron macerados y dispersados con alúmina (relación 1:8 en masa) hasta obtener un polvo homogéneo, el cual, fue almacenado a -20 °C en oscuridad. El análisis de las muestras se presenta adelante. Se calculó el porcentaje de COC total bioacumulada para cada día de exposición con la *Ecuación V*:

$$\%COC_{\text{Total bioacumulada}_i} = \frac{\text{cantidad COC en pez}_i + \text{cantidad BE en pez}_i \times \frac{\text{Mmol COC}}{\text{Mmol BE}}}{\text{cantidad COC en el agua}_i} \quad (\text{V})$$

Siendo cantidad COC en pez<sub>*i*</sub> y cantidad BE en pez<sub>*i*</sub> las cantidades promedio de COC y BE detectadas en pez para cada día evaluado (*i*); Mmol COC y Mmol BE las masas moleculares de COC y BE, respectivamente; y cantidad COC en el agua la cantidad de COC calculada en el agua para cada día evaluado (*i*).

## 4.4 Determinación de la bioacumulación de la cocaína y sus metabolitos en peces cebras.

### 4.4.1 Preparación de las muestras.

El protocolo de sacrificio de los peces cebra se presenta en el **Apéndice B**. Los peces, individualmente, fueron pesados y liofilizados. Todos los peces liofilizados se almacenaron a -20 °C en oscuridad, hasta su extracción.

#### **4.4.2 Extracción y análisis de la cocaína y sus metabolitos.**

Cada muestra se sometió al proceso de extracción MSPD, descrito en la *sección 4.1*. El extracto se reconstituyó con metanol grado LC/MS (1 mL). Una alícuota de extracto (250  $\mu$ L) se mezcló con sílice-C<sub>18</sub> (20 mg), se agitó en vórtice (3000 RPM, 1 min) y centrifugó (6000 RPM / 3502 RCF x 15 min). Una alícuota del sobrenadante (70  $\mu$ L) se llevó a 1 mL con solución agua:metanol 1:1 v/v (0.1 % FA + 5mM AF) y difenilamina (30  $\mu$ g/L); se sonicó (37 kHz, 30 °C x 30 min), agitó y centrifugó (12000 RPM / 14006 RCF x 10 min). Todas las muestras se filtraron (0.22  $\mu$ m) y analizaron por LC/MS como se describe en la *sección 3.1.3*.

## 5. Resultados y discusión

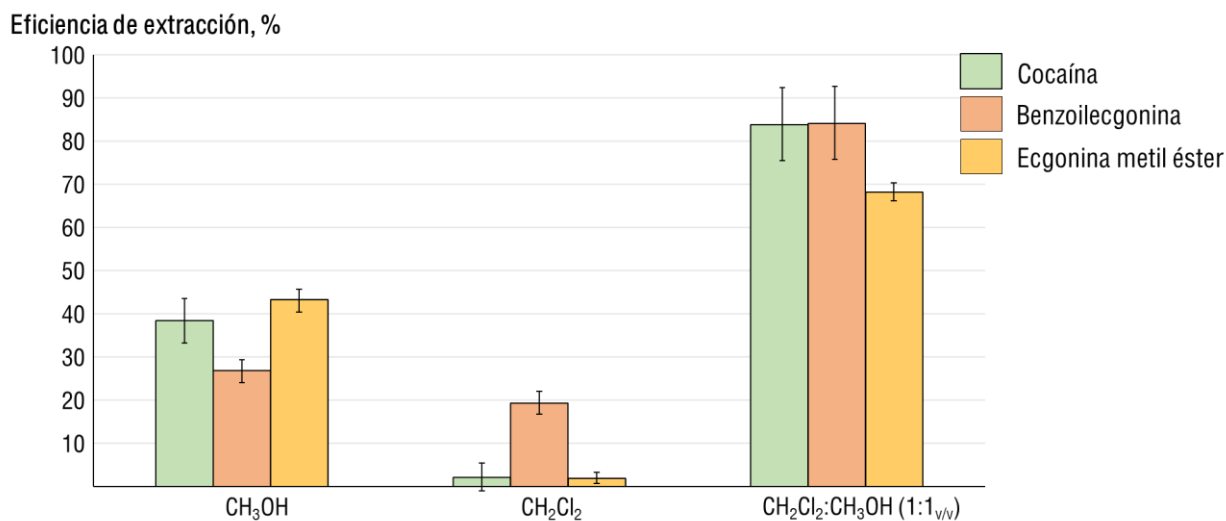
### 5.1 Implementación de un método de extracción MSPD para la cocaína y sus metabolitos en peces.

#### 5.1.1 Selección del solvente de extracción.

El extracto obtenido con la mezcla metanol:diclorometano (1:1 v/v) presentó las mayores eficiencias de extracción para COC ( $84 \pm 9.6$  %), BE ( $84 \pm 9.6$  %) y EME ( $68 \pm 0.9$  %). Los resultados de eficiencia de extracción se presentan en la **Figura 7**.

#### Figura 7.

Resultados de eficiencia de extracción (%) en función del solvente con la técnica de extracción MSPD.



El principio termodinámico fundamental en cualquier extracción química es la distribución del analito entre la matriz y la fase de extracción, relacionada generalmente por una constante de distribución entre fases. La constante de distribución puede depender de varios parámetros como: la temperatura, la presión, la adsorción de los analitos en la matriz y la composición de las fases. En el caso de matrices biológicas, la composición de las fases es un parámetro crítico por la

presencia de macromoléculas que compiten simultáneamente por los analitos durante su extracción. En MSPD, el solvente de elución es la tercera fase involucrada en la distribución de los analitos entre la matriz y el dispersante, por tanto, es un factor clave que afecta la eficiencia de extracción. Como en SPE y HPLC, la polaridad y la composición del solvente de elución juegan un rol importante sobre que sustancia se retiene en la columna y que eluye de ella. Esta idea también ha mostrado ser aplicable para la extracción MSPD (Barker, 2000).

En el caso de la COC y sus metabolitos, mayor eficiencia de extracción utilizando mezcla de solventes implica mayor transferencia de los analitos a la fase de elución. Esto es ocasionado por las interacciones que sufren los analitos con el solvente de elución, por ejemplo, COC, BE y EME ven reducidas sus eficiencias de extracción utilizando diclorometano (2 %, 19 % y 2 %, respectivamente), solvente polar aprótico, comparadas con sus eficiencias de extracción utilizando metanol (38 %, 27 % y 43 %, respectivamente), solvente polar prótico. Si la matriz dispersada contiene macromoléculas, como proteínas, capaces de formar enlaces de hidrógeno con los alcaloides, se espera entonces que, la presencia del metanol en el solvente aumente las interacciones con la fase de elución y explicaría porque aumenta su eficiencia de extracción. El aumento de la eficiencia de extracción utilizando la mezcla de solventes, comparada con los solventes individuales, se daría como consecuencia del aumento de las interacciones sinérgicas entre los analitos y la fase de elución. La mezcla metanol:diclorometano (1:1 v/v) presentó mayor interacción con los analitos presentes en la matriz MSPD, como consecuencia, la eficiencia de extracción fue la mayor, y por lo tanto, fue escogida como solvente de elución para el desarrollo del diseño experimental de evaluación de las condiciones de extracción MSPD.

### 5.1.2 Selección de condiciones de extracción MSPD para la cocaína y sus metabolitos

Los resultados del ANOVA del diseño experimental 2<sup>3</sup>, se presentan en la **Tabla 3**. Debido que se quisieron seleccionar las condiciones de extracción MSPD que maximicen la cantidad de COC y BE extraídos de la matriz, por igual, la respuesta combinada tuvo mayor importancia. Para la respuesta combinada, 2 efectos tienen un valor-P menor que 0.05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95 %. Los efectos que fueron significativos son: el tipo de soporte sólido (A) y el volumen de solvente (C), en ese orden de importancia. Los diagramas de Pareto del ANOVA, para cada respuesta experimental, se encuentran anexados (**Apéndice C**). La relación de soporte sólido y las interacciones entre las variables no tuvieron efecto significativo sobre la respuesta combinada. Las condiciones de extracción MSPD que maximizaron la respuesta combinada, en la región experimental, fueron: alúmina como soporte sólido; 1:8 relación muestra:soporte sólido en masa; y volumen de solvente de elución (7 mL).

**Tabla 3.**

*Resultados de análisis de varianza (ANOVA) del diseño experimental 2<sup>3</sup> para la COC, BE, EME y la respuesta combinada.*

Variable experimental	Factor de respuesta							
	Cocaína		Benzoilecgonina		Ecgonina metil éster		Respuesta combinada	
	Razón-F	Valor-P	Razón-F	Valor-P	Razón-F	Valor-P	Razón-F	Valor-P
A: soporte sólido	222,06	0,0427	307,47	0,0363	11,73	0,1808	312,11	0,036
B: relación soporte sólido:matriz	21,77	0,1344	0,25	0,7056	0,09	0,8159	18,78	0,1444
C: volumen de solvente	75,62	0,0729	1293,29	0,0177	6,5	0,238	266,78	0,0389
Interacción AB	5	0,2678	331,18	0,0349	0,76	0,5441	32,11	0,1112
Interacción AC	0,25	0,7062	88,61	0,0674	0,25	0,7045	9	0,2048
Interacción BC	9,84	0,1965	66,57	0,0776	0,06	0,8464	18,78	0,1444

La alúmina (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, óxido de aluminio) ha sido utilizada como soporte sólido para la extracción MSPD de diferentes analitos en matrices biológicas, tales como, pesticidas

en grasas animales (Furusawa, 2004) o sulfonamidas en pollo (Kishida & Furusawa, 2001). FRAMIL y col. (Míguez-Framil *et al.*, 2010, 2013), utilizaron alúmina como soporte sólido para la extracción MSPD de COC y opioides en cabello. Sin embargo, no se ha reportado su uso para la extracción MSPD de COC en tejidos animales.

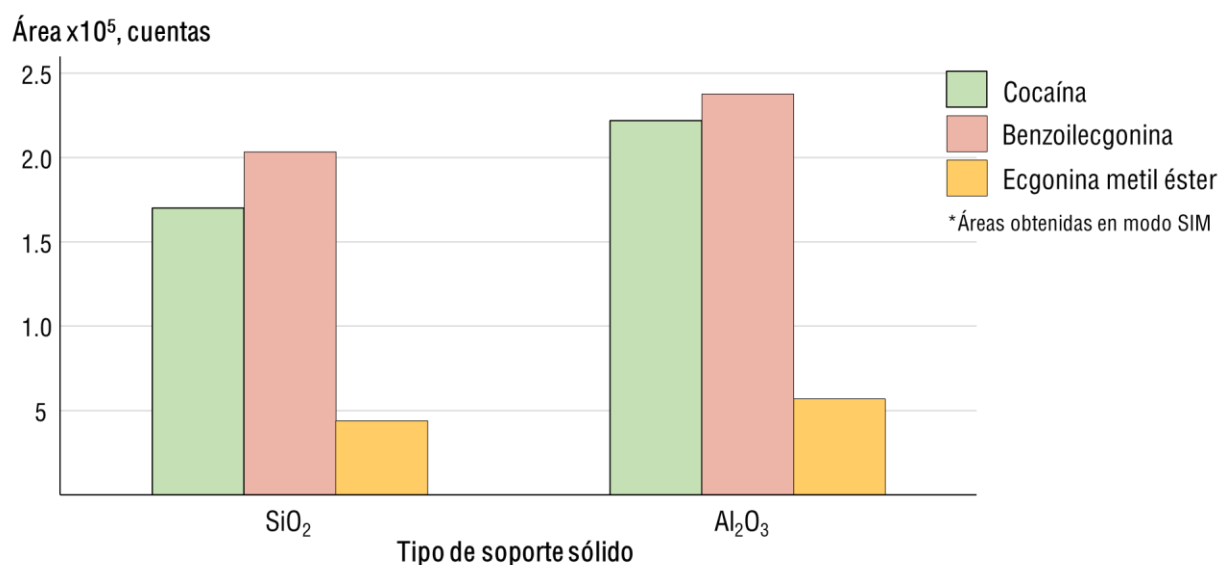
Se sabe que la naturaleza del soporte sólido y las interacciones superficiales con la matriz-analitos, son factores determinantes de la eficiencia de extracción MSPD (Barker, 2007). La alúmina es un compuesto cuasi-iónico que permite abrasar y disrumpir la muestra durante su maceración y dispersión. Como adsorbente, puede tener centros aceptores y donadores de electrones por iones  $Al^{+3}$  con coordinación incompleta y por átomos de oxígeno con exceso de carga, respectivamente (Steigman, 1982). Esta propiedad de la alúmina para interactuar con los iones, podría implicar la retención parcial de las proteínas de la matriz en la columna MSPD, por su interacción con sus grupos funcionales, *e. g.*, grupos amino y ácido terminales. Esto disminuiría las interacciones de los analitos con la matriz dispersada y facilitaría su elución. Otro factor que afecta la retención de las macromoléculas, y la elución de los analitos en un solo paso, es la exclusión por tamaño. Aunque este último factor ha mostrado ser minoritario en la separación MSPD (Barker, 2007). Teniendo en cuenta las similitudes con la elución en MSPD y la elución en HPLC, es interesante mencionar que la alúmina se utilizó como fase estacionaria de intercambio iónico para la separación de alcaloides y proteínas (Laurent, Billiet, & De Galan, 1984; Laurent, Billiet, De Galan, *et al.*, 1984).

El gel de sílice ( $SiO_2$ , volumen de poro 0.4-1.0 mL/g) puede tener grupos Si-OH (grupo silanol), capaces de interactuar electrostáticamente con los analitos y formar enlaces de hidrógeno con el N-básico, lo que provocaría mayor retención de los analitos en la columna MSPD durante su elución. Un estudio sobre la separación de compuestos básicos por HPLC (fase normal, régimen

isocrático), mostró mayor retención de estos compuestos utilizando gel de sílice que con alúmina (Grün *et al.*, 1996). Esta diferencia de naturaleza e interacciones explica porque se obtuvo mayor respuesta con la alúmina para todos los alcaloides, comparada con el gel de sílice. Esta comparación se presenta en la **Figura 8**.

### Figura 8.

*Comparación de la respuesta instrumental entre el gel de sílice y la alúmina para la extracción MSPD de cocaína y sus metabolitos. Analizado por LC/MS (modo SIM).*



El volumen del solvente es otro factor determinante para la eficiencia de extracción MSPD, dado que los analitos están dispersos por toda la columna y su elución podría ser fraccionada. BARKER propone en sus revisiones previas (Barker, 2000, 2007), que los analitos eluyen mayoritariamente en los primeros mL de elución, aproximadamente en un volumen de columna, pero esto depende de la naturaleza de la matriz. En general, se ha mostrado que volúmenes entre 5-10 mL permiten recuperar cantidades cuantitativas de la columna MSPD (Pawliszyn, 2012). De acuerdo con los resultados en la región experimental, 7 mL permitieron obtener mayor

recuperación para la COC y sus metabolitos, lo que indicaría que este volumen favoreció la interacción de la fase de elución con los analitos.

Los %Eficiencia de extracción de COC, BE y EME en el mejor punto experimental (1,1,1) fueron  $101 \pm 7.8 \%$ ,  $96 \pm 1.2 \%$  y  $113 \pm 3.6 \%$  ( $n = 4$ ), respectivamente. Los %Eficiencia de extracción del punto (1,1,1) fueron mayores que los obtenidos utilizando sílice-C<sub>18</sub> como soporte sólido en proporción 1:6 en masa y 5 mL de solvente de elución. Los resultados de las curvas de calibración en extracto libre de alcaloides se presentan en la **Tabla 4**. Los límites analíticos para la detección y cuantificación de COC y sus metabolitos son más bajos (LOD < 300-900 ng/L; LOQ < 700-3000 ng/L) que los reportados previamente por otros autores utilizando sistemas *tándem* (LC-QqQ, operado en monitoreo de múltiples reacciones (MRM)), en matrices biológicas (Chen *et al.*, 2017; Takitane *et al.*, 2018).

#### Tabla 4.

*Resultados de las curvas de calibración en extracto de pez barbo de EME, BE y COC (LC/MS en modo SIM), obtenidos con base en las masas exactas seleccionadas, i.e., m/z 200.12815, m/z 290.13868 y m/z 304.15433.*

Compuesto	Rango, ng L <sup>-1</sup>	Ecuación <sup>a</sup>	R <sup>2</sup>	S <sub>m</sub>	m±tS <sub>m</sub> <sup>b</sup>	[ng L <sup>-1</sup> ]	
						LOD <sup>c</sup>	LOQ <sup>c</sup>
Ecgonina metil éster	92-1400	y' = 0,28x + 13	0,9950	0,0076	0,28±0,014	92	306
Benzoilecgonina	123-700	y' = x + 172	0,9672	0,079	1,0±0,16	123	410
Cocaína	54-700	y' = 1,59x + 120	0,9932	0,050	1,59±0,094	54	179

*Nota.* <sup>a</sup> Curvas de calibración realizadas en extracto de pez. <sup>b</sup> y': Relación entre área de analito/área de patrón interno por 10<sup>3</sup>; m: Pendiente; t: Coeficiente de Student para un nivel de confianza del 95 %. S<sub>m</sub>: desviación estándar de la pendiente. <sup>c</sup> LOD: Límite de detección; LOQ: Límite de cuantificación.

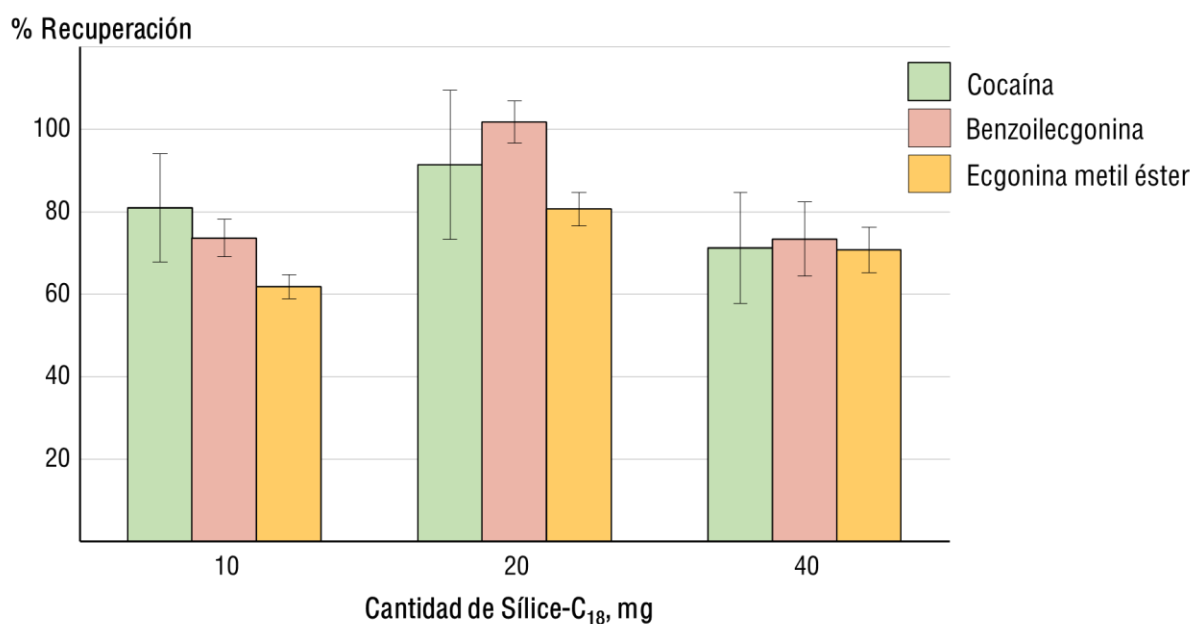
El sílice-C<sub>18</sub> es un compuesto sintético apolar, producto de sustitución química de los grupos silanol por grupos octadecilo (C<sub>18</sub>), utilizado ampliamente en HPLC moderno (fase reversa). Sustituir el grupo silanol de la sílice tiene varias consecuencias, a saber: disminuye

el volumen de poro (volumen de poro 0.1-0.6 mL/g), lo que suprime la retención por tamaño de las macromoléculas; confiere propiedades hidrofóbicas; y elimina las interacciones OH-N, que en HPLC se han visto como efecto de coleo (*tailing effect*) (Engelhardt *et al.*, 1982). Comparado con otros soportes sólidos, el sílice-C<sub>18</sub> es catalogado como un soporte de alta retención de compuestos orgánicos en matrices biológicas (Capriotti *et al.*, 2010). Las interacciones del sílice-C<sub>18</sub> con las macromoléculas y los analitos son principalmente de tipo *London*, por tanto, la retención de estos depende principalmente de su hidrofobicidad y la polaridad de la fase de extracción. Las macromoléculas con mayor retención utilizando sílice-C<sub>18</sub> serían entonces grasas y proteínas liposolubles presentes en el pez. Teniendo en cuenta la lipofilia de la COC y sus metabolitos, la COC presentaría mayor retención en la columna MSPD por ser más liposoluble que sus metabolitos, por tanto, podría explicar su menor eficiencia de extracción. Este comportamiento lipofílico de la COC se ve reflejado en sus propiedades cromatográficas, presentadas más adelante. El sílice-C<sub>18</sub> es el soporte sólido más utilizado en la extracción MSPD, principalmente para matrices con alto contenido de grasas, debido que se pueden obtener extractos relativamente libres de grasas al usar este soporte sólido y solventes orgánicos para extraer moléculas medianamente polares. Aunque este soporte sólido no se escogió para la extracción de los analitos, si se utilizó como adsorbente de impurezas, principalmente grasas co-extraídas por el diclorometano (solvente hidrofóbico, logP = 1.25). Revisiones previas coinciden que las metodologías MSPD que usan soportes sólidos polares, como la alúmina, deben incluir un paso de limpieza del extracto (*clean-up step*) previo análisis instrumental (Barker, 2000, 2007; Capriotti *et al.*, 2010; Pawliszyn, 2012). Al comparar diferentes cantidades de sílice-C<sub>18</sub> añadidas al extracto, se encontró que 20 mg de adsorbente permiten recuperar en promedio el 91 %, 102 %

y 81 % de COC, BE y EME, respectivamente. La comparación de los %Recuperación se presentan en la **Figura 9**.

**Figura 9.**

*Comparación entre la eficiencia de recuperación y la cantidad de sílice-C<sub>18</sub> añadida durante la limpieza del extracto MSPD. Extractos MSPD utilizando alúmina, 1:8 relación muestra:soporte y 7 mL de mezcla metanol:diclorometano (1:1 v/v) como solvente. Analizado por LC/MS (modo SIM).*



Este es el primer reporte de extracción MSPD de COC y sus metabolitos en peces, que, a su vez evalúa cuatro variables experimentales (la cantidad de soporte sólido, el tipo de soporte sólido, el tipo y volumen de solvente de elución). Las condiciones de extracción MSPD que se escogieron para determinar la bioacumulación de los alcaloides en peces son las siguientes: alúmina como soporte sólido; 1:8 relación muestra:soporte sólido; y 7 mL de mezcla metanol:diclorometano (1:1 v/v).

## 5.2 Etapa 2 – Implementación de LC/MS para el análisis de la cocaína y sus metabolitos.

### 5.2.1 Análisis por LC/MS de material de referencia certificado (MRC).

Los tiempos de retención promedio para EME, BE y COC son 0.52, 4.41 y 4.73 minutos, respectivamente. Las propiedades cromatográficas de los analitos obtenidos por LC/MS en modo SIM, se presentan en la **Tabla 5**. Dado que la separación se da en fase reversa (fase estacionaria apolar y fase móvil polar), y la salida de la columna depende de la distribución entre las dos fases, se evidencia que los metabolitos, moléculas más polares y afines con la fase móvil, eluyan primero que la COC. La superposición de las EIC se presenta en la **Figura 10**.

**Tabla 5.**

*Propiedades cromatográficas de EME, BE y COC (LC/MS en modo SIM), obtenidos con base en las masas exactas seleccionadas, i.e., m/z 200.12815, m/z 290.13868 y m/z 304.15433.*

N° Fig. 10	Compuesto*	tr, min (n = 3)		logP <sup>a</sup>	Momento dipolar [M+H] <sup>+</sup> , Debye <sup>b</sup>
		X ± s	CV, %		
1	Ecgonina metil éster	0.52 ± 0.01	1.12	-0.157	17.1678
2	Benzoilecgonina	4.41 ± 0.01	0.26	1.3	6.5324
3	Cocaína	4.73 ± 0.01	0.21	2.3	3.9667

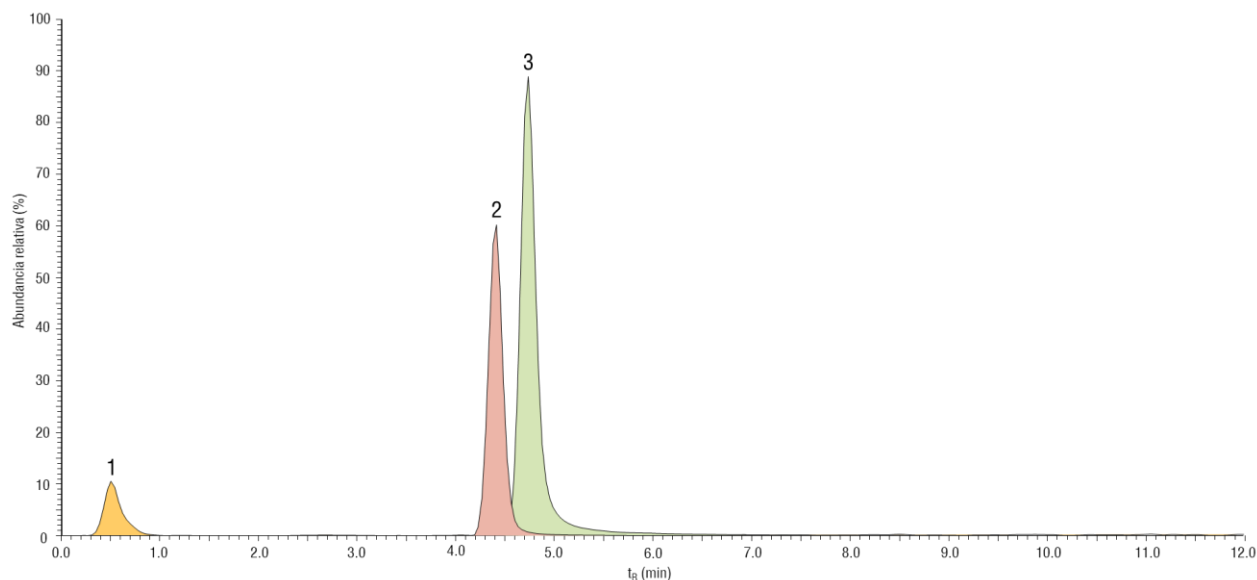
*Nota.* <sup>a</sup> Coeficiente de partición reportado para BE y COC (Kasprzyk-Hordern *et al.*, 2007); Coeficiente de partición de EME calculado con el *software* ACD/Labs V<sub>11.02</sub>. <sup>b</sup> Momento dipolar calculado como se describe en la *sección* 4.2.2.

El logaritmo del coeficiente de partición (logP), describe la característica que tiene una molécula para distribuirse entre dos fases inmiscibles, generalmente, entre una fase liposoluble (apolar) y una fase acuosa (polar). Mayor valor de logP implica mayor distribución en la fase apolar, y viceversa, menor valor de logP implica mayor distribución en la fase polar. Autores previos han mostrado como la elución en fase reversa está relacionada proporcionalmente con el logP (Nasal *et al.*, 2003; Unger & Chiang, 1981; Valkó, 2004). En el caso de la COC y sus

metabolitos, su elución es proporcional al aumento del logP y a la disminución del momento dipolar.

**Figura 10.**

*Corriente iónica extraída obtenida mediante LC/MS (modo SIM) de material de referencia certificado de cocaína y sus metabolitos, columna Zorbax Eclipse XDB C18.*



*Nota.* Identificación de picos en la **Tabla 5**.

Realizando las curvas de calibración externa, filtrando los iones  $[M+H]^+$ ;  $m/z$  200,  $m/z$  290 y  $m/z$  304, para EME, BE y COC, respectivamente, se obtuvieron los resultados reportados en la **Tabla 6**. Las propiedades espectrométricas de la inyección por triplicado del material de referencia de COC y sus metabolitos se presentan en la **Tabla 7**. Los espectros de masas de EME, BE y la COC obtenidos por LC/MS operado en modo SIM se encuentran anexados (**Apéndice D**). Las estructuras de la COC y sus metabolitos se presentan en la **Figura 11**.

**Tabla 6.**

Resultados de las curvas de calibración externa de EME, BE y COC (LC/MS en modo SIM), obtenidos con base en las masas exactas seleccionadas, i.e.,  $m/z$  200.12815,  $m/z$  290.13868 y  $m/z$  304.15433.

Compuesto <sup>a</sup>	Rango, ng L <sup>-1</sup>	Ecuación <sup>b</sup>	R <sup>2</sup>	S <sub>m</sub>	m ± tS <sub>m</sub> <sup>c</sup>	[ng L <sup>-1</sup> ]	
						LOD <sup>d</sup>	LOQ <sup>d</sup>
Ecgonina metil éster	25-500	y = 1071x + 8774	0,9981	21	1071 ± 50	25	83
Benzoilecgonina	12-250	y = 13605x + 49305	0,9984	241	13605 ± 515	11	37
Cocaína	15-250	y = 2403x + 194356	0,9974	55	2403 ± 111	15	48

Nota. <sup>a</sup> Las sustancias de referencia se pesaron aproximadamente (1 mg) y se disolvieron en metanol (1 mL). <sup>b</sup> Curvas de calibración realizadas por el método de estándar externo. <sup>c</sup> m: Pendiente; t: Coeficiente de Student para un nivel de confianza del 95 %. S<sub>m</sub>: desviación estándar de la pendiente. <sup>d</sup> LOD: Límite de detección; LOQ: Límite de cuantificación.

**Tabla 7.**

Propiedades espectrométricas de masas obtenidas por LC/MS de las moléculas protonadas

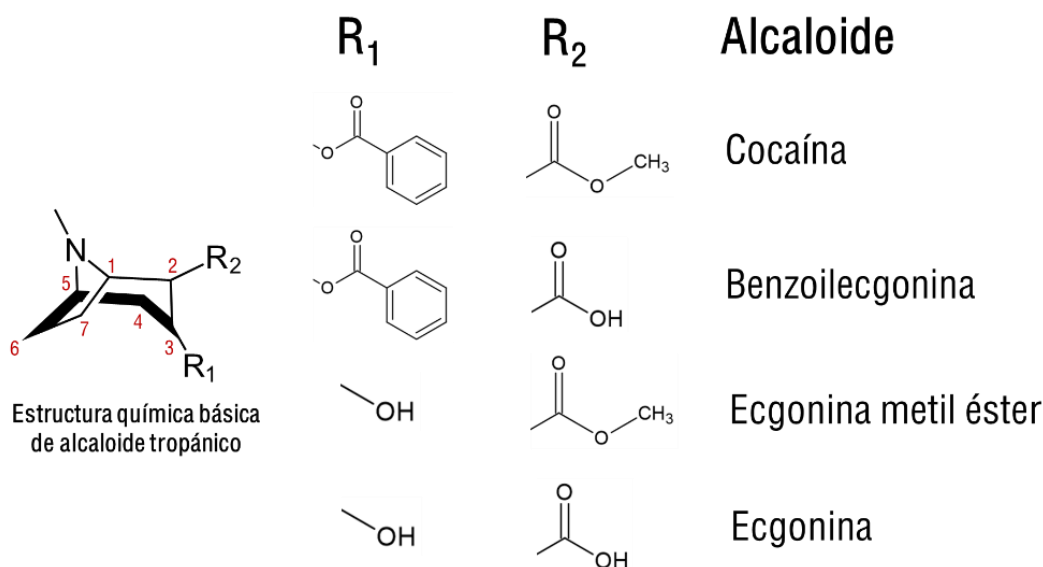
[M+H]<sup>+</sup> en modo SIM.

Compuesto	HCD (eV)	Experimental [M+H] <sup>+</sup> (I, %)	Error (Δppm)	Fragmentos característicos*, $m/z$ (I, %) perdidas	Ref.
Ecgonina metil éster	50	200.12816 (44.7)	0.19	<b>182.11766</b> (100) [M+H - H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> , 168.10191 (6.3) [M+H - CH <sub>3</sub> OH] <sup>+</sup> , 150.09169 (7.4) [M+H - CH <sub>3</sub> OH - H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> , <b>82.06558</b> (31.4) [M+H - C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> O <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	(Klingmann <i>et al.</i> , 2001; P. Wang & Bartlett, 1998)
Benzoilecgonina	30	290.13828 (60.4)	1.41	<b>272.12778</b> (5.1) [M+H - H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> , <b>168.10179</b> (100) [M+H - C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CO <sub>2</sub> H] <sup>+</sup> , <b>150.09128</b> (3.8) [M+H - C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CO <sub>2</sub> H - H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> , 124.11213 (2.5) [M+H - C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CO <sub>2</sub> H - CO <sub>2</sub> ] <sup>+</sup> , <b>105.03368</b> (9.7) [M+H - C <sub>9</sub> H <sub>15</sub> O <sub>3</sub> N] <sup>+</sup> , <b>82.06552</b> (3.8) [M+H - C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	(P. Wang & Bartlett, 1998)
Cocaína	30	304.15414 (47.8)	0.63	<b>272.12790</b> (1.1) [M+H - CH <sub>3</sub> OH] <sup>+</sup> , <b>182.11760</b> (100) [M+H - C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CO <sub>2</sub> H] <sup>+</sup> , <b>150.09135</b> (3.1) [M+H - C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CO <sub>2</sub> H - CH <sub>3</sub> OH] <sup>+</sup> , <b>105.03372</b> (3.2) [M+H - C <sub>10</sub> H <sub>17</sub> O <sub>3</sub> N] <sup>+</sup> , <b>82.06557</b> (5.4) [M+H - C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>	(P. Wang & Bartlett, 1998)

Nota. \* Los valores de  $m/z$  en negrilla corresponden a fragmentos reportados previamente.

**Figura 11.**

Estructura química básica de la cocaína y sus metabolitos.



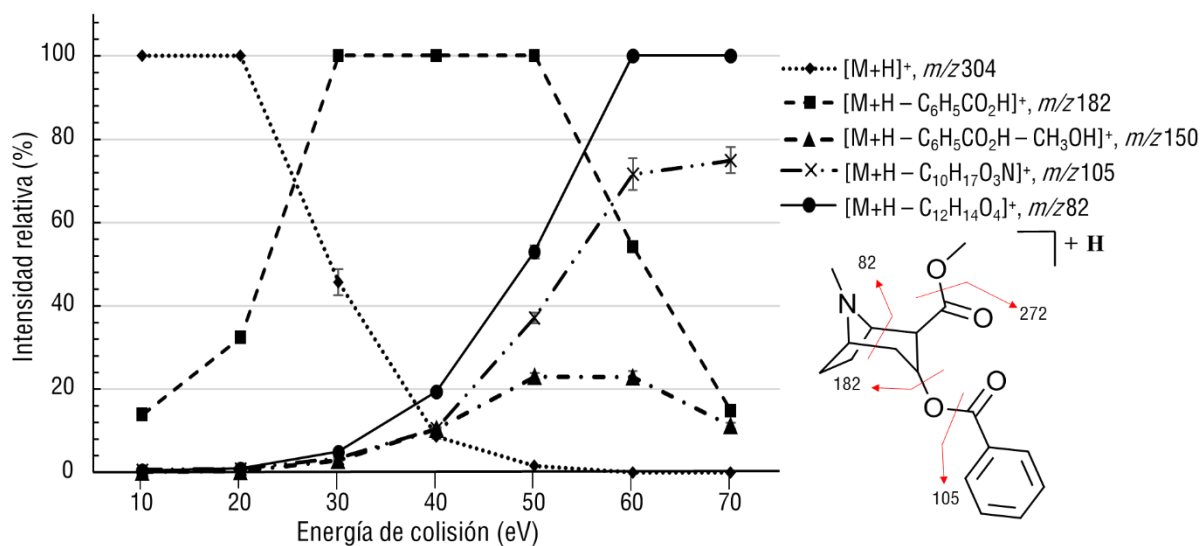
Las pérdidas experimentales registradas coinciden con las reportadas en la literatura (Klingmann *et al.*, 2001; P. Wang & Bartlett, 1998) como:  $m/z$  82, asociado al anillo tropánico de cinco miembros, típico para alcaloides tropánicos;  $m/z$  105 asociado al ion benzoilo presente en BE y COC;  $m/z$  150 formado tras la pérdida de los sustituyentes unidos a la estructura tropano;  $m/z$  168 y  $m/z$  182, asociados a la pérdida de ácido benzoico ( $-C_6H_5CO_2H$ ) de BE y COC, respectivamente. El ion  $m/z$  124 en BE se formaría por la pérdida sucesiva de ácido benzoico y dióxido de carbono. La pérdida de metanol ( $-CH_3OH$ ) en EME y COC, y su ausencia en BE, revela la presencia del grupo metil éster, a saber:  $m/z$  168 (EME) y  $m/z$  272 (COC), mientras que la pérdida de agua ( $-H_2O$ ) para los dos metabolitos, y su ausencia en COC, revela la presencia del grupo hidroxilo en su estructura, a saber:  $m/z$  182 (EME) y  $m/z$  272 (BE).

Aplicando siete valores normalizados de energía de colisión (10 hasta 70 eV) en la cámara HCD, se determinaron los fragmentos de masas característicos para la COC y sus metabolitos.

En la **Figura 12**, se presentan las intensidades relativas para el ion molecular y cuatro iones-producto característicos de la COC en función de la energía de colisión. Las relaciones entre las intensidades relativas y la energía de colisión para el ion molecular y los iones-producto característicos de BE y EME, se encuentran anexados (**Apéndices E y F**). El efecto de la energía aplicada sobre la relación de intensidades de las intensidades del ion  $[M+H]^+$  y el ion-producto principal de la COC y sus metabolitos se encuentra anexado (**Apéndice G**). Los patrones isotópicos de COC y sus metabolitos se encuentran anexados (**Apéndice H**).

### Figura 12.

*Relación entre la intensidad relativa y la energía de colisión para  $[M+H]^+$  y los cuatro iones-producto:  $[M+H - C_6H_5CO_2H]^+$ ,  $[M+H - C_6H_5CO_2H - CH_3OH]^+$ ,  $[M+H - C_{10}H_{17}O_3N]^+$ , y  $[M+H - C_{12}H_{14}O_4]^+$  en el caso de la cocaína. Obtenido mediante LC/MS (modo SIM).*



Es claro que las intensidades de los iones dependen de la energía de colisión aplicada. El ion  $m/z$  182  $[M+H - C_6H_5CO_2H]^+$  aumenta rápidamente mientras  $[M+H]^+$  disminuye, manteniéndose como ion base entre 30 eV y 50 eV, lo que indica que la pérdida del ácido benzoico está favorecida sobre otras rutas de fragmentación. La pérdida del ácido benzoico, para BE,

también mostró estar favorecida en el mismo rango de energías de colisión. La formación del ion tropánico ( $m/z$  82)  $[M+H - C_{12}H_{14}O_4]^+$  aumenta mientras aumenta la energía de colisión, por tanto, su formación esta favorecida a energías altas ( $\geq 30$  eV). Esto se repite para el ion de la estructura tropano ( $m/z$  150)  $[M+H - C_6H_5CO_2H - CH_3OH]^+$ .

La regla de Stevenson-Audier establece que durante la formación competitiva de dos iones-producto ( $M^+ \rightarrow A^+ + B^+$ ), se favorecerá la formación del ion cuya energía de ionización sea menor (más estable), y esto se verá reflejado en sus abundancias (Audier, 1969; McLafferty & Tureček, 1993; Stevenson, 1951). Para los tres alcaloides se observó que la formación de  $m/z$  82 aumenta más rápidamente que  $m/z$  150, lo que indica mayor estabilidad de  $m/z$  82. Para COC y BE, la formación del ion benzoilo ( $m/z$  105) implica la formación de especies neutras similares a EME y ecgonina, respectivamente. Si se compara la formación de  $m/z$  105 con la formación de  $m/z$  82 a altas energías, se observa que para BE está favorecida pero no para COC [ $m/z$  105 (100 %) y  $m/z$  82 (41 %) para BE;  $m/z$  105 (71 %) y  $m/z$  82 (100 %) para COC a 60 eV]. Esto puede ser consecuencia del grupo hidroxilo (-OH) en el carbonilo unido al C(2) de la estructura tropano en BE, en lugar del grupo metoxido (-OCH<sub>3</sub>) en COC, el cual estabilizaría a la especie neutra similar a ecgonina.

El estudio de la fragmentación variando la energía de colisión aplicada mostró que 30 eV permite identificar iones característicos con intensidades altas (>10 %) para la COC y BE, mientras que, aplicando 50 eV permitió identificar los iones característicos de EME.

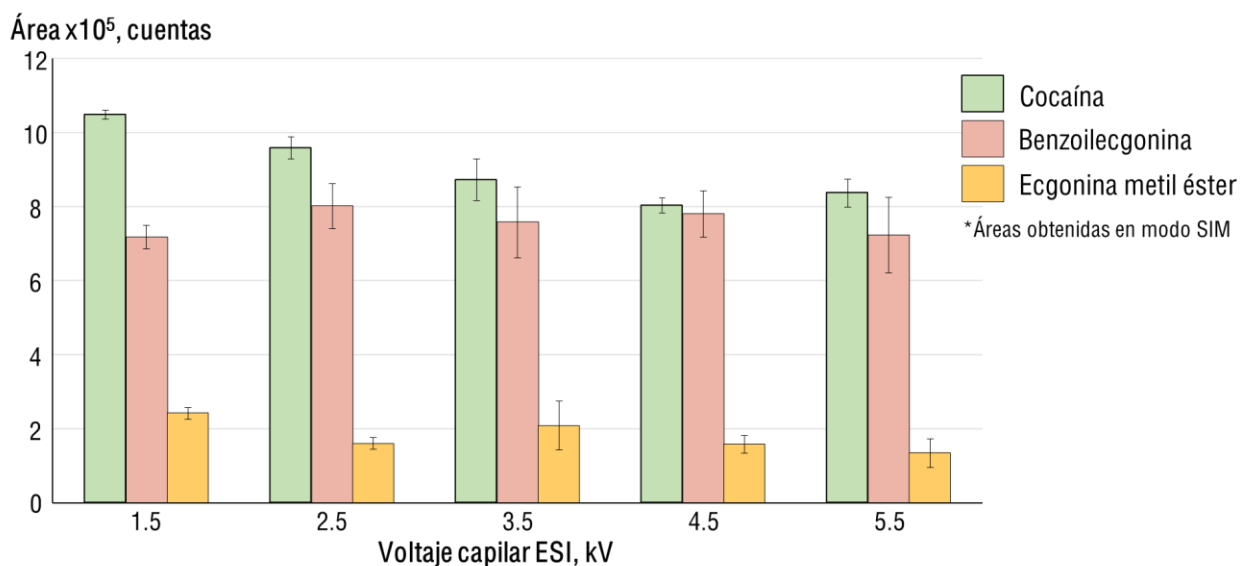
### 5.2.2 Evaluación del voltaje de la interfaz de electronebulización.

Los resultados de la evaluación del Vspray de electronebulización se presentan en la **Figura 13**. La diferencia del número de iones registrados de BE y EME no resultó ser significativa para los valores de Vspray evaluados (1.5 – 5.5 kV).

El voltaje en el capilar ( $V_{\text{spray}}$ ) de electronebulización permite la separación de las cargas con la fase líquida que sale del sistema cromatográfico. Cotidianamente se utilizan valores  $V_{\text{spray}}$  altos (1-5 kV) (Cech & Enke, 2001). Una explicación más detallada del proceso de desorción de los iones se presenta en la *sección 2.3.3* y en los trabajos citados (Aleksandrov *et al.*, 1984, 1985; Cech & Enke, 2001; Cole, 1997; Gross, 2017; Taylor, 1964; Yamashita & Fenn, 1984).

### Figura 13.

*Relación entre área cromatográfica y el potencial del capilar de electronebulización ( $V_{\text{spray}}$ ) para la cocaína y sus metabolitos. Obtenido mediante LC/MS (modo SIM).*



ESI se da a presión atmosférica y libera muchas especies neutras durante el proceso, por tanto, el primer reto es la introducción de los iones al detector de masas. Diferentes configuraciones instrumentales entre el capilar y la entrada al detector de masas se han utilizado, a saber: paralela, ortogonal y semi-ortogonal; siendo la configuración semi-ortogonal (60°) la utilizada en el equipo. Esta configuración permite que gran parte de la fase móvil, no ionizada, se descarte y no ingrese al detector de masas, mientras, los iones son atraídos electrostáticamente

desde el capilar hacía la entrada al detector de masas por el gradiente del campo eléctrico. El valor del campo eléctrico ( $E_C$ ) generado en la interfaz ESI, puede ser calculado aproximadamente con la *ecuación VI* (Cole, 1997):

$$E_C = \frac{2V_{\text{spray}}}{r_c \ln\left(\frac{4d}{r_c}\right)} \quad (\text{VI})$$

Donde  $r_c$  es el radio interno del capilar, y  $d$  es la distancia entre la punta del capilar y la entrada al detector de masas. La deflexión de los iones, por acción del campo eléctrico, que salen del capilar e ingresan al detector tiene que satisfacer que la fuerza centrípeta ( $F_C$ ) se iguale a la fuerza eléctrica ( $F_E$ ). Esto se expresa en la *ecuación VII*:

$$F_C = \frac{m_i v^2}{r_E} = qE_C = F_E \quad (\text{VII})$$

Donde  $m_i$  es la masa del ion;  $v$  es la velocidad del ion;  $r_E$  es el radio de deflexión; y  $q$  es la carga del ion. Si reemplazamos (VI) en (VII), reordenamos y agrupamos las constantes instrumentales ( $r_c$  y  $d$ ) en una constante ( $A$ ) tenemos la *ecuación VIII*.

$$m/z = \frac{r_E V_{\text{spray}}}{A v^2} \quad (\text{VIII})$$

De (VIII) se observa que el  $V_{\text{spray}}$  es directamente proporcional a la relación masa carga del ion ( $m/z$ ) e inverso al radio de deflexión. Entonces teóricamente, para desviar iones de peso molecular relativamente bajo ( $< 500 m/z$ ), en un radio de deflexión constante ( $r_E \cong 17 \text{ mm}$ ), se requieren menores valores de  $V_{\text{spray}}$ .

Para el caso de la COC ( $m/z$  304), se observa como aumenta el número de iones registrados a medida que disminuye  $V_{\text{spray}}$ , lo que coincide con lo explicado previamente. Esta tendencia no se observa en sus metabolitos probablemente por las interacciones que experimentan con la fase móvil durante el proceso de desorción, *e.g.*, solvatación parcial de los iones. Autores previos

han mencionado que las propiedades del solvente elución, como la tensión superficial, afectan a la mayoría de los procesos involucrados en la electronebulización, y por tanto, la respuesta instrumental (Aleksandrov *et al.*, 1984, 1985; Cech & Enke, 2001; Cole, 1997; Gross, 2017; Taylor, 1964; Yamashita & Fenn, 1984). En conclusión, el voltaje del capilar de electronebulización que permite registrar mayor número de iones para la COC es 1.5 kV, al no existir diferencias significativas entre los voltajes para BE y EME, se seleccionó dicho voltaje para el análisis instrumental.

### 5.3 Bioacumulación de la cocaína y sus metabolitos en peces cebras.

Los resultados de cuantificación de los alcaloides en peces cebra ( $600 \pm 83$  mg en fresco,  $3.5 \pm 0.36$  cm longitud,  $73 \pm 1.8$  % humedad) se presentan en la **Tabla 8**. COC ( $2.1 \pm 0.36$  ng/g en fresco) y BE ( $3.0 \pm 0.54$  ng/g en fresco) fueron detectados en peces cebras expuestos al alcaloide (20 ng/L COC) durante 2 semanas. EME no se detectó en ningún pez.

**Tabla 8.**

*Resultados de cuantificación de cocaína y sus metabolitos en peces cebra expuestos al alcaloide.*

N° pez cebra	Cantidad de alcaloide, ng /g pez fresco		
	Cocaína	Benzoilecgonina	Ecgonina metil éster
1	2,0	< LOQ	< LOD
2	1,7	< LOQ	< LOD
3	2,0	2,4	< LOD
4	2,6	3,4	< LOD
5	< LOQ	< LOQ	< LOD
6	2,3	3,1	< LOD
7	< LOQ	< LOQ	< LOD
8	< LOQ	< LOQ	< LOD

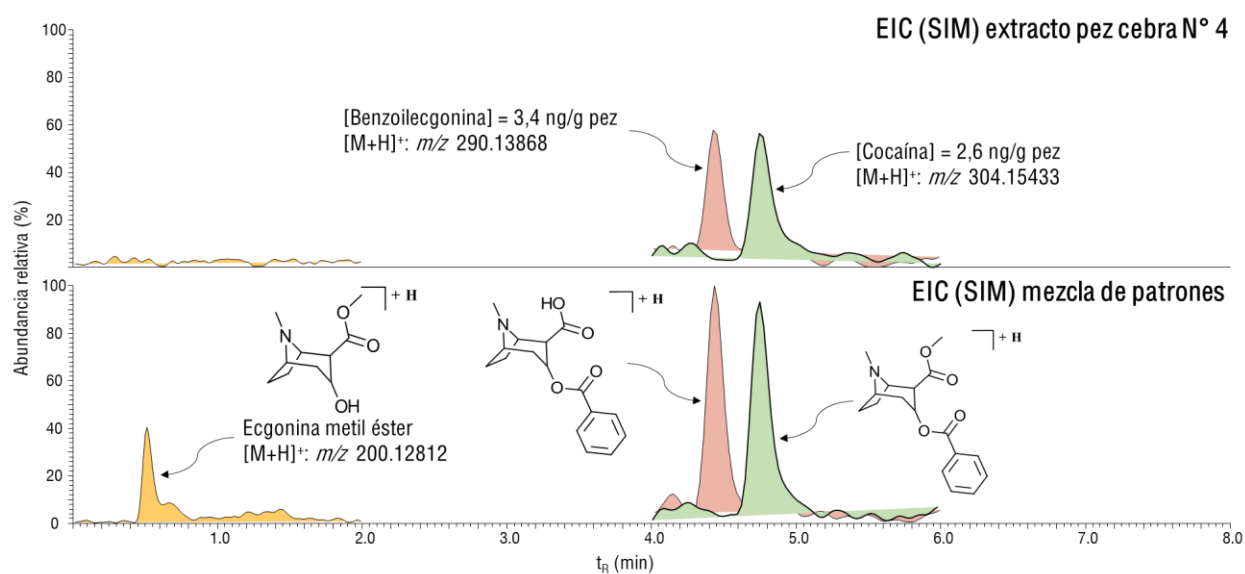
*Nota.* LOD: Límite de detección; LOQ: Límite de cuantificación

La identificación confirmatoria de la COC y su metabolito se hizo con base en la comparación de sus espectros de masas, relaciones isotópicas, masas exactas y tiempos de

retención con sustancias de referencia. La comparación de la EIC en modo SIM del extracto de pez cebra con las sustancias de referencia se presenta en la **Figura 14**.

### Figura 14.

*Comparación de la corriente iónica extraída (EIC) en modo SIM para la cocaína y sus metabolitos en pez cebra con las sustancias de referencia. Obtenido mediante LC/MS (modo SIM), columna Zorbax Eclipse XDB C18.*



Las propiedades moleculares de los compuestos orgánicos e inorgánicos se han utilizado en ecotoxicología para predecir las consecuencias que estos pueden tener en los organismos vivos, *e.g.*, la bioacumulación. Las propiedades moleculares más importante para la bioacumulación en peces son la liposolubilidad y la capacidad de ser adsorbido por las branquias. Teniendo en cuenta la definición dada en la *sección 5.2.1*, el logP se ha relacionado con la bioacumulación de contaminantes orgánicos en organismos acuáticos (Streit, 1998), ya que, sirve para predecir la partición entre el medio acuático y los tejidos (fase lipídica). La relación entre la bioacumulación y el logP puede modelarse con la *ecuación IX*.

$$\log(BCF) = a \times \log P + b \quad (\text{IX})$$

Donde *BCF* es el factor de bioacumulación del contaminante; *a* y *b* son constantes del modelo. Estudios previos han demostrado la presencia de fármacos en peces (Bean *et al.*, 2018; David *et al.*, 2018; Du *et al.*, 2016; Huerta *et al.*, 2013; H.-Y. Kim *et al.*, 2017; Ojemaye & Petrik, 2019; Rojo *et al.*, 2019; Subedi *et al.*, 2011; Togunde *et al.*, 2012; Valdés *et al.*, 2014, 2016; J. Wang & Gardinali, 2012), y mencionan como la lipofiliidad predispone su bioacumulación (Larsson *et al.*, 1991). La bioacumulación de COC y BE sería predecible por sus caracteres lipofílicos (valores logP 1.3 y 2.3 para BE y COC, respectivamente), y no para EME (logP = -0.157), el cual, si es formado por el metabolismo del pez o descomposición en el medio, sería detectado en el agua y no en el pez por ser más a fin a la fase acuosa. Este trabajo de investigación confirma experimentalmente como si se bioacumulan la COC y su metabolito principal en el pez cebra.

Los resultados de bioacumulación de COC coinciden con otros reportes sobre su presencia en tejidos biológicos (Capaldo *et al.*, 2012; Levisky *et al.*, 2000; Magalhães *et al.*, 2013; Misra *et al.*, 1976; Nayak *et al.*, 1976; Poklis *et al.*, 1987). Por ejemplo, CAPALDO y col. (Capaldo *et al.*, 2012), estudiaron la bioacumulación de COC (20 ng/L) en anguilas expuestas al alcaloide (30 días), encontrando que la COC se bioacumula hasta 102 pg/g en total en 9 tejidos diferentes. Los tejidos con mayor contenido lipídico, el cerebro y el músculo, presentaron la mayor bioacumulación del alcaloide. A saber, la anguila es un pez de consumo local en algunos países europeos, principalmente, por su gran tamaño y alto contenido de grasa animal. BE también ha mostrado ser bioacumulable en peces. ONDARZA y col. (Ondarza *et al.*, 2019), reportaron la presencia de BE (0.42–1.6 ng/g pez fresco) en cuatro especies de peces de consumo local de los ríos Paraná y Acaraguá, Argentina.

Como se mencionó en la *sección 2.4*, la COC es metabolizada en el ser humano por varias rutas enzimáticas, principalmente a BE y EME; y minoritariamente a norcocaína y ecgonina (Misra *et al.*, 1975; Fish & Wilson, 1969; Mulé & Misra, 1977; Montesinos, 1965; Zhan *et al.*, 2003; Cone *et al.*, 1998; Chasin & Mídio, 1997). Comparado con el genoma humano, aproximadamente el 70 % de los genes humanos tiene al menos un gen ortólogo en el pez cebra (Howe *et al.*, 2013). Un gen ortólogo es una copia o una secuencia similar de un mismo gen presente en diferentes especies, que se originó en un ancestro común. Trabajos previos mencionan la expresión de enzimas similares a butirilcolinesterasa (BChE), carboxilcolinesterasas (hCE-1 y hCE-2) y citocromo P450 en el pez cebra (Howe *et al.*, 2013; Küster, 2005; Nawaji *et al.*, 2020; Stegeman *et al.*, 2015; Tan *et al.*, 2021), principales responsables del metabolismo humano de la COC. Por lo cual, si el pez cebra metaboliza la COC y bioacumula sus metabolitos, se esperaría detectarlos en el extracto. Sin embargo, al buscar en la TIC, no se detectaron los iones  $[M+H]^+$  de norcocaína y ecgonina, ni de sus derivados glicosilados (hexosidos, pentosidos y glucurónicos). Tampoco se detectaron derivados glicosilados de BE y EME.

Las cantidades de COC y BE detectadas durante los días de exposición se presentan en la **Tabla 9**. EME no se detectó para ningún día. La concentración de BE ( $3 \pm 1.0$  ng/g en fresco) no varió significativamente durante los días de medición. El experimento de exposición a la COC por espécimen mostró que al menos el 55 % de la COC añadida inicialmente fue bioacumulada. El experimento de exposición en el tiempo determinó que bioacumularon el 57 % de la COC disponible en el medio, siendo bioacumulada el 6 %, 17 % y 35 % de la COC disponible durante los días 0, 7 y 14, respectivamente.

**Tabla 9.**

*Resultados de cuantificación en el tiempo de cocaína y sus metabolitos en peces cebra expuestos al alcaloide.*

Día	N° peces restantes	Cantidad de alcaloide, ng /g pez fresco		Cantidad de cocaína, ng		<sup>b</sup> cantidad calculada de exposición a la cocaína por pez, ng / pez
		Cocaína	Benzoilecgonina	total bioacumulada	<sup>a</sup> calculada en el agua	
0	9	0.6 ± 0.11	2.4 ± 0.4	8.4 ± 0.42	150	17
7	6	0.9 ± 0.29	3 ± 1.6	24 ± 1.6	142	24
14	3	13 ± 1.1	2.2 ± 0.34	46 ± 1.2	131	44

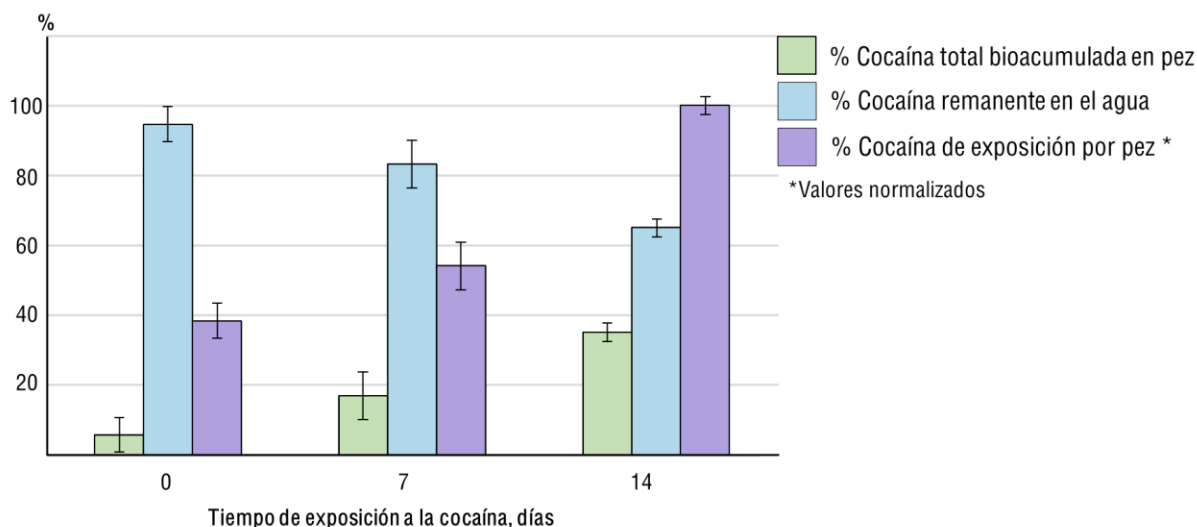
*Nota.* <sup>a</sup> cantidad de cocaína en el agua = cantidad de cocaína añadida – cantidad promedio de cocaína en peces

<sup>b</sup> cantidad de cocaína expuesta por pez = cantidad de cocaína en el agua / N° peces restantes

El aumento de la bioacumulación de COC al día 14 puede ser consecuencia del incremento de la disponibilidad de COC por individuo a medida que avanza el experimento. Por ejemplo, si suponemos que la COC no fuera bioacumulada en el día 0 ni sufriera procesos de descomposición a BE durante todo el experimento, entre los días 0 y 7 habría exposición teórica a 150 ng COC para los seis peces restantes, mientras que, después del día 7 habría exposición teórica a 150 ng COC para los últimos tres peces. El balance de masa da que la cantidad calculada de COC por espécimen remanente en el agua para el día 14 fue mayor que para los días previos. La comparación entre los porcentajes de COC bioacumulada, la COC remanente en el agua y la cantidad calculada expuesta por pez en los días evaluados se presenta en la **Figura 15**.

**Figura 15.**

Comparación entre los porcentajes de cocaína bioacumulada, cantidad remanente en el agua y la cantidad de exposición por pez en los días evaluados.



La cinética de bioacumulación de un xenobiótico desde el agua se puede pensar de forma simple y general como la transferencia de masa del xenobiótico desde el medio al organismo y la transferencia de masa desde el organismo al medio por su excreción; donde las transferencias de masa estarían relacionadas con razones de cambio de ingreso y excreción, respectivamente. El incremento de la COC en el pez para el día 14 ( $13 \pm 1.1$  ng/g), comparado con la COC encontrada en el experimento previo ( $2.1 \pm 0.36$  ng/g), podría indicar una relación cinética entre la concentración de COC por pez (disponibilidad por individuo), el tiempo de exposición y su bioacumulación, donde a mayor concentración de COC por espécimen mayor bioacumulación se detectará. Estudios previos sobre la cinética de bioacumulación de contaminantes lipofílicos en organismos acuáticos, usualmente, muestran comportamientos similares a funciones hiperbólicas en el tiempo (Ashauer *et al.*, 2012; Connell, 1988; Streit, 1992, 1998); donde la bioacumulación

en el organismo incrementa hasta llegar a un equilibrio con la concentración del contaminante en el agua. A saber, STREIT (Streit, 1998) menciona que la bioacumulación del *o*-tert-butilfenol en el pez cebra desde el agua sigue aproximadamente una cinética de primer orden como la presentada en la ecuación X.

$$[\text{xenobiótico}]_{\text{pez}} = \frac{k_{in}}{k_{out}} \times [\text{xenobiótico}]_{\text{agua}} \times (1 - e^{-k_{out} \times \text{tiempo}}) \quad (X)$$

Donde  $k_{in}$  es la razón de cambio de ingreso del xenobiótico al pez;  $k_{out}$  es la razón de cambio de excreción hacia el agua; y  $[\text{xenobiótico}]_i$  representa la concentración del contaminante en el pez o en el agua (*i*). Suponiendo que (X) es aplicable para la bioacumulación de COC, se explicaría el aumento de la bioacumulación al aumentar la concentración de alcaloide por individuo en el tiempo. Sin embargo, los resultados obtenidos no permiten determinar cuál es el límite de bioacumulación de COC en los peces cebra.

Contaminantes lipofílicos como COC pueden traspasar las membranas biológicas fácilmente y bioacumularse más, mientras que, sus metabolitos al ser más hidrofílicos ven limitado su paso por las membranas y por tanto su bioacumulación. Esto podría explicar porque no incrementa la cantidad de BE en el tiempo. Los resultados obtenidos indican que el límite de bioacumulación de BE en los peces cebra es cercano a 3 ng/g pez fresco. El hecho que se detecte mayor cantidad de BE que COC desde el día cero (dos horas después de la administración de COC) hasta el día 7, podría indicar la rápida absorción, metabolismo y bioacumulación del alcaloide.

En Colombia puede presentarse bioacumulación de estas sustancias en los peces de consumo local por la exposición a concentraciones iguales o superiores a las utilizadas en este trabajo de investigación. Por ejemplo, BIJLSMA y col., reportaron la presencia de COC y BE (60-810 ng/L y 1100-6200 ng/L, respectivamente) en aguas tratadas por las PTAR “El salitre”

(Bogotá D.C) y “San Fernando” (Medellín). En ambos casos, las aguas tratadas desembocan finalmente en el Río Magdalena, al igual que, aguas tratadas de otras ciudades principales, *e.g.*, Barranquilla, Bucaramanga y Neiva. A saber, el Río Magdalena es uno de los ríos más importantes para la economía y alimentación local, ya que, según GALVIS y MOJICA (Galvis & Mojica, 2007), el Río Magdalena produce al menos el 60 % de los peces consumidos en Colombia.

El estudio de BIJLSMA y col., se realizó hace casi ocho años, por ende, las cantidades presentes en el agua pudieron disminuir, mantenerse o aumentar tras la pandemia. Actualmente en Colombia, no existe un programa de monitoreo de estos contaminantes en las aguas residuales, por lo cual, no se encuentra información actualizada al respecto. Según el reporte del 2021 de la oficina de drogas y crímenes de las naciones unidas (UNODC) (UNODC, 2022b), la producción y las incautaciones de COC, en general, se restablecieron y aumentaron luego del segundo semestre del 2020. El tamaño de los cargamentos de COC y el uso de rutas marítimas para su transporte aumentaron comparados con los datos prepandemia. Esto último podría contribuir al aumento de la presencia de estas sustancias en las fuentes hídricas de Colombia y el mundo; y a su bioacumulación en los organismos acuáticos.

Este trabajo de investigación contribuye con nueva información sobre la bioacumulación de COC y su metabolito principal en peces cebras, la cual se suma a los reportes previos sobre los efectos fisiológicos de la COC en peces cebras como: ansiedad, hiperactividad, movimientos erráticos (López Patiño, Yu, Cabral, *et al.*, 2008; López Patiño, Yu, Yamamoto, *et al.*, 2008); taquicardia, variación de neuro receptores, citotoxicidad y alteración en el perfil proteico en embriones (Barreto-Valer *et al.*, 2012, 2013; Darland & Dowling, 2001; López-Bellido *et al.*, 2013; Mersereau *et al.*, 2015; Parolini *et al.*, 2017, 2018).

## 6. Conclusiones

La mezcla metanol:diclorometano (1:1 v/v) presentó mayor interacción con los analitos presentes en matriz MSPD comparado con los solventes individuales, como consecuencia, su eficiencia de extracción fue la mayor. Las mejores condiciones de extracción MSPD, según el ANOVA del diseño experimental 2<sup>3</sup> realizado, son las siguientes: alúmina como soporte sólido; 1:8 relación muestra:soporte sólido; y 7 mL de mezcla metanol:diclorometano (1:1 v/v).

El estudio de la fragmentación variando la energía de colisión aplicada mostró que 30 eV permite identificar los iones característicos con intensidades altas (>10 %) para la cocaína y benzoilecgonina, mientras que aplicando 50 eV permitió identificar los iones característicos de la ecgonina metil éster. El voltaje del capilar de electronebulización que permite registrar mayor número de iones para la cocaína es 1.5 kV; no existieron diferencias significativas entre los cinco voltajes evaluados (1.5 hasta 5.5 kV) para benzoilecgonina y ecgonina metil éster.

La cocaína ( $2.1 \pm 0.36$  ng/g en fresco) y benzoilecgonina ( $3.0 \pm 0.54$  ng/g en fresco) fueron detectados en peces cebras expuestos al alcaloide (20 ng/L cocaína) durante 2 semanas. La ecgonina metil éster no se detectó en ningún pez.

Este es el primer reporte de extracción MSPD de cocaína y sus metabolitos en peces, que, a su vez evalúa cuatro variables experimentales (la cantidad y el tipo de soporte sólido, y el tipo y volumen de solvente de elución). Además, aporta nueva información sobre la bioacumulación de cocaína y su metabolito principal en peces cebras, la cual, complementa el conocimiento sobre los efectos que tiene el alcaloide en estos peces.

### Referencias bibliográficas

- Adatsi, F. K. (2014). Forensic Toxicology. En *Encyclopedia of Toxicology* (pp. 647–652). Elsevier.
- Agudelo, L. P. A., Durán, D. C., Martínéz, J. R., & Stashenko, E. (2018, septiembre 5). Análisis por GC-MS y LC-MS de timol, carvacrol y sus glucurónidos en diferentes órganos de pollo de engorde. *Semana Internacional de la Ciencia: Retos para el siglo XXI*. Semana Internacional de la Ciencia: Retos para el siglo XXI. <https://conferencias.uis.edu.co/index.php/semanainterciencia/seminterciencia/paper/view/70>
- Aleksandrov, M. L., Gall, L. N., Krasnov, N. V., Nikolaev, V. I., Pavlenko, V. A., & Shkurov, V. A. (1984). *Ion extraction from solutions at atmospheric pressure—A method for mass-spectrometric analysis of bioorganic substances*. 277(2), 379–383.
- Aleksandrov, M. L., Gall, L. N., Krasnov, N. V., Nikolaev, V. I., Pavlenko, V. A., & Shkurov, V. A. (1985). *Mechanism of Ion Formation during Electrohydrodynamic Sputtering of a Liquid in a Vacuum*. 40, 1227–1236.
- Allende, M. L., Calcaterra, N. B., Vianna, M. R., & Zolessi, F. R. (2011). First Meeting of the Latin American Zebrafish Network. *Zebrafish*, 8(1), 31–33.
- Amara, S. B., Koslowski, T., & Zaidi, A. (2021). Quantum Chemistry of Cocaine and its Isomers I: Energetics, Reactivity and Solvation. *South African Journal of Chemistry*, 75.
- Andrés-Costa, M. J., Andreu, V., & Picó, Y. (2016). Analysis of psychoactive substances in water by information dependent acquisition on a hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometer. *Journal of Chromatography A*, 1461, 98–106.

- Armada de Colombia. (2020). *DINAMICA DEL NARCOTRÁFICO MARÍTIMO AÑO 2019* (p. 112). Armada de Colombia.
- Ashauer, R., Hintermeister, A., O'Connor, I., Elumelu, M., Hollender, J., & Escher, B. I. (2012). Significance of Xenobiotic Metabolism for Bioaccumulation Kinetics of Organic Chemicals in *Gammarus pulex*. *Environmental Science & Technology*, 46(6), 3498–3508.
- Ashley, R. (1976). *Cocaine, its history, uses and effects*. Warner Books.
- Audier, H. E. (1969). Ionisation et fragmentation en spectrometrie de masse—I: Sur la répartition de la charge positive entre fragments provenant de mêmes ruptures. *Organic Mass Spectrometry*, 2(3), 283–298.
- Avdesh, A., Chen, M., Martin-Iverson, M. T., Mondal, A., Ong, D., Rainey-Smith, S., Taddei, K., Lardelli, M., Groth, D. M., Verdile, G., & Martins, R. N. (2012). Regular Care and Maintenance of a Zebrafish (*Danio rerio*) Laboratory: An Introduction. *Journal of Visualized Experiments*, 69, 4196.
- Barker, S. A. (2000). Matrix solid-phase dispersion. *J. Chromatogr. A.*, 885(1-2), 115-127.
- Barker, S. A. (2007). Matrix solid phase dispersion (MSPD). *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70(2), 151–162.
- Barker, S. A., Hsieh, L. C., & Short, C. R. (1986). Methodology for the analysis of fenbendazole and its metabolites in plasma, urine, feces, and tissue homogenates. *Analytical Biochemistry*, 155(1), 112–118.
- Barker, S. A., Long, A. R., & Short, C. R. (1989). Isolation of drug residues from tissues by solid phase dispersion. *Journal of Chromatography A*, 475(2), 353–361.

- Barker, S. A., Mcdowell, T., Charkhian, B., Hsieh, L. C., & Short, C. R. (1990). Methodology for the Analysis of Benzimidazole Anthelmintics as Drug Residues in Animal Tissues. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 73(1), 22–25.
- Barreto-Valer, K., López-Bellido, R., Macho Sánchez-Simón, F., & Rodríguez, R. E. (2012). Modulation by Cocaine of Dopamine Receptors through miRNA-133b in Zebrafish Embryos. *PLoS ONE*, 7(12), e52701.
- Barreto-Valer, K., López-Bellido, R., & Rodríguez, R. E. (2013). Cocaine modulates the expression of transcription factors related to the dopaminergic system in zebrafish. *Neuroscience*, 231, 258–271.
- Batool, A., & Mena, F. (2020). Concentration and purification of seaweed components by chromatography methods. En *Sustainable Seaweed Technologies* (pp. 315–370). Elsevier.
- Baumann, M. H., Gendron, T. M., Becketts, K. M., Henningfield, J. E., Gorelick, D. A., & Rothman, R. B. (1995). Effects of intravenous cocaine on plasma cortisol and prolactin in human cocaine abusers. *Biological Psychiatry*, 38(11), 751–755.
- Bean, T. G., Rattner, B. A., Lazarus, R. S., Day, D. D., Burket, S. R., Brooks, B. W., Haddad, S. P., & Bowerman, W. W. (2018). Pharmaceuticals in water, fish and osprey nestlings in Delaware River and Bay. *Environmental Pollution*, 232, 533–545.
- Bell, S. (2013). Drugs as Physical Evidence: Seized Drugs and Their Analysis. En *Forensic chemistry* (2nd ed, pp. 213–306). Pearson.
- Bijlsma, L., Botero-Coy, A. M., Rincón, R. J., Peñuela, G. A., & Hernández, F. (2016). Estimation of illicit drug use in the main cities of Colombia by means of urban wastewater analysis. *Science of The Total Environment*, 565, 984–993.

- Brazeau, G. A., McArdle, A., & Jackson, M. J. (1995). Effects of cocaine on leakage of creatine kinase from skeletal muscle: In vitro and in vivo studies in mice. *Life Sciences*, *57*(17),
- Brewer, J. D., Meves, A., Bostwick, J. M., Hamacher, K. L., & Pittelkow, M. R. (2008). Cocaine abuse: Dermatologic manifestations and therapeutic approaches. *Journal of the American Academy of Dermatology*, *59*(3), 483–487.
- Briggs, J. P. (2002). The zebrafish: A new model organism for integrative physiology. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *282*(1), R3–R9.
- Brunetto, M. R., Cayama, Y. D., García, L. G., Gallignani, M., & Obando, M. A. (2005). Determination of cocaine and benzoylecgonine by direct injection of human urine into a column-switching liquid chromatography system with diode-array detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *37*(1), 115–120.
- Budziszewska, B., Jaworska-Feil, L., & Lasoń, W. (2009). The effect of repeated amphetamine and cocaine administration on adrenal, gonadal and thyroid hormone levels in the rat plasma. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, *104*(04), 334–338.
- Campestrini, I., & Jardim, W. F. (2017). Occurrence of cocaine and benzoylecgonine in drinking and source water in the São Paulo State region, Brazil. *Science of The Total Environment*, *576*, 374–380.
- Capaldo, A., Gay, F., & Laforgia, V. (2019). Changes in the gills of the European eel (*Anguilla anguilla*) after chronic exposure to environmental cocaine concentration. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *169*, 112–119.
- Capaldo, A., Gay, F., Lepretti, M., Paoletta, G., Martucciello, S., Lionetti, L., Caputo, I., & Laforgia, V. (2018). Effects of environmental cocaine concentrations on the skeletal

- muscle of the European eel (*Anguilla anguilla*). *Science of The Total Environment*, 640–641, 862–873.
- Capaldo, A., Gay, F., Maddaloni, M., Valiante, S., De Falco, M., Lenzi, M., & Laforgia, V. (2012). Presence of Cocaine in the Tissues of the European Eel, *Anguilla anguilla*, Exposed to Environmental Cocaine Concentrations. *Water, Air, & Soil Pollution*, 223(5), 2137–2143.
- Capriotti, A. L., Cavaliere, C., Giansanti, P., Gubbio, R., Samperi, R., & Laganà, A. (2010). Recent developments in matrix solid-phase dispersion extraction. *Journal of Chromatography A*, 1217(16), 2521–2532.
- Cartier, J., Gueniat, O., & Cole, M. D. (1997). Headspace analysis of solvents in cocaine and heroin samples. *Science & Justice*, 37(3), 175–181.
- Castiglioni, S., Zuccato, E., Chiabrando, C., Fanelli, R., & Bagnati, R. (2008). Mass spectrometric analysis of illicit drugs in wastewater and surface water. *Mass Spectrometry Reviews*, 27(4), 378–394.
- Castiglioni, S., Zuccato, E., Crisci, E., Chiabrando, C., Fanelli, R., & Bagnati, R. (2006). Identification and Measurement of Illicit Drugs and Their Metabolites in Urban Wastewater by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 78(24), 8421–8429.
- Castranova, D., Lawton, A., Lawrence, C., Baumann, D. P., Best, J., Coscolla, J., Doherty, A., Ramos, J., Hakkesteeg, J., Wang, C., Wilson, C., Malley, J., & Weinstein, B. M. (2011). The Effect of Stocking Densities on Reproductive Performance in Laboratory Zebrafish (*Danio rerio*). *Zebrafish*, 8(3), 141–146.
- Causanilles, A., Ruepert, C., Ibáñez, M., Emke, E., Hernández, F., & de Voogt, P. (2017). Occurrence and fate of illicit drugs and pharmaceuticals in wastewater from two

- wastewater treatment plants in Costa Rica. *Science of The Total Environment*, 599–600, 98–107.
- Cech, N. B., & Enke, C. G. (2001). Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals. *Mass Spectrometry Reviews*, 20(6), 362–387.
- Chasin, A. A. da M., & Mídio, A. F. (1997). Exposição humana à cocaína e ao cocaetileno: Disposição e parâmetros toxicocinéticos. *Rev. farm. bioquim. Univ. São Paulo*, 1–12.
- Chen, X., Zheng, X., Ding, K., Zhou, Z., Zhan, C.-G., & Zheng, F. (2017). A quantitative LC–MS/MS method for simultaneous determination of cocaine and its metabolites in whole blood. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 134, 243–251.
- Cole, R. B. (Ed.). (1997). Part I. Fundamental aspects of electrospray ionization (ESI). En *Electrospray ionization mass spectrometry: Fundamentals, instrumentation, and applications* (543.65/E38.; pp. 3–60). Wiley.
- Cone, E. J., Tsadik, A., Oyler, J., & Darwin, W. D. (1998). Cocaine Metabolism and Urinary Excretion After Different Routes of Administration. *Therapeutic Drug Monitoring*, 20(5), 556–560. [https://journals.lww.com/drug-monitoring/Fulltext/1998/10000/Cocaine\\_Metabolism\\_and\\_Urinary\\_Excretion\\_After.19.aspx?casa\\_token=iNMsl5CoiE4AAAAA:1UhWPY397Jqfs83r5hj5q-TwGkO8V2akfdW2jzrlJdJrLluiAG1b8RpOfsKOFKN5nrlOrHRtQYK1lxlL\\_UR4j4I](https://journals.lww.com/drug-monitoring/Fulltext/1998/10000/Cocaine_Metabolism_and_Urinary_Excretion_After.19.aspx?casa_token=iNMsl5CoiE4AAAAA:1UhWPY397Jqfs83r5hj5q-TwGkO8V2akfdW2jzrlJdJrLluiAG1b8RpOfsKOFKN5nrlOrHRtQYK1lxlL_UR4j4I)
- Connell, D. W. (1988). Bioaccumulation Behavior of Persistent Organic Chemicals with Aquatic Organisms. En G. W. Ware (Ed.), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* (Vol. 102, pp. 117–154). Springer New York.
- Crutchfield, C. A., & Clarke, W. (2017). High resolution accurate mass (HRAM) mass spectrometry. En *Mass Spectrometry for the Clinical Laboratory* (pp. 247–259). Elsevier.

- Darland, T., & Dowling, J. E. (2001). Behavioral screening for cocaine sensitivity in mutagenized zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(20), 11691–11696.
- Daughton, C. G., & Ruhoy, I. S. (2008). The Afterlife of Drugs and the Role of PharmEcovigilance: *Drug Safety*, 31(12), 1069–1082.
- David, A., Lange, A., Tyler, C. R., & Hill, E. M. (2018). Concentrating mixtures of neuroactive pharmaceuticals and altered neurotransmitter levels in the brain of fish exposed to a wastewater effluent. *Science of The Total Environment*, 621, 782–790.
- de la Guardia, M., & Armenta, S. (2011). Downsizing the Methods. En *Comprehensive Analytical Chemistry* (Vol. 57, pp. 157–184). Elsevier.
- Du, B., Haddad, S. P., Luek, A., Scott, W. C., Saari, G. N., Burket, S. R., Breed, C. S., Kelly, M., Broach, L., Rasmussen, J. B., Chambliss, C. K., & Brooks, B. W. (2016). Bioaccumulation of human pharmaceuticals in fish across habitats of a tidally influenced urban bayou: Pharmaceutical bioaccumulation in an urban coastal ecosystem. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35(4), 966–974.
- Engelhardt, H., Dreyer, B., & Schmidt, H. (1982). Properties and diversity of C18 bonded phases. *Chromatographia*, 16(1), 11–17.
- Fantuzzi, G., Aggazzotti, G., Righi, E., Predieri, G., Castiglioni, S., Riva, F., & Zuccato, E. (2018). Illicit drugs and pharmaceuticals in swimming pool waters. *Science of The Total Environment*, 635, 956–963.
- Fernández-Rubio, J., Rodríguez-Gil, J. L., Postigo, C., Mastroianni, N., López de Alda, M., Barceló, D., & Valcárcel, Y. (2019). Psychoactive pharmaceuticals and illicit drugs in coastal waters of North-Western Spain: Environmental exposure and risk assessment. *Chemosphere*, 224, 379–389.

- Filho, J. F. A., Lacerda, V., & Romão, W. (2019). Fourier transform mass spectrometry applied to Forensic Chemistry. En *Fundamentals and Applications of Fourier Transform Mass Spectrometry* (pp. 469–508). Elsevier.
- Fish, F., & Wilson, W. D. C. (1969). Excretion of cocaine and its metabolites in man. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 21(S1), 135S-138S.
- Foltin, R. (1995). Cardiovascular effects of cocaine in humans: Laboratory studies. *Drug and Alcohol Dependence*, 37(3), 193–210.
- Fontes, M. K., de Campos, B. G., Cortez, F. S., Pusceddu, F. H., Moreno, B. B., Maranhão, L. A., Lebre, D. T., Guimarães, L. L., & Pereira, C. D. S. (2019). Seasonal monitoring of cocaine and benzoylecgonine in a subtropical coastal zone (Santos Bay, Brazil). *Marine Pollution Bulletin*, 149, 110545.
- Frisch, M. J. et. al. (2016). *Gaussian 09, Revision A 02*. Gaussian, Inc.
- Furusawa, N. (2004). A toxic reagent-free method for normal-phase matrix solid-phase dispersion extraction and reversed-phase liquid chromatographic determination of aldrin, dieldrin, and DDTs in animal fats. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378(8), 2004–2007.
- Galvis, G., & Mojica, J. I. (2007). The Magdalena River fresh water fishes and fisheries. *Aquatic Ecosystem Health & Management*, 10(2), 127–139.
- Gay, F., Ferrandino, I., Monaco, A., Cerulo, M., Capasso, G., & Capaldo, A. (2016). Histological and hormonal changes in the European eel (*Anguilla anguilla*) after exposure to environmental cocaine concentration. *Journal of Fish Diseases*, 39(3), 295–308.
- Gheorghe, A., van Nuijs, A., Pecceu, B., Bervoets, L., Jorens, P. G., Blust, R., Neels, H., & Covaci, A. (2008). Analysis of cocaine and its principal metabolites in waste and surface water

- using solid-phase extraction and liquid chromatography–ion trap tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391(4), 1309–1319.
- Giddings, J. C., & Eyring, H. (1955). A Molecular Dynamic Theory of Chromatography. *The Journal of Physical Chemistry*, 59(5), 416–421.
- Gold, V. (Ed.). (2019). *The IUPAC Compendium of Chemical Terminology: The Gold Book* (4a ed.). International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC).
- Goldstein, R. A., DesLauriers, C., Burda, A., & Johnson-Arbor, K. (2009). Cocaine: History, social implications, and toxicity: a review. *Seminars in Diagnostic Pathology*, 26(1), 10–17.
- Gross, J. H. (2017). Electrospray Roundup. En *Mass Spectrometry: A Textbook* (3rd ed. 2017, pp. 766–769). Springer International Publishing : Imprint: Springer.
- Grün, M., Kurganov, A. A., Schacht, S., Schüth, F., & Unger, K. K. (1996). Comparison of an ordered mesoporous aluminosilicate, silica, alumina, titania and zirconia in normal-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 740(1), 1–9.
- Hardman, M., & Makarov, A. A. (2003). Interfacing the Orbitrap Mass Analyzer to an Electrospray Ion Source. *Analytical Chemistry*, 75(7), 1699–1705.
- Helou, A. M., Keefe, M., Mottaleb, M. A., Thomson, W. J., & Mottaleb, M. A. (2018). Analysis of illicit drugs and pharmaceuticals in edible seaweeds by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical Methods*, 10(38), 4702–4710.
- Hill, A. J., Teraoka, H., Heideman, W., & Peterson, R. E. (2005). Zebrafish as a Model Vertebrate for Investigating Chemical Toxicity. *Toxicological Sciences*, 86(1), 6–19.
- Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., Collins, J. E., Humphray, S., McLaren, K., Matthews, L., McLaren, S., Sealy, I., Caccamo, M., Churcher, C., Scott, C., Barrett, J. C., Koch, R., Rauch, G.-J., White, S., ... Stemple, D. L. (2013).

- The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, 496(7446).
- Hu, Q., Noll, R. J., Li, H., Makarov, A., Hardman, M., & Graham Cooks, R. (2005). The Orbitrap: A new mass spectrometer. *Journal of Mass Spectrometry*, 40(4), 430–443.
- Huerta, B., Jakimska, A., Gros, M., Rodríguez-Mozaz, S., & Barceló, D. (2013). Analysis of multi-class pharmaceuticals in fish tissues by ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1288, 63–72.
- Huerta-Fontela, M., Galceran, M. T., & Ventura, F. (2008). Stimulatory Drugs of Abuse in Surface Waters and Their Removal in a Conventional Drinking Water Treatment Plant. *Environmental Science & Technology*, 42(18), 6809–6816.
- Hutchings, A. D., & Widdop, B. (2013). Drugs of Abuse. En *The Immunoassay Handbook* (pp. 963–987). Elsevier.
- Insulza, J. M. (2014). *El problema de drogas en las Americas: Estudios* (p. 52). Organización de los Estados Americanos. <http://201.217.213.202/Portals/1/publicaciones/pdf/consumo/estudios/internacionales/CO03992013-problema-drogas-americanas-.pdf>
- Jennings, W., Mittlefehldt, E., & Stremple, P. P. (1997). Introduction. En *Analytical Gas Chromatography* (2nd ed, pp. 1–29). Academic Press.
- Kasprzyk-Hordern, B., Dinsdale, R. M., & Guwy, A. J. (2007). Multi-residue method for the determination of basic/neutral pharmaceuticals and illicit drugs in surface water by solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography–positive electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1161(1–2), 132–145.

- Kim, H.-Y., Lee, I.-S., & Oh, J.-E. (2017). Human and veterinary pharmaceuticals in the marine environment including fish farms in Korea. *Science of The Total Environment*, 579, 940–949.
- Kim, S., Carlson, R., Zafreen, L., Rajpurohit, S. K., & Jagadeeswaran, P. (2009). Modular, Easy-to-Assemble, Low-Cost Zebrafish Facility. *Zebrafish*, 6(3), 269–274.
- Kirla, K. T., Groh, K. J., Steuer, A. E., Poetzsch, M., Banote, R. K., Stadnicka-Michalak, J., Eggen, R. I. L., Schirmer, K., & Kraemer, T. (2016). From the Cover: Zebrafish Larvae Are Insensitive to Stimulation by Cocaine: Importance of Exposure Route and Toxicokinetics. *Toxicological Sciences*, 154(1), 183–193.
- Kishida, K., & Furusawa, N. (2001). Matrix solid-phase dispersion extraction and high-performance liquid chromatographic determination of residual sulfonamides in chicken. *Journal of Chromatography A*, 937(1–2), 49–55.
- Klingmann, A., Skopp, G., & Aderjan, R. (2001). Analysis of Cocaine, Benzoylecgonine Ecgonine Methyl Ester, and Ecgonine by High-Pressure Liquid Chromatography-API Mass Spectrometry and Application to a Short-Term Degradation Study of Cocaine in Plasma. *Journal of Analytical Toxicology*, 25(6), 425–430.
- Knox, J. H. (1978). Retention and peak spreading. En *High-performance Liquid Chromatography* (1a ed., pp. 5–18). Edinburgh University Press.
- Koob, G. F., Arends, M. A., & Le Moal, M. (2014). Psychostimulants. En *Drugs, Addiction, and the Brain* (p. 108). Elsevier.
- Küster, E. (2005). Cholin- and carboxylesterase activities in developing zebrafish embryos (*Danio rerio*) and their potential use for insecticide hazard assessment. *Aquatic Toxicology*, 75(1), 76–85.

- Lachenmeier, D. W., Kroener, L., Musshoff, F., & Madea, B. (2003). Application of tandem mass spectrometry combined with gas chromatography and headspace solid-phase dynamic extraction for the determination of drugs of abuse in hair samples. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, *17*(5), 472–478.
- Langman, L. J., Bjergum, M. W., Williamson, C. L., & Crow, F. W. (2009). Sensitive Method For Detection Of Cocaine And Associated Analytes By Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry In Urine. *Journal of Analytical Toxicology*, *33*(8), 447–455.
- Larsson, P., Hamrin, S., & Okla, L. (1991). *Factors Determining the Uptake of Persistent Pollutants in an Eel Population (Anguilla anguilla L.)*.
- Laurent, C. J. C. M., Billiet, H. A. H., & De Galan, L. (1984). High-performance liquid chromatography of heroin samples on alumina by ion exchange in mixed aqueous—Organic mobile phases. *Journal of Chromatography A*, *285*, 161–170.
- Laurent, C. J. C. M., Billiet, H. A. H., De Galan, L., Buytenhuys, F. A., & Van Der Maeden, F. P. B. (1984). High-performance liquid chromatography of proteins on alumina. *Journal of Chromatography A*, *287*, 45–54.
- Levisky, J. A., Bowerman, D. L., Jenkins, W. W., & Karch, S. B. (2000). Drug deposition in adipose tissue and skin: Evidence for an alternative source of positive sweat patch tests. *Forensic Science International*, *110*(1), 35–46.
- Lieschke, G. J., & Currie, P. D. (2007). Animal models of human disease: Zebrafish swim into view. *Nature Reviews Genetics*, *8*(5), 353–367.
- López Patiño, M. A., Yu, L., Cabral, H., & Zhdanova, I. V. (2008). Anxiogenic effects of cocaine withdrawal in zebrafish. *Physiology & Behavior*, *93*(1–2), 160–171.

- López Patiño, M. A., Yu, L., Yamamoto, B. K., & Zhdanova, I. V. (2008). Gender differences in zebrafish responses to cocaine withdrawal. *Physiology & Behavior*, *95*(1–2), 36–47.
- López-Bellido, R., Barreto-Valer, K., & Rodríguez, R. E. (2013). Expression of tachykinin receptors (tacr1a and tacr1b) in zebrafish: Influence of cocaine and opioid receptors. *Journal of Molecular Endocrinology*, *50*(2), 115–129.
- Magalhães, E. J., Queiroz, M. E. L. R. de, Penido, M. L. de O., Paiva, M. A. R., Teodoro, J. A. R., Augusti, R., & Nascentes, C. C. (2013). Determination of cocaine in postmortem human liver exposed to overdose. Application of an innovative and efficient extraction/clean up procedure and gas chromatography–mass spectrometry analysis. *Journal of Chromatography A*, *1309*, 15–21.
- Makarov, A. (2000). Electrostatic Axially Harmonic Orbital Trapping: A High-Performance Technique of Mass Analysis. *Analytical Chemistry*, *72*(6), 1156–1162.
- Mandarić, L., Čelić, M., Marčević, R., & Petrović, M. (2015). Introduction on Emerging Contaminants in Rivers and Their Environmental Risk. En M. Petrović, S. Sabater, A. Elosegi, & D. Barceló (Eds.), *Emerging Contaminants in River Ecosystems* (Vol. 46, pp. 3–25). Springer International Publishing.
- Mariani, A., & Uzanne, J. (2019). *Figures Contemporaines*. Creative Media Partners, LLC.
- Marruffa, J. M. (2014). Drugs of Abuse. En *Encyclopedia of Toxicology* (pp. 248–251). Elsevier.
- Martin, A. J. P., & Synge, R. L. M. (1941). A new form of chromatogram employing two liquid phases. *Biochemical Journal*, *35*(12), 1358–1368.
- Maurer, H. H., Sauer, C., & Theobald, D. S. (2006). Toxicokinetics of Drugs of Abuse: Current Knowledge of the Isoenzymes Involved in the Human Metabolism of

- Tetrahydrocannabinol, Cocaine, Heroin, Morphine, and Codeine. *Therapeutic Drug Monitoring*, 28(3), 447–453.
- McLafferty, F. W., & Tureček, F. (1993). Basic factors that influence ion abundance. En *Interpretation of mass spectra* (4th ed, pp. 52–53). University Science Books.
- Mersereau, E. J., Poitra, S. L., Espinoza, A., Crossley, D. A., & Darland, T. (2015). The effects of cocaine on heart rate and electrocardiogram in zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 172–173, 1–6.
- Michalski, A., Damoc, E., Hauschild, J.-P., Lange, O., Wieghaus, A., Makarov, A., Nagaraj, N., Cox, J., Mann, M., & Horning, S. (2011). Mass Spectrometry-based Proteomics Using Q Exactive, a High-performance Benchtop Quadrupole Orbitrap Mass Spectrometer. *Molecular & Cellular Proteomics*, 10(9), M111.011015.
- Míguez-Framil, M., Cabarcos, P., Taberner, M. J., Bermejo, A. M., Bermejo-Barrera, P., & Moreda-Piñeiro, A. (2013). Matrix solid phase dispersion assisted enzymatic hydrolysis as a novel approach for cocaine and opiates isolation from human hair. *Journal of Chromatography A*, 1316, 15–22.
- Míguez-Framil, M., Moreda-Piñeiro, A., Bermejo-Barrera, P., Álvarez-Freire, I., Taberner, M. J., & Bermejo, A. M. (2010). Matrix solid-phase dispersion on column clean-up/pre-concentration as a novel approach for fast isolation of abuse drugs from human hair. *Journal of Chromatography A*, 1217(41), 6342–6349.
- Miller, T. H., Ng, K. T., Bury, S. T., Bury, S. E., Bury, N. R., & Barron, L. P. (2019). Biomonitoring of pesticides, pharmaceuticals and illicit drugs in a freshwater invertebrate to estimate toxic or effect pressure. *Environment International*, 129, 595–606.

- Misra, A. L., Nayak, P. K., Bloch, R., & Mulé, S. J. (1975). Estimation and disposition of [3H]benzoylecgonine and pharmacological activity of some cocaine metabolites. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 27(10), 784–786.
- Misra, A. L., Patel, M. N., Alluri, V. R., Mulé, S. J., & Nayak, P. K. (1976). Disposition and Metabolism of [ <sup>3</sup>H Cocaine in Acutely and Chronically treated Dogs. *Xenobiotica*, 6(9), 537–552.
- Mocak, J., Bond, A. M., Mitchell, S., & Scollary, G. (1997). A statistical overview of standard (IUPAC and ACS) and new procedures for determining the limits of detection and quantification: Application to voltammetric and stripping techniques (Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 69(2), 297–328.
- Montesinos, F. (1965, enero 1). *Metabolism of cocaine*. United Nations : Office on Drugs and Crime. [//www.unodc.org/unodc/en/data-and-analysis/bulletin/bulletin\\_1965-01-01\\_2\\_page003.html](http://www.unodc.org/unodc/en/data-and-analysis/bulletin/bulletin_1965-01-01_2_page003.html)
- Mortimer, W. G. (2013). *Peru: History of Coca: Vol. I*. Book on Demand Ltd.
- Mulé, S. J. (1976). Historical Aspects of Cocaine Use and Abuse. En *Cocaine: Chemical, biological, clinical, social, and treatment aspects* (pp. 3–11). CRC Press.
- Mulé, S. J., & Misra, A. L. (1977). Cocaine: Distribution and Metabolism in Animals. En E. H. Ellinwood & M. M. Kilbey (Eds.), *Cocaine and Other Stimulants* (Vol. 21, pp. 215–228). Springer US.
- Muriel P., M. I., Llorente A., G. L., & David M., D. M. (2008). Análisis toxicológico. En *Química Forense* (1a ed., pp. 74–84). Univ. libre de Colombia.
- Murray, K. K. (2022). Resolution and Resolving Power in Mass Spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 33(12), 2342–2347.

- Musto, D. F. (1968). A Study in Cocaine: Sherlock Holmes and Sigmund Freud. *JAMA*, *204*(1), 27.
- Nasal, A., Siluk, D., & Kaliszan, R. (2003). Chromatographic Retention Parameters in Medicinal Chemistry and Molecular Pharmacology. *Current Medicinal Chemistry*, *10*(5), 381–426.
- Nawaji, T., Yamashita, N., Umeda, H., Zhang, S., Mizoguchi, N., Seki, M., Kitazawa, T., & Teraoka, H. (2020). Cytochrome P450 Expression and Chemical Metabolic Activity before Full Liver Development in Zebrafish. *Pharmaceuticals*, *13*(12), Article 12.
- Nayak, P. K., Misra, A. L., & Mulé, S. J. (1976). Physiological disposition and biotransformation of (3H) cocaine in acutely and chronically treated rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *196*(3), 556–569.
- Nestler, E. J. (2004). Molecular mechanisms of drug addiction. *Neuropharmacology*, *47*, 24–32.
- NIDA, & NIMH. (1973). The psychopharmacology of cocaine. En *Drug Use in America: Problem in Perspective. The technical papers of the second report of the National commission on marihuana and drug abuse: Patterns and consequences of drug use. Appendix 1* (Vol. 1, pp. 116–139). National commission on marihuana and drug abuse.
- Niemann, A. (1860). Ueber eine neue organische Base in den Cocablättern. *Archiv der Pharmazie*, *153*(2), 129–155.
- Novák, M., Salemink, C. A., & Khan, I. (1984). Biological activity of the alkaloids of *Erythroxylum coca* and *Erythroxylum novogranatense*. *Journal of Ethnopharmacology*, *10*(3), 261–274.
- Nzerue, C. M., Hewan-Lowe, K., & Riley, L. J. (2000). Cocaine and the kidney: A synthesis of pathophysiologic and clinical perspectives. *American Journal of Kidney Diseases*, *35*(5), 783–795.

- OEA. (2019). *Informe sobre el consumo de drogas en las Américas 2019* (p. 311). Organización de los Estados Americanos. <http://www.cicad.oas.org/oid/Informe%20sobre%20el%20consumo%20de%20drogas%20en%20las%20Am%C3%A9ricas%202019.pdf>
- Ojanperä, I., Kolmonen, M., & Pelander, A. (2012). Current use of high-resolution mass spectrometry in drug screening relevant to clinical and forensic toxicology and doping control. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *403*(5), 1203–1220.
- Ojemaye, C. Y., & Petrik, L. (2019). Occurrences, levels and risk assessment studies of emerging pollutants (pharmaceuticals, perfluoroalkyl and endocrine disrupting compounds) in fish samples from Kalk Bay harbour, South Africa. *Environmental Pollution*, *252*, 562–572.
- Ondarza, P. M., Haddad, S. P., Avigliano, E., Miglioranza, K. S. B., & Brooks, B. W. (2019). Pharmaceuticals, illicit drugs and their metabolites in fish from Argentina: Implications for protected areas influenced by urbanization. *Science of The Total Environment*, *649*, 1029–1037.
- PARES. (2020). *El tráfico de cocaína de Colombia hacia el mundo* (p. 12). Fundación Paz y Reconciliación.
- Parolini, M., Bini, L., Magni, S., Rizzo, A., Ghilardi, A., Landi, C., Armini, A., Del Giacco, L., & Binelli, A. (2018). Exposure to cocaine and its main metabolites altered the protein profile of zebrafish embryos. *Environmental Pollution*, *232*, 603–614.
- Parolini, M., Ghilardi, A., Della Torre, C., Magni, S., Prospero, L., Calvagno, M., Del Giacco, L., & Binelli, A. (2017). Environmental concentrations of cocaine and its main metabolites modulated antioxidant response and caused cyto-genotoxic effects in zebrafish embryo cells. *Environmental Pollution*, *226*, 504–514.

- Paw, B. H. (2003). Zebrafish a genetic model for vertebrate organogenesis and human disorders. *Frontiers in Bioscience*, 8(4), 1227–1253.
- Pawliszyn, J. (Ed.). (2012). Matrix Solid-Phase Dispersion. En *Comprehensive sampling and sample preparation: Analytical techniques for scientists* (558a ed., Vol. 2, pp. 273–298). Elsevier.
- Poklis, A., Maginn, D., & Barr, J. L. (1987). Tissue disposition of cocaine in man: A report of five fatal poisonings. *Forensic Science International*, 33(2), 83–88.
- Portugal-Cohen, M., Numa, R., Yaka, R., & Kohen, R. (2010). Cocaine induces oxidative damage to skin via xanthine oxidase and nitric oxide synthase. *Journal of Dermatological Science*, 58(2), 105–112.
- Prada, F., Stashenko, E. E., & Martínez, J. R. (2020a). *Variación en el contenido de alcaloides pirrolizidínicos y compuestos orgánicos volátiles en Crotalaria spp. (Fabaceae) inducidos por herbivoría con Utetheisa ornatrix (Lepidóptera)* [Tesis de Doctorado en Química]. Universidad Industrial de Santander.
- Prada, F., Stashenko, E. E., & Martínez, J. R. (2020b). LC/MS study of the diversity and distribution of pyrrolizidine alkaloids in *Crotalaria* species growing in Colombia. *Journal of Separation Science*, 43(23), 4322–4337.
- Preiss, B. A., & Lipsky, S. R. (1967). Fast Liquid Chromatography: An Investigation of Operating Parameters and the Separation of Nucleotides on Pellicular Ion Exchangers. *ANALYTICAL CHEMISTRY*, 39(12), 7.
- Rai, S. K., & Tewari, A. K. (2018). Dual role of drugs: Beneficial and harmful aspects. En *Synthesis of Medicinal Agents from Plants* (pp. 305–332). Elsevier.

- Ramirez, B., & Bunker, R. J. (2015). *Narco-Submarines: Specially Fabricated Vessels Used for Drug Smuggling Purposes* (p. 165). U.S. Army Foreign Military Studies Office. <https://core.ac.uk/download/pdf/70984437.pdf>
- Ramos, J.-J., González, M.-J., & Ramos, L. (2004). Miniaturised sample preparation of fatty foodstuffs for the determination of polychlorinated biphenyls. *Journal of Separation Science*, 27(7–8), 595–601.
- Rojo, M., Álvarez-Muñoz, D., Dománico, A., Foti, R., Rodriguez-Mozaz, S., Barceló, D., & Carriquiriborde, P. (2019). Human pharmaceuticals in three major fish species from the Uruguay River (South America) with different feeding habits. *Environmental Pollution*, 252, 146–154.
- Ruiz Franco, J. C. (2011). *Pioneros de la coca y la cocaína*. El Peón Espía.
- Schmidt, E. D., Tilders, F. J. H., Janszen, A. W. J. W., Binnekade, R., De Vries, T. J., & Schoffemeer, A. N. M. (1995). Intermittent cocaine exposure causes delayed and long-lasting sensitization of cocaine-induced ACTH secretion in rats. *European Journal of Pharmacology*, 285(3), 317–321.
- Scigelova, M., & Makarov, A. (2006). Orbitrap Mass Analyzer – Overview and Applications in Proteomics. *PROTEOMICS*, 6(S2), 16–21. <https://doi.org/10.1002/pmic.200600528>
- Shaffer, H. (1984). Uber coca: Freud's cocaine discoveries. *Journal of Substance Abuse Treatment*, 1(3), 205–217.
- Siegel, J. A. (Ed.). (2015). Drugs of abuse. En *Forensic chemistry: Fundamentals and applications* (pp. 54–60). John Wiley and Sons.
- Siegrist, M., & Wiegand, T. J. (2014). Cocaine. En *Encyclopedia of Toxicology* (pp. 999–1002). Elsevier.

- Sleno, L. (2012). The use of mass defect in modern mass spectrometry: Mass defect in mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 47(2), 226–236.
- Smith, R. M., & Casale, J. F. (2010). *The Mass Spectrum of Cocaine: Deuterium Labeling and MS/MS Studies*. 7(1), 27.
- Sofuoglu, M., Nelson, D., Babb, D. A., & Hatsukami, D. K. (2001). Intravenous cocaine increases plasma epinephrine and norepinephrine in humans. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 68(3), 455–459.
- Søvik, E., Cornish, J. L., & Barron, A. B. (2013). Cocaine Tolerance in Honey Bees. *PLoS ONE*, 8(5), e64920.
- Stashenko, E. E. (2009). Aspectos prácticos de la ionización con electrones en la obtención de espectros de masas y su interpretación. *Scientia Chromatographica*, 1(4), 18.
- Stashenko, E. E. (2012). GC-MS: Herramienta fundamental para el análisis de drogas de uso ilícito. *Scientia Chromatographica*, 4(1), 15–27.
- Stashenko, E. E., & Martínez, J. R. (2009). Algunos aspectos de la detección en cromatografía de gases y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Selectividad e identificación. *Scientia Chromatographica*, 1(2), 17.
- Stashenko, E. E., & Martínez, J. R. (2011). Preparación de la muestra: Un paso crucial para el análisis por GC-MS. *Scientia Chromatographica*, 3(1), 25–49.
- Stegeman, J. J., Behrendt, L., Woodin, B. R., Kubota, A., Lemaire, B., Pompon, D., Goldstone, J. V., & Urban, P. (2015). Functional characterization of zebrafish cytochrome P450 1 family proteins expressed in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1850(11), 2340–2352.

- Steigman, J. (1982). Chemistry of the alumina column. *The International Journal of Applied Radiation and Isotopes*, 33(10), 829–834.
- Stevenson, D. P. (1951). Ionization and dissociation by electronic impact. The ionization potentials and energies of formation of sec.-propyl and tert-butyl radicals. Some limitations on the method. *Discussions of the Faraday Society*, 10, 35.
- Streit, B. (1992). Bioaccumulation processes in ecosystems. *Experientia*, 48(10), 955–970.
- Streit, B. (1998). Bioaccumulation of contaminants in fish. En T. Braunbeck, D. E. Hinton, & B. Streit (Eds.), *Fish Ecotoxicology* (pp. 353–387). Birkhäuser Basel.
- Subedi, B., Mottaleb, M. A., Chambliss, C. K., & Usenko, S. (2011). Simultaneous analysis of select pharmaceuticals and personal care products in fish tissue using pressurized liquid extraction combined with silica gel cleanup. *Journal of Chromatography A*, 1218(37), 6278–6284.
- Takitane, J., Leyton, V., Andreuccetti, G., Gjerde, H., Vindenes, V., & Berg, T. (2018). Determination of cocaine, metabolites and a crack cocaine biomarker in whole blood by liquid–liquid extraction and UHPLC–MS/MS. *Forensic Science International*, 289, 165–174.
- Tan, K. S., Zhang, Y., Liu, L., Li, S., Zou, X., Zeng, W., Cheng, G., Wang, D., & Tan, W. (2021). Molecular cloning and characterization of an atypical butyrylcholinesterase-like protein in zebrafish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 255, 110590.
- Taylor, G. (1964). Disintegration of Water Drops in an Electric Field. *Proc. R. Soc. Lond. A*, 280, 383–397.

- Terry, C. E. (1915). The Harrison Anti-Narcotic Act. *American Journal of Public Health*, 5(6), 518–518.
- Togunde, O. P., Oakes, K. D., Servos, M. R., & Pawliszyn, J. (2012). Optimization of solid phase microextraction for non-lethal in vivo determination of selected pharmaceuticals in fish muscle using liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1261, 99–106.
- Unger, S. H., & Chiang, G. H. (1981). Octanol-physiological buffer distribution coefficients of lipophilic amines by reversed-phase high-performance liquid chromatography and their correlation with biological activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, 24(3), 262–270.
- UNODC. (2011). *The Transatlantic Cocaine Market* (p. 66). NACIONES UNIDAS.  
[https://www.unodc.org/documents/data-and-analysis/Studies/Transatlantic\\_cocaine\\_market.pdf](https://www.unodc.org/documents/data-and-analysis/Studies/Transatlantic_cocaine_market.pdf)
- UNODC. (2012). *Recommended methods for the Identification and Analysis of Cocaine in Seized Materials*. NACIONES UNIDAS.  
[https://www.unodc.org/documents/scientific/Cocaine\\_Manual\\_Rev\\_1.pdf](https://www.unodc.org/documents/scientific/Cocaine_Manual_Rev_1.pdf)
- UNODC. (2018). *Terminología e información sobre drogas* (3a ed.). NACIONES UNIDAS.  
[https://www.unodc.org/documents/scientific/Terminology\\_and\\_Information\\_on\\_Drugs\\_S\\_3rd\\_Edition.pdf](https://www.unodc.org/documents/scientific/Terminology_and_Information_on_Drugs_S_3rd_Edition.pdf)
- UNODC. (2022a). *Monitoreo de territorios afectados por cultivos ilícitos 2021* (p. 173). Organización de los Estados Americanos.
- UNODC. (2022b). *World Drug Report 2021*. United Nations.

- Valdés, M. E., Amé, M. V., Bistoni, M. de los A., & Wunderlin, D. A. (2014). Occurrence and bioaccumulation of pharmaceuticals in a fish species inhabiting the Suquía River basin (Córdoba, Argentina). *Science of The Total Environment*, 472, 389–396.
- Valdés, M. E., Huerta, B., Wunderlin, D. A., Bistoni, M. A., Barceló, D., & Rodriguez-Mozaz, S. (2016). Bioaccumulation and bioconcentration of carbamazepine and other pharmaceuticals in fish under field and controlled laboratory experiments. Evidences of carbamazepine metabolization by fish. *Science of The Total Environment*, 557–558, 58–67.
- Valkó, K. (2004). Application of high-performance liquid chromatography based measurements of lipophilicity to model biological distribution. *Journal of Chromatography A*, 1037(1–2), 299–310.
- van Nuijs, A. L. N., Pecceu, B., Theunis, L., Dubois, N., Charlier, C., Jorens, P. G., Bervoets, L., Blust, R., Neels, H., & Covaci, A. (2009). Cocaine and metabolites in waste and surface water across Belgium. *Environmental Pollution*, 157(1), 123–129.
- Vargas-Vargas, R. A. (2017). *Pez cebra (Danio rerio) y anestesia. Un modelo animal alternativo para realizar investigación biomédica básica*. 29(1), 86–96.  
[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2448-87712017000400086](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2448-87712017000400086)
- Von Minden, D. L., & D'Amato, N. A. (1977). Simultaneous determination of cocaine and benzoylecgonine in urine by gas-liquid chromatography. *Analytical Chemistry*, 49(13), 1974–1977.

- Wallace, J. E., Hamilton, H. E., King, D. E., Bason, D. J., Schwertner, H. A., & Harris, S. C. (1976). Gas-liquid chromatographic determination of cocaine and benzoylecgonine in urine. *Analytical Chemistry*, 48(1), 34–38.
- Wang, J., & Gardinali, P. R. (2012). Analysis of selected pharmaceuticals in fish and the fresh water bodies directly affected by reclaimed water using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 404(9), 2711–2720.
- Wang, P., & Bartlett, M. G. (1998). Collision-induced dissociation mass spectra of cocaine, and its metabolites and pyrolysis products. *Journal of Mass Spectrometry*, 33(10), 961–967.
- Weiss, R. D., & Gawin, F. H. (1988). Protracted elimination of cocaine metabolites in long-term, high-dose cocaine abusers. *The American Journal of Medicine*, 85(6), 879–880.
- Whitacre, D. M. (Ed.). (2011). Environmental Occurrence. En *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 210* (Vol. 210, p. 77). Springer New York.
- Xian, F., Hendrickson, C. L., & Marshall, A. G. (2012). High Resolution Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 84(2), 708–719.
- Yamashita, M., & Fenn, J. B. (1984). Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *The Journal of Physical Chemistry*, 88(20), 4451–4459.
- Zechmeister, L. (1946). Mikhail Tswett—The Inventor of Chromatography. *Isis*, 36(2), 108–109.
- Zhan, C.-G. (2006). Modeling Reaction Mechanism of Cocaine Hydrolysis and Rational Drug Design for Therapeutic Treatment of Cocaine Abuse. En S. P. Gupta (Ed.), *QSAR and Molecular Modeling Studies in Heterocyclic Drugs II* (Vol. 4, pp. 107–159). Springer-Verlag.

- Zhan, C.-G., Zheng, F., & Landry, D. W. (2003). Fundamental Reaction Mechanism for Cocaine Hydrolysis in Human Butyrylcholinesterase. *Journal of the American Chemical Society*, *125*(9), 2462–2474.
- Zuccato, E., Chiabrando, C., Castiglioni, S., Calamari, D., Bagnati, R., Schiarea, S., & Fanelli, R. (2005). Cocaine in surface waters: A new evidence-based tool to monitor community drug abuse. *Environmental Health*, *4*(1), 14.

## Apéndices

**Apéndice A.** Aval para manipular y utilizar especímenes de *Danio rerio* por parte del comité de ética en investigación científica de la Universidad Industrial de Santander (CEINCI-UIS).



4110

Bucaramanga, 12 de agosto de 2022

Profesora  
ELENA E. STASHENKO  
Formativo Química  
Escuela de Química  
Facultad de Ciencias

Asunto: Aval Comité de Ética proyecto “Análisis por GC/MS y LC/MS de cocaína en tejidos de peces cebra (*Danio rerio*) expuestos al alcaloide”.

Cordial Saludo,

El Comité de Ética en Investigación Científica de la Universidad Industrial de Santander (CEINCI) en reunión celebrada bajo la modalidad presencial remota el día 12 de agosto de 2022, según consta en el Acta N° 13 evaluó el proyecto del asunto y al respecto conceptúa:

En consideración a que el proyecto cumple con todos los requerimientos, el Comité de Ética acordó, por consenso, **APROBAR** el documento digital en su última versión.

De igual manera, aplicar según corresponda a la investigación, la normatividad del Sistema de Gestión Integral de la Universidad, que está disponible en el enlace: <https://www.uis.edu.co/intranet/calidad/calidad.jsp>, especialmente lo relacionado con el Manual de Gestión Integrado.

Así mismo, realizar los trámites y/o permisos necesarios para la recolección de los microorganismos o muestras requeridas para la investigación.

Se debe tener en cuenta que este proyecto es un estudio formativo y ha sido avalado para dar cumplimiento en el tiempo de capacitación de los estudiantes.

En caso de presentarse cualquiera de las siguientes circunstancias, solicitamos lo informe al correo [comitedetica@uis.edu.co](mailto:comitedetica@uis.edu.co):

- Reporte de mala práctica científica por parte de cualquier miembro del equipo investigador.
- Notificación previa de las modificaciones realizadas al protocolo, las cuales deben ir aprobadas, mediante acta, por su Pregrado.
- Reporte de cualquier eventualidad que usted considera deba conocer el CEINCI-UIS.
- Informe de avance sobre los aspectos éticos según guía e instructivo anexo. Este informe debe enviarse a la mitad del desarrollo de la investigación y al finalizar la misma según el cronograma establecido en el Formato FIN 65.
- El informe debe ser enviado al correo: [ceinci.seguimientos@uis.edu.co](mailto:ceinci.seguimientos@uis.edu.co)

**VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y EXTENSIÓN  
COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA**

Centro, Carrera 19 - calle 35 - 02, Piso 2.  
PBX: (607) 6344000 Ext. 3808, Bucaramanga, Colombia.  
E-mail: [comitedetica@uis.edu.co](mailto:comitedetica@uis.edu.co) <http://www.uis.edu.co>

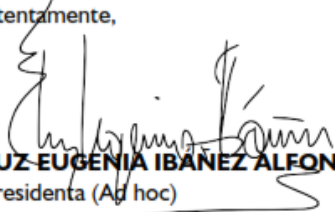


4110

Finalmente, nos permitimos señalar que, durante el proceso de seguimiento que realiza el CEINCI se verificará el cumplimiento de las consideraciones éticas.

En nombre del CEINCI-UIS le ofrecemos el apoyo que usted considere necesario, para la aplicación y salvaguarda de los asuntos éticos durante la investigación.

Atentamente,

  
**LUZ EUGENIA IBÁÑEZ ALFONSO**  
 Presidenta (Ad hoc)

  
**FRANCISCO ESPINEL CORREAL**  
 Secretario

Copia: Estudiante Sebastián Ortiz Blanco (Escuela de Química).  
 Profesor Andrés Fernando González Suárez (Escuela de Química), director del proyecto de investigación.  
 Profesor Julio Roberto Pinzón, director de la Escuela de Química.  
 Archivo Comité de Ética en Investigación Científica.

**Tabla de trazabilidad de la propuesta de investigación:**

R	Ev	C
29/07/22	12/08/22	A

**Convenciones de la tabla de trazabilidad:**

R: Remisión de documentos o respuesta del investigador.  
 Ev: Evaluación del CEINCI.  
 C: Concepto del CEINCI.  
 A: Aprobado.

Elaboró: César Hastamorir.  
 Revisó y aprobó: Francisco Espinel y Luz Eugenia Ibáñez.

**VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y EXTENSIÓN  
 COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA**

Centro, Carrera 19 - calle 35 - 02, Piso 2.  
 PBX: (607) 6344000 Ext. 3808, Bucaramanga, Colombia.  
 E-mail: [comitedetica@uis.edu.co](mailto:comitedetica@uis.edu.co) <http://www.uis.edu.co>

**Apéndice B.** Protocolos para sacrificio de los peces, minimización de los riesgos de afectación a los investigadores durante la ejecución del trabajo de grado y manejo de residuos biológicos y químicos.

**Protocolo de sacrificio del pez cebra.**

Se extraerá cada pez de la pecera con una red de tela pequeña. Se tomará firmemente con la mano y se golpeará en la cabeza para aturdirlo como lo sugiere el “Manual de sacrificio humano de animales” de la Real Academia para la Prevención de la Crueldad Animal (RSPCA), del Reino Unido. Una vez aturdido el pez, se procederá a sacrificarlo por destrucción cerebral inmediata. La destrucción cerebral inmediata se hará con la inserción de una aguja metálica directamente en el cerebro del pez. Este método es catalogado como aceptable para el sacrificio de peces pequeños en estado de aturdimiento, según Baumans *et. al.* en el reporte “Recomendaciones para la eutanasia de animales experimentales” de la Comisión Europea, 1997. Una vez sacrificado el pez, se depositará en un tubo Falcon™ de 15 mL y se almacenará a -20 °C.

**Protocolo para minimizar los riesgos de afectación en los investigadores durante la ejecución del trabajo de grado.**

El investigador que realizará los experimentos, usará los elementos básicos de protección personal (EPP) de Seguridad y Salud Ocupacional, tales como, gafas de protección ocular, máscara de protección respiratoria con filtro para vapores orgánicos y filtro para material particulado, guantes de nitrilo y traje o bata que lo proteja del contacto directo con las sustancias químicas. Estos elementos de protección personal, son sugeridos en las “Directrices para el manejo y eliminación segura de los productos químicos utilizados en la fabricación ilícita de drogas” de la Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (UNODC), Estados Unidos.

Todos los experimentos se llevarán a cabo dentro de una cabina extractora de gases con vidrio de seguridad contra salpicaduras, ubicada en el laboratorio Marie CURIE, en el CENIVAM-UIS. Las sustancias controladas que se utilizarán en este trabajo de grado mantendrán un registro de cantidad utilizada para contar con soporte al suministro, administración y disposición final, tal como lo plantea la “Guía para la gestión integral de sustancias sometidas a fiscalización” del Ministerio de Salud, Colombia.

### **Protocolo de manejo de residuos biológicos y químicos.**

En cada área del centro de investigación donde se generan residuos peligrosos se ubican recipientes desechables y reutilizables perfectamente identificados, de acuerdo con el código de colores establecido en el Decreto 0351 del 2014 y el Sistema de Seguridad y Salud en el trabajo por parte de la Universidad Industrial de Santander. Las muestras de tejido biológico no tratadas, serán almacenadas temporalmente en el laboratorio Marie CURIE, en el CENIVAM-UIS, dentro de un congelador a -20 °C hasta su utilización. El etiquetado de los recipientes que contengan residuos biológicos y químicos cumplirá con lo planteado en el Sistema Globalmente Armonizado (GHS) de clasificación y etiquetado de productos químicos.

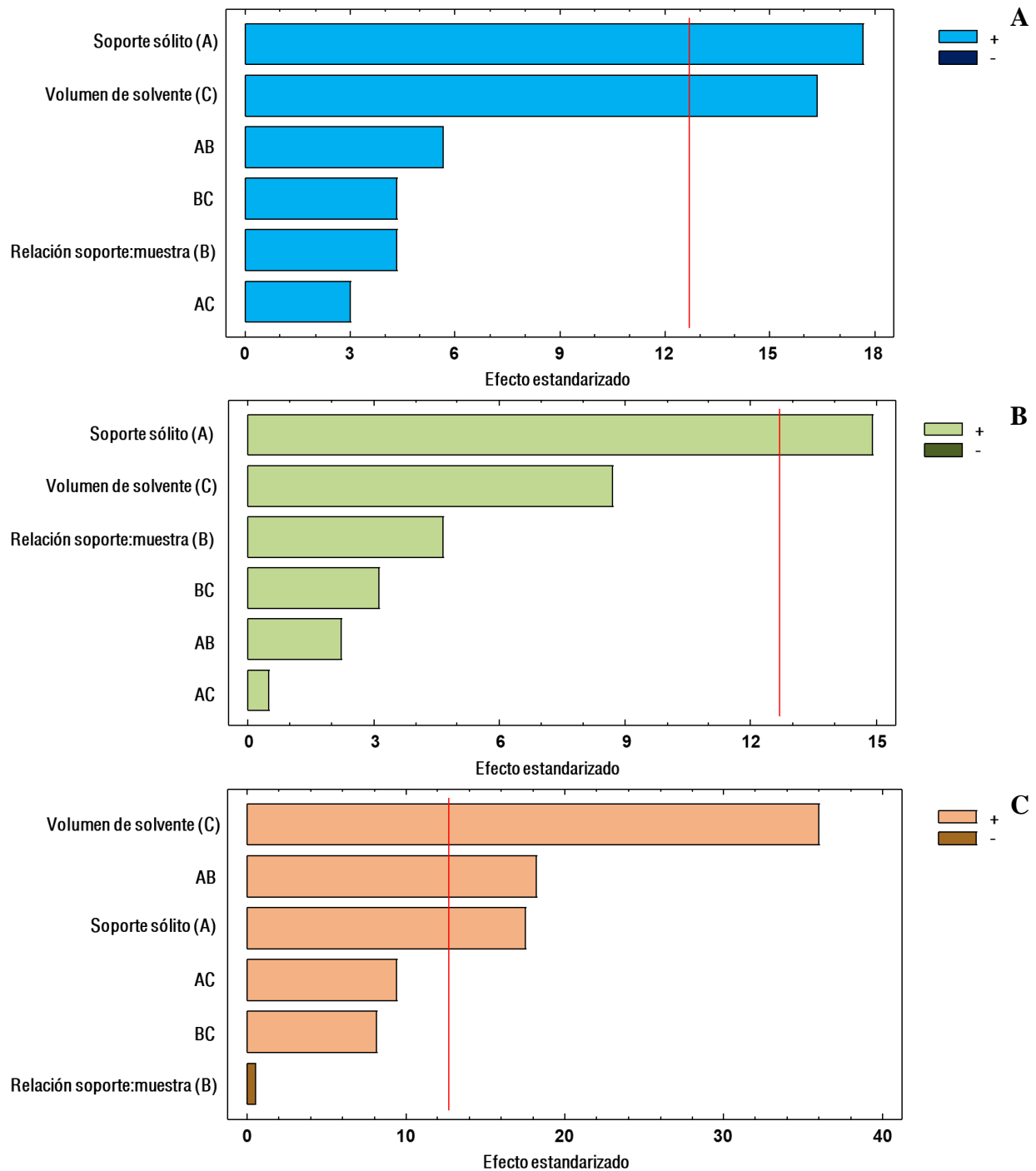
Los residuos de tejido biológico generados en este trabajo de grado se dispondrán en bolsas de color rojo, y el recipiente plástico que contiene este tipo de residuos será identificado con el símbolo de riesgo biológico.

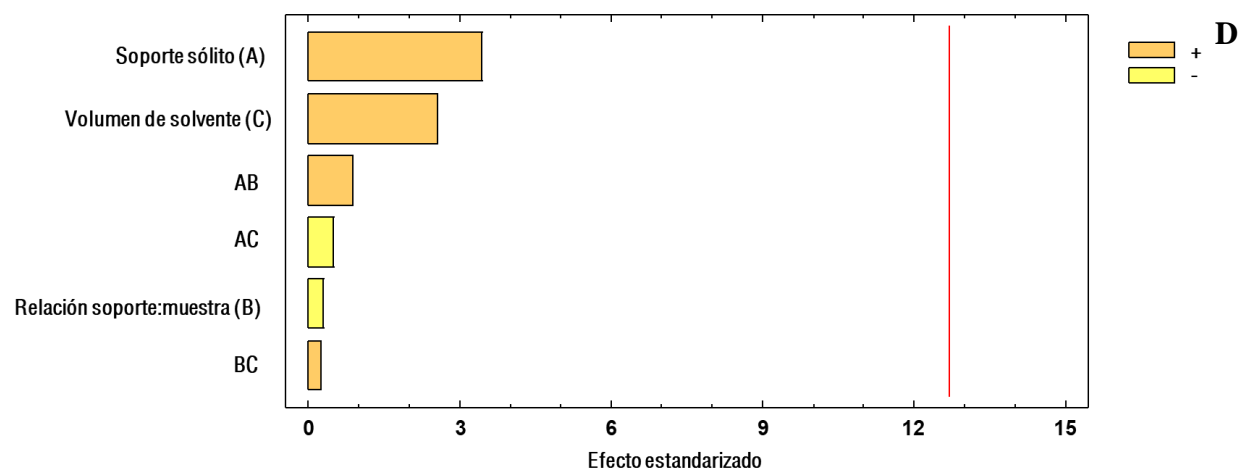
El agua de las peceras se tratará como un residuo químico. Los residuos químicos, serán desechados en recipientes adecuados para su almacenaje. Los recipientes que contienen sustancias químicas serán etiquetados con el nombre de la sustancia y su reactividad. Cuando el recipiente se llene el 75 % de su capacidad total, será desplazado al cuarto de residuos químicos de CROM-MASS, ubicado en el CENIVAM-UIS, hasta su recolección y disposición final.

Los residuos químicos y biológicos serán recogidos por una empresa externa (SANDESOL), la cual cumple con todos los requerimientos establecidos en el Decreto 0351 del 2014 y el Decreto 1609 del 2002, y con las normas: ISO 9001:2008, ISO 14001:2004, ISO 45001:2018 con Bureau Veritas y Calificación RUC del Consejo Colombiano de Seguridad. La empresa se encargará de realizar el transporte y la disposición final bajo los procedimientos adecuados.

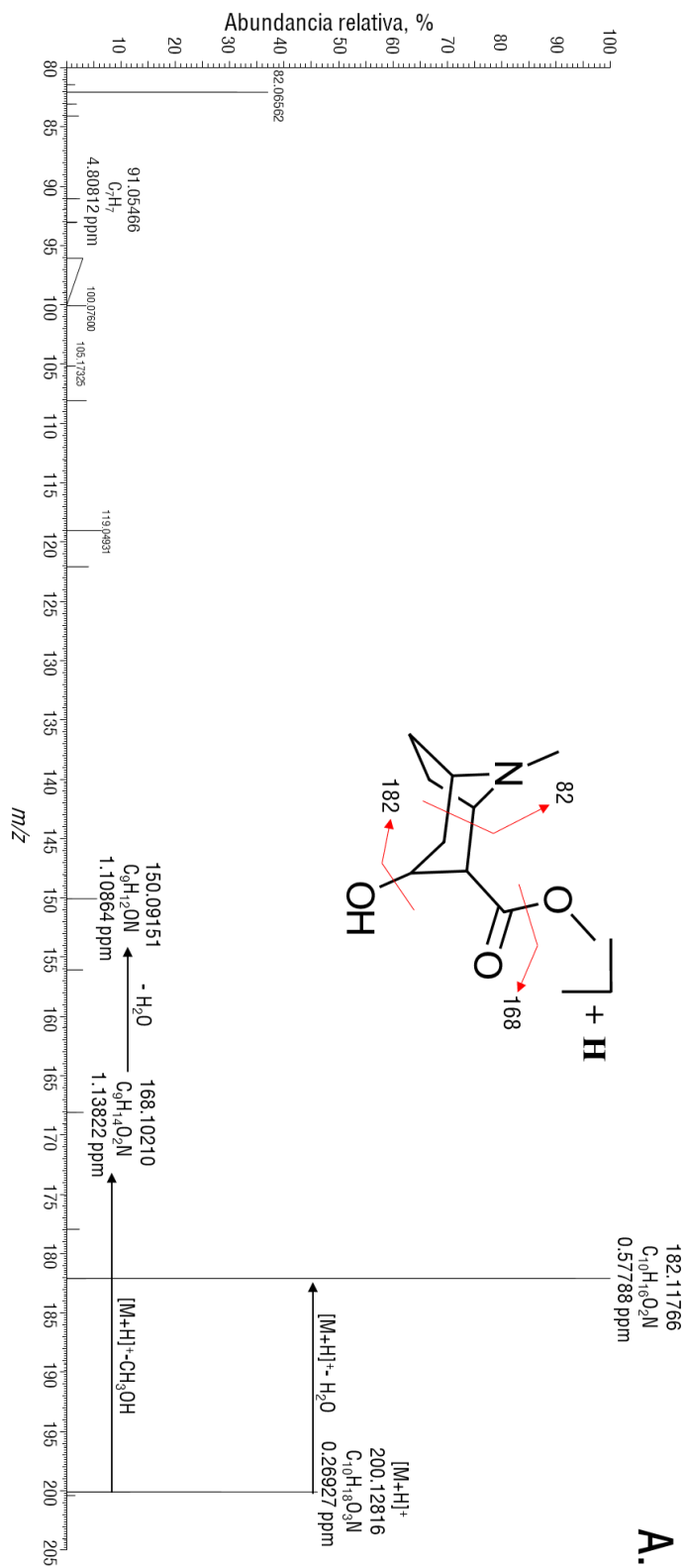
El investigador que manipule los residuos químicos y material biológico, usará los elementos básicos de protección personal (EPP) de Seguridad y Salud Ocupacional, tales como, gafas de protección ocular, máscara de protección respiratoria con filtro para vapores orgánicos y filtro para material particulado, guantes de nitrilo y traje o bata que lo proteja del contacto directo con los residuos.

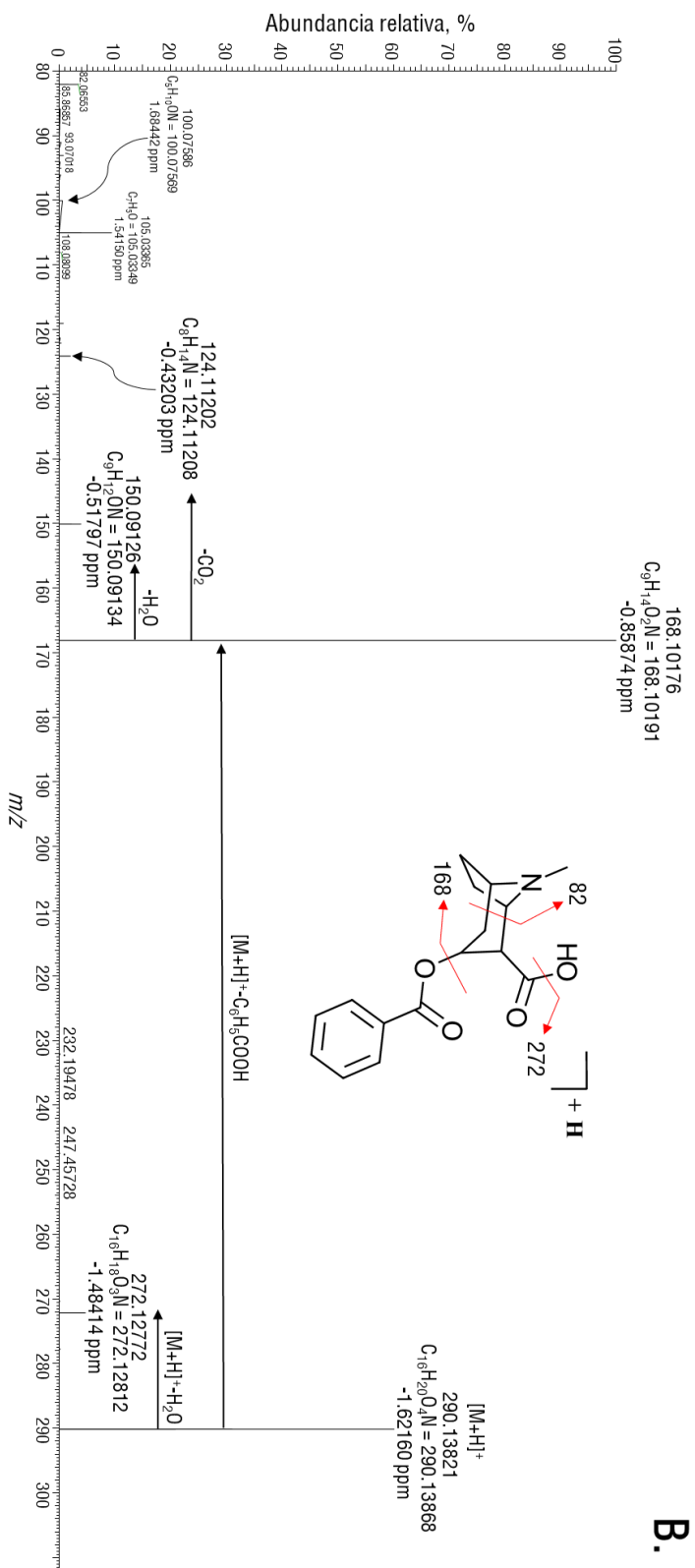
**Apéndice C.** Diagramas de Pareto para la respuesta combinada (A) de cocaína (B), benzoilecgonina (C) y ecgonina metil éster (D), obtenidos del análisis de varianza (ANOVA) del diseño experimental MSPD.

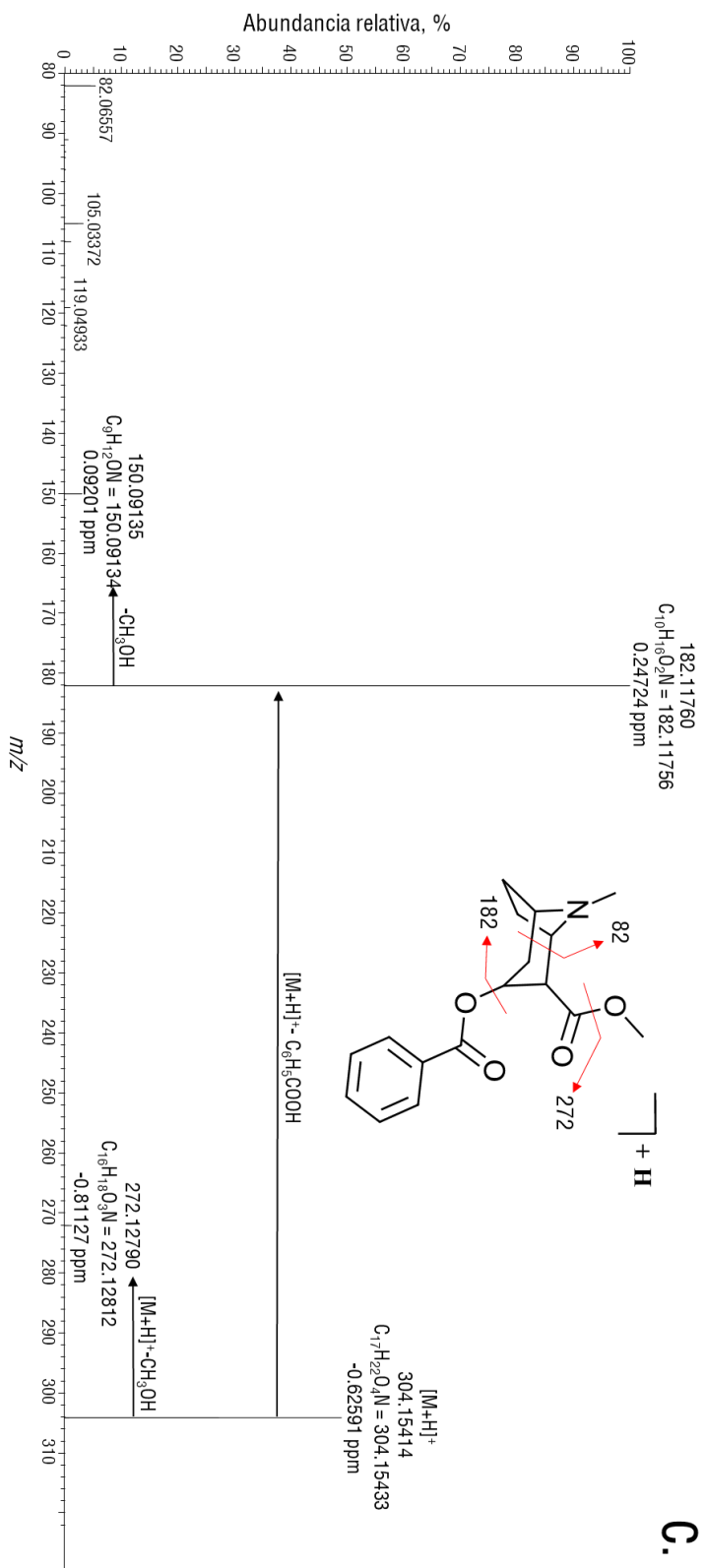




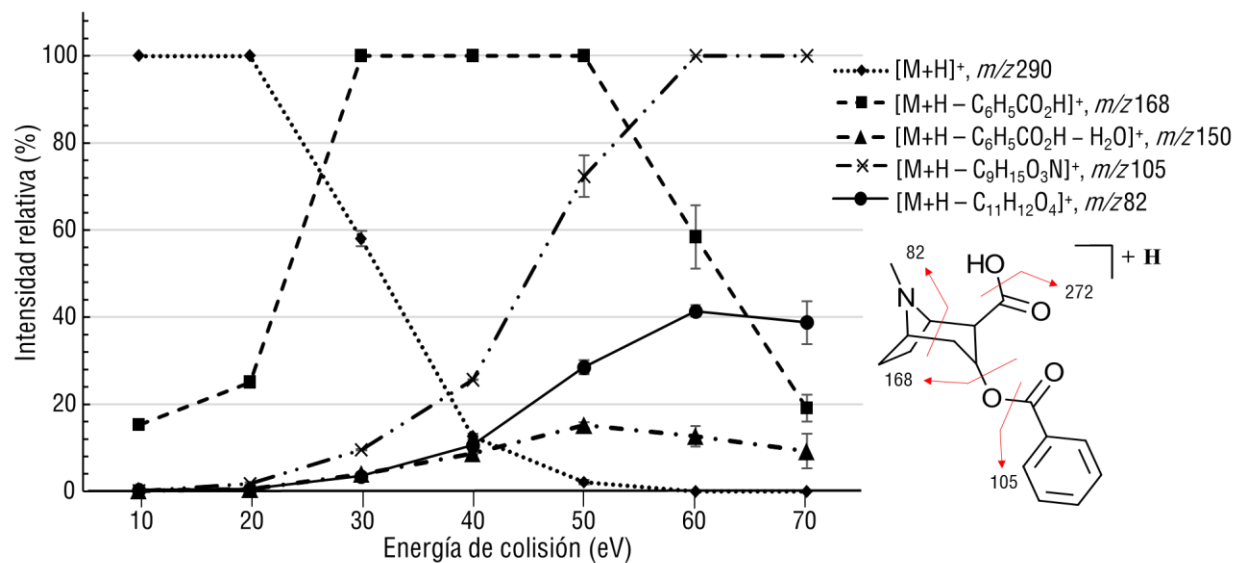
**Apéndice D.** Fragmentogramas de masas de ecgonina metil éster (**A**), benzoilecgonina (**B**) y cocaína (**C**) obtenidos por LC/MS, operado en modo SIM de los iones  $[M+H]^+$ , con energías de colisión aplicadas de 50, 30 y 30 eV, respectivamente.



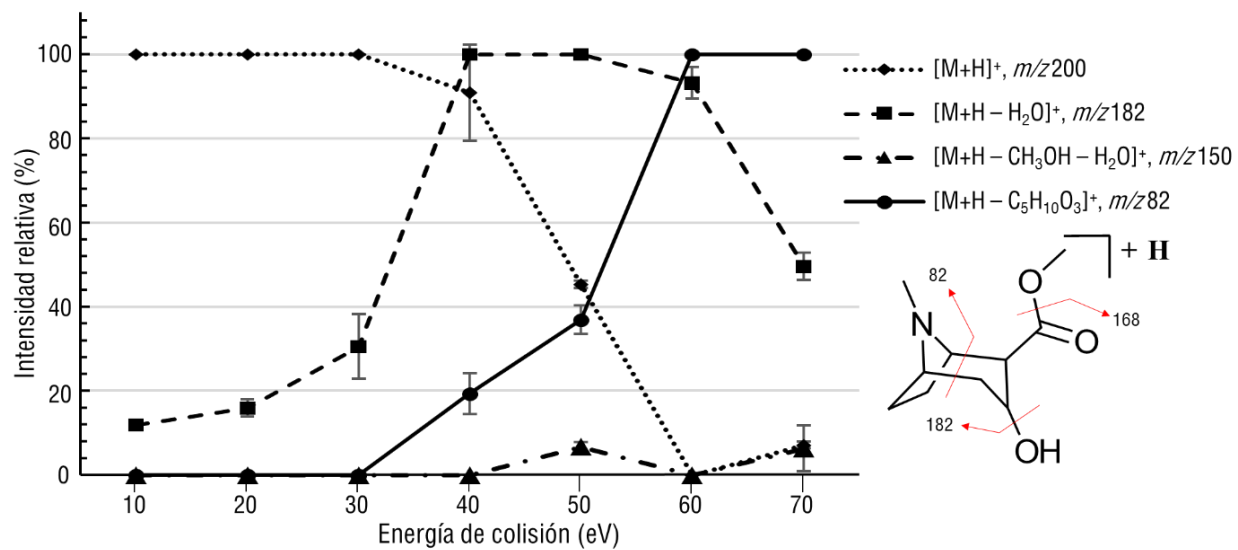




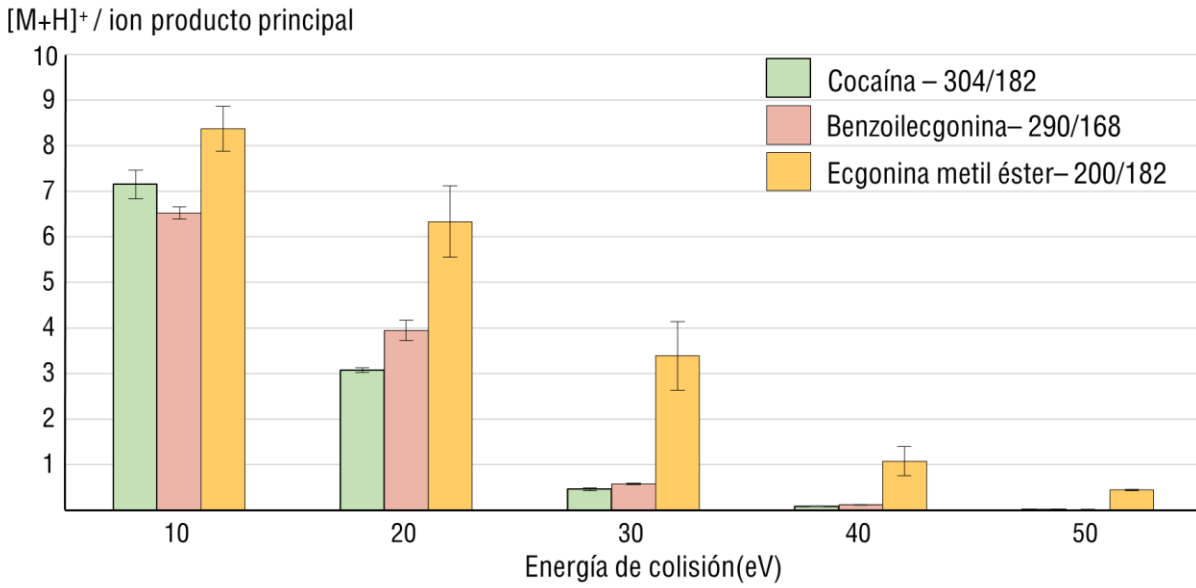
**Apéndice E.** Relación entre la intensidad relativa y la energía de colisión para  $[M+H]^+$  y los cuatro iones-producto:  $[M+H - C_6H_5CO_2H]^+$ ,  $[M+H - C_6H_5CO_2H - H_2O]^+$ ,  $[M+H - C_9H_{15}O_3N]^+$ , y  $[M+H - C_{11}H_{12}O_4]^+$  en el caso de la benzoilecgonina. Obtenido mediante LC/MS (modo SIM).



**Apéndice F.** Relación entre la intensidad relativa y la energía de colisión para  $[M+H]^+$  y los tres iones-producto:  $[M+H - H_2O]^+$ ,  $[M+H - CH_3OH - H_2O]^+$ , y  $[M+H - C_5H_{10}O_3]^+$  en el caso de la ecgonina metil éster. Obtenido mediante LC/MS (modo SIM).



**Apéndice G.** Efecto de la energía aplicada en la cámara de colisiones sobre la relación de intensidades del ion  $[M+H]^+$  y el ion-fragmento principal de la cocaína, benzoilecgonina y ecgonina metil éster. Obtenido mediante LC/MS (modo SIM).



**Apéndice H.** Patrones isotópicos de ecgonina metil éster (**A**), benzoilecgonina (**B**) y cocaína (**C**) obtenidos por LC/MS, operado en modo *full scan* de los iones  $[M+H]^+$ .

