

UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

**DETECCIÓN ELECTROQUÍMICA DE  $\alpha$ -  
Pirrolidinopentiofenona ( $\alpha$ -PVP) Y 3,4-  
Metilendioximetanfetamina (MDMA) MEDIANTE  
UN BIOSENSOR ELECTROQUÍMICO BASADO  
EN LA ISOENZIMA 2D6 DEL CITOCROMO  
P450**

Andrés Felipe Lugo Vargas

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Medicina, Departamento de Toxicología  
Bogotá D.C., Colombia  
2022



# **DETECCIÓN ELECTROQUÍMICA DE $\alpha$ - Pirrolidinopentiofenona ( $\alpha$ -PVP) Y 3,4- Metilendioxitmetanfetamina (MDMA) MEDIANTE UN BIOSENSOR ELECTROQUÍMICO BASADO EN LA ISOENZIMA 2D6 DEL CITOCROMO P450**

**Andrés Felipe Lugo Vargas**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:  
**Magister en Toxicología**

Director:

DSc. Jaime Fernando Martínez Suárez

Codirector (a):

MSc. Esp. William Giovanni Quevedo Buitrago

Codirector (a):

MSc. Diana Carolina Chaves Silva

Línea de investigación: análisis toxicológico de laboratorio en sustancias psicoactivas  
Grupo de investigación en sustancias psicoactivas

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Medicina, Departamento de Toxicología  
Bogotá D.C., Colombia  
2022

*A mis padres y hermana,  
los motores de mi vida.*

## **Declaración de obra original**

Yo declaro lo siguiente:

He leído el Acuerdo 035 de 2003 del Consejo Académico de la Universidad Nacional. «Reglamento sobre propiedad intelectual» y la Normatividad Nacional relacionada al respeto de los derechos de autor. Esta disertación representa mi trabajo original, excepto donde he reconocido las ideas, las palabras, o materiales de otros autores.

Cuando se han presentado ideas o palabras de otros autores en esta disertación, he realizado su respectivo reconocimiento aplicando correctamente los esquemas de citas y referencias bibliográficas en el estilo requerido.

He obtenido el permiso del autor o editor para incluir cualquier material con derechos de autor (por ejemplo, tablas, figuras, instrumentos de encuesta o grandes porciones de texto).

Por último, he sometido esta disertación a la herramienta de integridad académica, definida por la universidad.

---

Nombre: Andrés Felipe Lugo Vargas

Fecha: 23 de noviembre de 2021

## Agradecimientos

A Dios por ser mi guía.

A mis padres y hermana por su amor, paciencia e incondicional apoyo.

A la Universidad Nacional de Colombia por abrirme sus puertas y permitirme cumplir este sueño.

A la Maestría en Toxicología por la formación recibida.

Al grupo de investigación en sustancias psicoactivas por alimentar mi interés por la investigación.

A la Universidad de la Amazonia por ser esa casa de puertas siempre abiertas.

Al Grupo de Investigación en Productos Naturales Amazónicos (GIPRONAZ) y el semillero de investigación en electroquímica de sistemas biológicos, moléculas orgánicas pequeñas y polímeros por permitir el desarrollo del proyecto en sus instalaciones.

Al profesor Jaime Fernando Martínez por compartir su conocimiento y experiencia, y guiarme en el desarrollo del proyecto.

Al profesor William Giovanni Quevedo por creer desde el principio en este proyecto y hacer posible su realización.

A la profesora Diana Carolina Chaves por su guía.

A Johanna Umaña, mas que compañera de formación una gran amiga.

A la familia Herrera Vargas por el apoyo incondicional.

A Juan Carlos Herrera por su apoyo desde la distancia.

A Sandra Herrera y Oliver Cárdenas por su apoyo desinteresado.

## Resumen

### DETECCIÓN ELECTROQUÍMICA DE $\alpha$ -Pirrolidinopentiofenona ( $\alpha$ -PVP) Y 3,4-Metilendioximetanfetamina (MDMA) MEDIANTE UN BIOSENSOR ELECTROQUÍMICO BASADO EN LA ISOENZIMA 2D6 DEL CITOCROMO P450

En el presente estudio se exploró mediante la técnica de voltamperometría diferencial de pulsos (VDP) la respuesta electroquímica de  $\alpha$ -pirrolidinopentiofenona ( $\alpha$ -PVP) y 3,4-metilendioximetanfetamina (MDMA) frente a un biosensor electroquímico basado a en la isoforma CYP2D6 del citocromo P450 unida a través de enlace covalente a la superficie de carbono de electrodos serigrafados (Electrodo de trabajo: C, electrodo auxiliar: C, electrodo de referencia: Ag/AgCl). El biosensor fue caracterizado mediante cupla ferro/ferricianuro de potasio y pruebas de inhibición con quinidina. Como resultado se evidenció una respuesta de los analitos frente al biosensor electroquímico relacionada con la actividad enzima-sustrato, con una respuesta directamente proporcional y con tendencia lineal entre la concentración del analito y la corriente de pico catódico; los límites de detección y cuantificación obtenidos para el analito MDMA fueron 0,0085  $\mu\text{M}$  (1,64 ng/mL) y 0,028  $\mu\text{M}$  (5,41 ng/mL) respectivamente, para el analito  $\alpha$ -PVP los límites de detección y cuantificación fueron 0,0099  $\mu\text{M}$  (2,2 ng/mL) y 0,033  $\mu\text{M}$  (7,6 ng/mL), respectivamente. Finalmente se estudió la interferencia generada por otra especie diferente al analito de interés en matrices binarias ( $\alpha$ -PVP +MDMA,  $\alpha$ -PVP + cafeína y MDMA + cafeína) donde se observó que la detección de ambos analitos de interés en una misma matriz no fue posible, sin embargo, la presencia de cafeína no representó una interferencia para el análisis de MDMA.

**Palabras clave:** electroquímica, Técnicas biosensibles, Análisis Químico, drogas de calle, drogas de diseño, narcóticos.

## Abstract

### **ELECTROCHEMICAL DETECTION OF $\alpha$ -Pyrrolidinopentiophenone ( $\alpha$ -PVP) AND 3,4-Methylenedioxyamphetamine (MDMA) USING AN ELECTROCHEMICAL BIOSENSOR BASED ON CYTOCHROME P450 ISOENZYME 2D6**

In this study, the electrochemical response of  $\alpha$ -Pyrrolidinopentiophenone ( $\alpha$ -PVP) and 3,4-Methylenedioxyamphetamine (MDMA) was explored using differential pulse voltammetry against an electrochemical biosensor based on the CYP2D6 isoform of cytochrome P450 bound via covalent bond to the carbon surface of screen-printed electrodes (Working electrode: C, auxiliary electrode: C, reference electrode: Ag/AgCl). The biosensor was characterized by potassium ferro/ferricyanide couple and quinidine inhibition tests. A response of the analytes to the electrochemical biosensor related to the enzyme-substrate activity could be evidenced, with a directly proportional response and with a linear trend between the concentration of the analyte and the cathodic peak current; the detection and quantification limits obtained for the MDMA analyte were 0.0085  $\mu$ M (1,64 ng/mL) and 0.028  $\mu$ M (5,41 ng/mL) respectively, for the  $\alpha$ -PVP analyte the detection and quantification limits were 0.0099  $\mu$ M (2,2 ng/mL) and 0.033  $\mu$ M (7,6 ng/mL), respectively. Finally, the interference generated by another species different from the analyte of interest in binary matrices ( $\alpha$ -PVP + MDMA,  $\alpha$ -PVP + caffeine and MDMA + caffeine) was studied, where it was observed that the detection of both analytes of interest in the same matrix did not was possible, however, the presence of caffeine did not represent an interference for the analysis of MDMA.

**Keywords:** Electrochemistry, Biosensing Techniques, Chemical Analysis, Street drugs, designer drugs, narcotics.

## Contenido

<b>1. Marco teórico .....</b>	<b>22</b>
<b>1.1. Catinonas sintéticas .....</b>	<b>22</b>
1.1.1. Estructura química .....	25
1.1.2. Toxicología de las catinonas sintéticas .....	25
1.1.2.1. Toxicocinética .....	26
1.1.2.1.1. Absorción .....	26
1.1.2.1.2. Distribución .....	27
1.1.2.1.3. Biotransformación .....	28
1.1.2.1.4. Eliminación .....	29
1.1.2.2. Toxicodinamia .....	29
<b>1.2. Anfetaminas .....</b>	<b>30</b>
1.2.1. Estructura química .....	32
1.2.2. Toxicología de las anfetaminas .....	33
1.2.2.1. Toxicocinética .....	33
1.2.2.1.1. Absorción .....	33
1.2.2.1.2. Distribución .....	34
1.2.2.1.3. Biotransformación .....	34
1.2.2.1.4. Eliminación .....	36
1.2.2.2. Toxicodinamia .....	36
<b>1.3. Panorama actual de las anfetaminas y catinonas sintéticas .....</b>	<b>37</b>
<b>1.4. Técnicas electroquímicas .....</b>	<b>40</b>
1.4.1. La celda electroquímica .....	40
1.4.2. Voltamperometría .....	42
1.4.2.1. Voltamperometría cíclica (VC) .....	43
1.4.2.2. Voltamperometría diferencial de pulsos (VDP) .....	43
<b>1.5. Citocromo P450 .....</b>	<b>44</b>
1.5.1. Clasificación y nomenclatura del citocromo P450 .....	47
<b>1.6. Biosensores electroquímicos .....</b>	<b>48</b>
1.6.1. Biosensores enzimáticos de primera generación: .....	49
1.6.2. Biosensores enzimáticos de segunda generación: .....	50
1.6.3. Biosensores enzimáticos de tercera generación: .....	51
<b>1.7. Métodos de inmovilización de enzimas sobre la superficie del electrodo. ....</b>	<b>52</b>
1.7.1. Adsorción: .....	52
1.7.2. Unión covalente: .....	52
1.7.3. Atrapamiento/encapsulamiento: .....	53
1.7.4. Reticulación/entrecruzamiento: .....	54
<b>1.8. Unión covalente mediante electrografting .....</b>	<b>55</b>

<b>2. Justificación.....</b>	<b>59</b>
<b>3. Objetivos.....</b>	<b>60</b>
<b>3.1. Objetivo general.....</b>	<b>60</b>
<b>3.2. Objetivos específicos.....</b>	<b>60</b>
<b>4. Materiales y equipos.....</b>	<b>61</b>
<b>4.1. Materiales.....</b>	<b>61</b>
<b>4.2. Equipos.....</b>	<b>61</b>
<b>5. Métodos.....</b>	<b>63</b>
<b>5.1. Preparación del biosensor electroquímico.....</b>	<b>63</b>
<b>5.2. Optimización de parámetros experimentales.....</b>	<b>65</b>
<b>5.3. Caracterización electroquímica.....</b>	<b>66</b>
5.3.1. Caracterización a través de la cupla Ferrocianuro/Ferricianuro de potasio.....	66
5.3.2. Caracterización con inhibidor quinidina.....	66
<b>5.4. Respuesta electroquímica del biosensor enzimático frente a <math>\alpha</math>-PVP y MDMA</b>	<b>67</b>
<b>5.5. Evaluación de efecto de adulterantes en la respuesta electroquímica del biosensor frente a <math>\alpha</math>-PVP y MDMA.....</b>	<b>68</b>
<b>6. Resultados y discusión.....</b>	<b>69</b>
<b>6.1. Preparación del biosensor.....</b>	<b>69</b>
<b>6.2. Caracterización electroquímica.....</b>	<b>71</b>
6.2.1. Caracterización a través de la cupla Ferrocianuro/Ferricianuro de potasio.....	71
6.2.1. Prueba de inhibición con quinidina.....	76
<b>6.3. Optimización de parámetros experimentales en la respuesta voltamperométrica de C-SPE-CYP2D6.....</b>	<b>78</b>
<b>6.4. Influencia del pH del electrolito de soporte.....</b>	<b>80</b>
<b>6.5. Respuesta electroquímica del biosensor enzimático frente a <math>\alpha</math>-PVP y MDMA</b>	<b>91</b>
<b>6.6. Capacidad de detección y cuantificación del biosensor enzimático frente a <math>\alpha</math>-PVP y MDMA.....</b>	<b>95</b>

---

<b>6.7. Análisis de interferentes .....</b>	<b>99</b>
<b>7. Conclusiones, Impacto, recomendaciones y limitaciones .....</b>	<b>103</b>
<b>8. Fuente de financiación.....</b>	<b>106</b>

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Parámetros tenidos en cuenta en la optimización y rango de valores evaluados. .	65
<b>Tabla 2.</b> Matrices binarias estudiadas. ....	68
<b>Tabla 3.</b> Porcentaje de inhibición a diferentes concentraciones de quinidina. ....	78
<b>Tabla 4.</b> Optimización de parámetros: amplitud de pulso (V), tiempo de pulso (s) y tiempo de paso de voltaje (s). ....	80
<b>Tabla 5.</b> Error relativo en la respuesta electroquímica de analitos en matrices binarias. ..	102

## Índice de graficas

<b>Gráfica 1.</b> Electrorreducción de función diazonio mediante voltamperometría cíclica (ventana de potencial: 800 a – 400 mV; velocidad de barrido: 200 mV s <sup>-1</sup> ).....	70
<b>Gráfica 2.</b> Electrorreducción de nitrobenzeno a aminobenceno mediante voltamperometría cíclica (Ventana de potencial: 0 a -1700 mV; velocidad de barrido: 200 mV s <sup>-1</sup> ).....	71
<b>Gráfica 3.</b> Voltamperogramas cíclicos registrados en una solución de PBS 0,05 M (pH 7) que contiene 0,05 M de K <sub>4</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]/ K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ] + KCl 0,1 M con C-SPE (línea negra), C-SPE-NO <sub>2</sub> (línea azul), C-SPE-NH <sub>2</sub> (línea verde) y C-SPE-CYP2D6 (línea roja); (Ventana de potencial: -1000 a 1000 mV; velocidad de barrido: 200 mV s <sup>-1</sup> ).....	73
<b>Gráfica 4.</b> CVs de C-SPE-CYP2D6 en solución 0,05M de PBS pH7 (ventana de potencial: -1000 a 1000 mV; velocidad de barrido: 200 mV s <sup>-1</sup> ).....	75
<b>Gráfica 5.</b> VDPs de C-SPE-CYP2D6 frente a diferentes concentraciones de quinidina (Amplitud de pulso: 200 mV, Tiempo de pulso: 0,12 s, Tiempo de paso de voltaje: 0,5 s).77	
<b>Gráfica 6.</b> Optimización de parámetros: (a) Amplitud de pulso (V), (b) Tiempo de pulso (s) y (c) Tiempo de paso de voltaje (s). Respuesta voltamperométrica del biosensorelectroquímico frente a cambios en los parámetros optimizados (parte izquierda de la gráfica) y relación altura de pico – valores del parámetro evaluado (parte derecha de la gráfica).....	79
<b>Gráfica 7.</b> Influencia del pH de solución buffer fosfato en la respuesta electroquímica de C-SPE-CYP2D6. (a) VDPs (Amplitud de pulso: 200 mV, Tiempo de pulso: 0,12 s, Tiempo de paso de voltaje: 0,5 s) (b) relación pH-corrientes de pico catódico presentado en un rango de potencial de 0 a -1000 mV.....	81
<b>Gráfica 8.</b> ΔE (mV) vs pH de solución PBS.....	81
<b>Gráfica 9.</b> Influencia del pH de solución buffer fosfato en la respuesta electroquímica de C-SPE-CYP2D6 frente a α-PVP 0,5μM (a y b) y MDMA 0,5μM (c y d). (a y c) VDPs (Amplitud de pulso: 200 mV, Tiempo de pulso: 0,12 s, Tiempo de paso de voltaje: 0,5 s) (b y d) relación pH-corrientes de pico catódico presentado en un rango de potencial de 0 a -1000 mV. ....	83
<b>Gráfica 10.</b> VDPs bajo condiciones optimizadas tomados a solución buffer fosfato pH 8 antes (línea azul) y después de aplicación de N <sub>2</sub> (línea negra). ....	87
<b>Gráfica 11.</b> Cambio en la respuesta electroquímica del sistema C-SPE-CYP2D6 en buffer fosfato pH 8 en ambientes con flujo (línea negra) y sin flujo (línea discontinua roja) de N <sub>2</sub> . VDP bajo condiciones optimizadas. ....	88
<b>Gráfica 12.</b> VDPs de C-SPE-CYP2D6 en buffer fosfato pH 8 en barrido de oxidación (línea azul) y reducción (línea negra), bajo condiciones anaerobias. ....	89
<b>Gráfica 13.</b> VDPs de C-SPE-CYP2D6 frente a diferentes concentraciones de MDMA (Amplitud de pulso: 200 mV, Tiempo de pulso: 0,12 s, Tiempo de paso de voltaje: 0,5 s).94	
<b>Gráfica 14.</b> VDPs de C-SPE-CYP2D6 frente a diferentes concentraciones de α-PVP (Amplitud de pulso: 200 mV, Tiempo de pulso: 0,12 s, Tiempo de paso de voltaje: 0,5 s).95	
<b>Gráfica 15.</b> I <sub>2</sub> -I <sub>1</sub> (μA) vs Concentración de MDMA (μM).....	96
<b>Gráfica 16.</b> I <sub>2</sub> -I <sub>1</sub> (μA) vs Concentración de α-PVP (μM). ....	97

**Gráfica 17.** VDPs de matrices binarias: (a) MDMA 0,05  $\mu\text{M}$  +  $\alpha$ -PVP 0,05  $\mu\text{M}$ ; (b) MDMA 0,05  $\mu\text{M}$  + Cafeína 5mM; (c)  $\alpha$ -PVP 0,05  $\mu\text{M}$  + Cafeína 5mM. .... 101

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Principales moléculas activas de las hojas de Khat ( <i>Catha edulis</i> ). Tomado de (7). .....	22
<b>Figura 2.</b> Estructura química de las catinonas sintéticas más consumidas en la primera década de los 2000. Tomado de (7). .....	24
<b>Figura 3.</b> Diferencias estructurales entre A: fenetilamina, B: Anfetamina, C: Catinona y D: Catinona sintética. Tomado de (7). .....	25
<b>Figura 4.</b> Similitud estructural entre anfetaminas y los neurotransmisores dopamina y norepinefrina. Adaptado de (46). .....	32
<b>Figura 5.</b> Formas isoméricas de 3,4-metilendioximetanfetamina. Adaptado de (49). .....	33
<b>Figura 6.</b> Mecanismo de biotransformación de MDMA. Adaptado de (38). .....	35
<b>Figura 7.</b> Componentes de un sistema de tres electrodos convencionales (a) y de un electrodo serigrafiado (b). Fuente: autor. ....	41
<b>Figura 8.</b> Etapas del proceso de fabricación electrodos serigrafiados. Adaptado de (59). ..	42
<b>Figura 9.</b> Voltamperometría cíclica: a) La forma de la onda del potencial aplicado durante un experimento típico de voltamperometría cíclica. En este caso el potencial inicial, $E_i$ , es 0,5 V, el potencial final, $E_f$ , es -500 mV, y la velocidad de barrido, $v$ , es de 100 mV/s. b) Un voltamograma cíclico típico producido por la aplicación de la forma de onda de potencial. Tomado de (65). .....	43
<b>Figura 10.</b> Voltamperometría diferencial de pulsos: (a) La forma de la onda del potencial aplicado durante un experimento típico de voltamperometría diferencial de pulsos. (b) Un voltamperograma diferencial de pulsos típico producido por la aplicación de la forma de onda de potencial. Adaptado de (61) .....	44
<b>Figura 11.</b> Similitud estructural entre protoporfirina IX y grupo hemo. ....	45
<b>Figura 12.</b> Ciclo catalítico del citocromo P450. Adaptado de (69). .....	46
<b>Figura 13.</b> Sistema de nomenclatura de genes CYP tomando como ejemplo CYP2D6. Adaptado de (72). ....	47
<b>Figura 14.</b> Composición y funcionamiento del biosensor enzimático basado en CYP2D6 empleado en el presente estudio. Fuente: autor. ....	49
<b>Figura 15.</b> Representación gráfica del funcionamiento general de un biosensor de primera generación. Adaptado de (56). .....	50
<b>Figura 16.</b> Representación gráfica del funcionamiento general de un biosensor de segunda generación. Adaptado de (56). .....	51
<b>Figura 17.</b> Representación gráfica del funcionamiento general de un biosensor de tercera generación. Adaptado de (56). .....	51
<b>Figura 18.</b> Inmovilización de enzima por método de adsorción. Adaptado de (56). .....	52
<b>Figura 19.</b> Inmovilización de enzima por método de unión covalente. Adaptado de (56). ..	53
<b>Figura 20.</b> Inmovilización de enzima por método de atrapamiento/encapsulamiento. Adaptado de (56). ....	54
<b>Figura 21.</b> Inmovilización de enzima por método de reticulación/entrecruzamiento. Adaptado de (56). ....	55

---

<b>Figura 22.</b> Pasos de la funcionalización de electrodo a partir de sales de diazonio. Adaptado de (84). .....	56
<b>Figura 23.</b> Reducción electroquímica de grupos nitro (NO <sub>2</sub> ) a grupos amino (NH <sub>2</sub> ). Adaptado de (84,85). .....	57
<b>Figura 24.</b> Mecanismo de unión de CYP2D6 a superficie de electrodo mediado por activadores EDC y NHS. Adaptado de (84). .....	58
<b>Figura 25.</b> Stand de medida voltamperométrico 797 VA Computrace con accesorios para uso de electrodos serigrafiados. Fuente: autor.....	62
<b>Figura 26.</b> Fase 1 y 2 de la preparación del biosensor electroquímico. Fuente: autor. ....	63
<b>Figura 27.</b> Fase 3 de la preparación del biosensor electroquímico. Fuente: autor. ....	64
<b>Figura 28.</b> Representación de ocupación de espacios de transferencia electrónica en la superficie de electrodo de trabajo de plataformas C-SPE-NO <sub>2</sub> , C-SPE-NH <sub>2</sub> y C-SPE-CYP2D6. Fuente: autor. ....	74
<b>Figura 29.</b> Participación del oxígeno en actividad catalítica del citocromo P450. Adaptado de (105).....	85
<b>Figura 30.</b> O-desmetilación de MDMA por vía electroquímica como resultado de la interacción con C-SPE-CYP2D6. Fuente: autor.....	92
<b>Figura 31.</b> Posibles productos resultantes de la interacción del biosensor electroquímico C-SPE-CYP2D6 con $\alpha$ -PVP. Fuente: autor. ....	93

---

## Índice de ecuaciones

<b>Ecuación 1.</b> Mecanismo de aporte de electrones mediado por cofactor NADPH en el citocromo P450.....	45
<b>Ecuación 2.</b> Representación del cambio de estado de oxidación del hierro del grupo hemo del citocromo P450.....	46

## Índice de formulas

<b>Formula 1.</b> Formula para el calculo de $\Delta E$ . .....	66
<b>Formula 2.</b> Cálculo de porcentaje de inhibición. ....	67
<b>Formula 3.</b> Cálculo de límite de detección. ....	67
<b>Formula 4.</b> Cálculo de límite de cuantificación. ....	67
<b>Formula 5.</b> Cálculo de error relativo porcentual. ....	68

## Lista de símbolos y abreviaturas

Abreviatura	Término
$\alpha$ -PVP	$\alpha$ -pirrolidinopentiofenona
MDMA	3,4-metilendioximetanfetamina
CYP2D6	Isoforma 2D6 del citocromo P450
C-SPE	Electrodo serigrafiado de carbono
C-SPE-NO <sub>2</sub>	Electrodo serigrafiado de carbono modificado con grupos nitro
C-SPE-NH <sub>2</sub>	Electrodo serigrafiado de carbono modificado con grupos amino
C-SPE-CYP2D6	Electrodo serigrafiado de carbono modificado con isoforma 2D6 del citocromo P450 (biosensor electroquímico)
COVID-19	Por sus siglas en inglés (Coronavirus disease): Enfermedad infecciosa causada por el coronavirus descubierta en el año 2019
NSP	Nuevas sustancias psicoactivas
VC	Voltamperometría cíclica
VCs	Voltamperogramas cíclicos
VDP	Voltamperometría diferencial de pulso
VDPs	Voltamperogramas diferenciales de pulso
VOC	Voltamperometría de onda cuadrada
I	Corriente
E	Potencial
GC/MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
LC/MS-MS	Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem
PMA	<i>p</i> -Metoxianfetamina
PMMA	<i>p</i> -Metoximetanfetamina
2C-B	4-bromo-2,5-dimetoxifeniletilamina
MDA	Metilendioxianfetamina
ETA	Estimulantes de tipo anfetamínico
LDD	Límite de detección
LDC	Límite de cuantificación
R <sup>2</sup>	Coefficiente de determinación
PBS	Por sus siglas en inglés (phosphate buffered saline): Buffer fosfato salino
EDC	1-(3-Dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida
NHS	N-Hidroxisuccinimida
Bu <sub>4</sub> NBF <sub>4</sub>	Tetrafluoroborato de tetrabutilamonio
CH <sub>3</sub> CN	Acetonitrilo

## Introducción

El mercado mundial de las drogas de abuso se enfrentó a cambios radicales debido a la pandemia de la COVID-19, pese a ello, se mantiene dinámico y se adapta a los cambios que se presentan en el mundo, por esta razón las políticas antidroga no pueden ser estáticas, pues según el informe mundial de drogas emitido por la Oficina de las Naciones Unidas contra la droga y el delito (UNODC) se sabe que el panorama mundial se hace cada vez más complejo y se requieren acciones que permitan un mejor manejo de la situación. Unas de las grandes conclusiones que establece la UNODC es el vínculo existente entre el problema mundial de las drogas, el desarrollo sostenible, la seguridad y el respeto de los derechos humanos (1); emprender labores de investigación desde cualquier área que se relacione con la problemática de las drogas influye en un mejor manejo y un avance en las áreas vinculadas.

La pandemia de la COVID-19 invita a replantear el abordaje investigativo, pues las nuevas tendencias en consumo dieron entrada a una nueva variedad de drogas de abuso, principalmente a las drogas sintéticas que son fuente de incertidumbre pues la gran variabilidad estructural da como resultado un amplio y variado abanico de opciones para los consumidores, que en la mayoría de los casos no conoce el contenido de lo que consumen, pues es sabido que la gran mayoría de nuevas sustancias psicoactivas no tienen un mercado propio, en su lugar, estas son usadas para suplantar o adulterar sustancias ya conocidas y con un mercado sólido (2). El mercado mundial de drogas de abuso está dominado por el grupo de los estimulantes, el cual parece tener un progresivo crecimiento y estar liderado por la cocaína y la metanfetamina, esta última alcanzó en 2018 una alarmante cantidad de 228 toneladas incautadas a nivel mundial. El mercado de drogas de tipo estimulante parece estar ganando gran popularidad y representa un gran reto dada la variedad de sustancias que forman parte de este grupo, bien sea por el amplio patrón de variación estructural o por sustancias de familias emergentes como las catinonas sintéticas que son muy frecuentemente usadas como adulterantes o suplantadores de drogas de tipo anfetamina, o con mercados propios como en la Federación de Rusia donde la mefedrona y la  $\alpha$ -pirrolidinopentiofenona ( $\alpha$ -PVP) comparten el mercado con la metanfetamina.(1)

La detección de sustancias psicoactivas tanto en matrices biológicas como no biológicas es un paso fundamental en la lucha contra las drogas, sin embargo, el creciente mercado de las nuevas sustancias psicoactivas (NSP) impone un panorama complejo que obliga a la búsqueda de estrategias innovadoras, pues la modificación de estructuras químicas da paso a la diversificación de sustancias psicoactivas dentro de las diferentes familias de drogas, además, la presencia de agentes adulterantes y suplantadores en las muestras analizadas generan gran confusión por la complejidad de las matrices de análisis y la presencia de nuevas sustancias psicoactivas para las que no se cuenta con estándares de referencia en los laboratorios.(2)

La toxicología analítica y su enfoque en la detección de drogas de abuso debe avanzar al ritmo de la dinámica del mundo actual, por tanto, las técnicas y métodos aplicados deben ser amigables con el medio ambiente y económicos en términos de costos de implementación. Actualmente existe un vacío en la detección de drogas de abuso, principalmente debido a que la gran variedad de sustancias imposibilita la identificación individual de estas, la

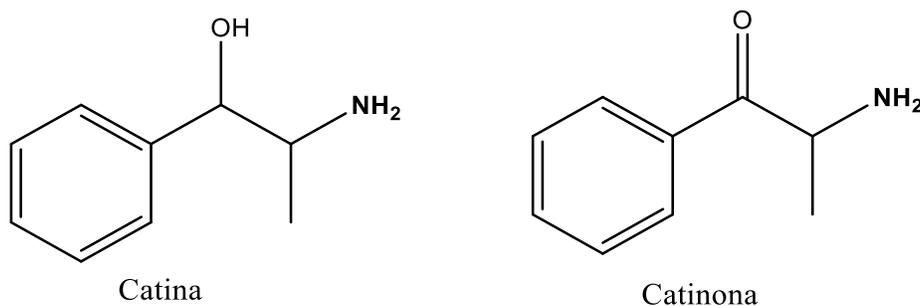
cromatografía pese a que es la herramienta usada por defecto en laboratorios de toxicología presenta ciertas desventajas frente al panorama actual al que nos enfrenta el fenómeno de las drogas de abuso, como los altos costos de implementación y la imposibilidad de ser aplicada en campo, por ello surge la necesidad de explorar otras áreas del análisis instrumental que permitan contar con herramientas confiables y versátiles que sean aplicables en campo, como la electroquímica, lo cual permitiría disminuir los tiempos de respuesta de las autoridades y la eficacia del abordaje clínico.

## 1. Marco teórico

### 1.1. Catinonas sintéticas

Las catinonas sintéticas son derivados obtenidos mediante síntesis química que le deben su nombre a la molécula natural “catinona”. La catinona es el principal alcaloide encontrado en las hojas de *Khat* (*Catha edulis*), una planta perenne autóctona de Etiopía, que también se cultiva en el este de África y en el sur-oeste de la Península Arábiga, sitios donde se mastican sus hojas por tradición socio-cultural y religiosa o se preparan en forma de té para obtener de ellas el efecto estimulante (3–5). La planta de *Khat* fue identificada por primera vez entre 1761 y 1763 por el botánico sueco Peter Forskal, sin embargo, no fue hasta 1930 cuando se identificó la primera molécula con el potencial estimulante de la planta: la (+)-norpseudoefedrina (Catina), a la cual se consideraba el principal componente activo de la planta hasta que en 1975 se aisló la catinona, un beta-ceto análogo de la anfetamina, en el laboratorio de estupefacientes de las Naciones Unidas. Dicha molécula mostró ser de 7 a 10 veces más potente que la catina, pero mostró ser susceptible a la degradación, generando una pérdida de sus efectos, por lo que su consumo debía provenir de hojas frescas (5,6). En la **Figura 1** se presentan las estructuras de las dos moléculas mencionadas.

**Figura 1.** Principales moléculas activas de las hojas de Khat (*Catha edulis*). Tomado de (7).



El surgimiento de las primeras catinonas sintéticas no se basó principalmente en el consumo recreativo, sin embargo, estas moléculas terminaron empleándose con estos fines, principalmente porque su uso era muy discreto, lo cual, en un inicio, permitió que pasaran desapercibidas ante las autoridades. Diferentes catinonas sintéticas fueron probadas para su uso en tratamientos médicos, para citar algunos ejemplos, la metcatinona, que fue la primera catinona sintética conocida junto a la mefedrona (4-metilmecatino), fueron sintetizadas por primera vez en 1928 y 1929 respectivamente (5,6,8,9), la metcatinona fue probada como agente analéptico y como estimulante locomotor (8). Las catinonas sintéticas tienen una estrecha similitud con los derivados anfetamínicos en cuanto a la estructura química y los efectos generados sobre el sistema nervioso central (SNC) (8), dicha similitud llevó a que se buscara una aplicación como antidepresivos y fármacos anoréxicos a la metcatinona,

bupropion (m-cloro-N-tert-butilcatinona), dietilpropion (N, N-dietilcatinona) y dimetilpropion (N, N-dimetilcatinona), sin embargo, de las moléculas estudiadas, se observó que la metcatinona mostró un alto potencial adictivo, aún mayor que la cocaína y la catinona, que fue atribuido a la N-monometilación, fenómeno que también fue descrito para la anfetamina, que al monometilarse y pasar a ser metanfetamina se potenciaban los efectos generados sobre el SNC (5,8).

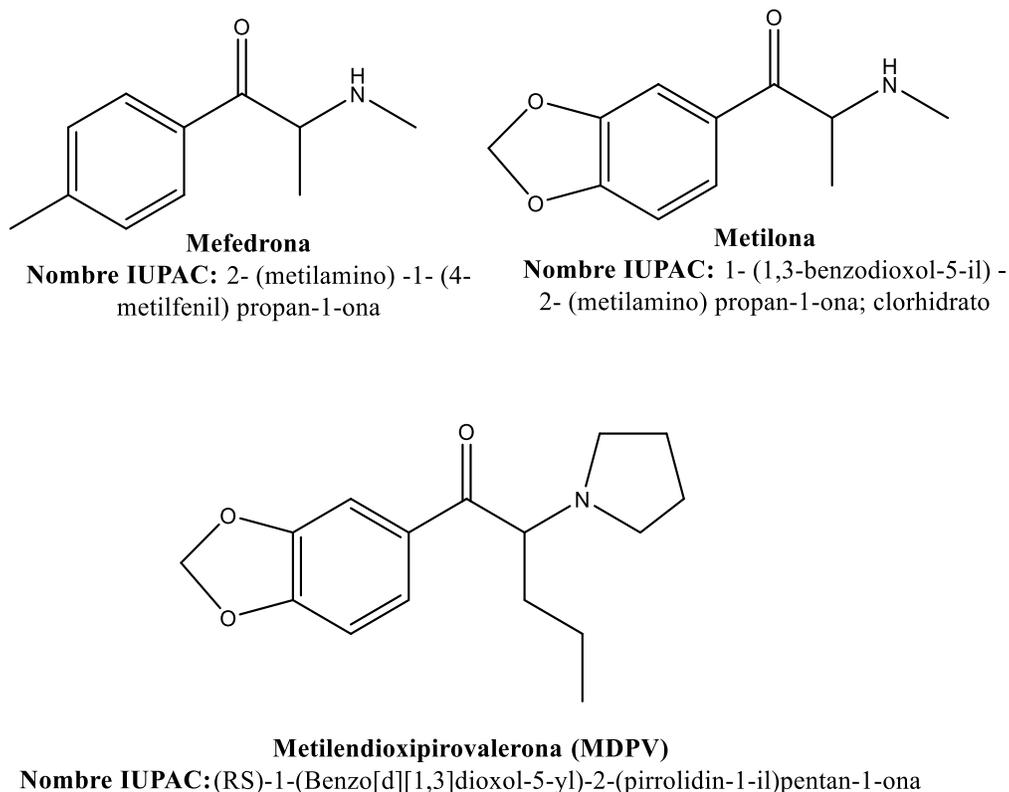
Tras el descubrimiento de diversos análogos sintéticos de la catinona no se extendió el conocimiento de su uso recreativo hasta la entrada en vigor de las políticas planteadas en la Convención Única de 1961 sobre estupefacientes y la posterior fiscalización de los estimulantes de tipo anfetamínico en el Convenio sobre Sustancias Sicotrópicas de 1971. Las sustancias denominadas anfetaminas fueron prohibidas e incluidas la gran mayoría en la lista 1, es decir, sustancias de mayor riesgo sin aplicación médica comprobada, lo que llevó a que se emplearan alternativas “legales” en el mercado de drogas para sustituir las sustancias que estaban bajo fiscalización (9). De acuerdo con lo anterior, se dio lugar a la diversificación estructural de las sustancias fiscalizadas, pues la clasificación establecida en el Convenio sobre Sustancias Sicotrópicas de 1971 establecía una lista de sustancias sometidas a fiscalización, sin embargo, no contemplaba los análogos estructurales. Como respuesta a esta problemática se amplió la prohibición de las drogas a sus análogos en la Convención de las Naciones Unidas contra el Tráfico Ilícito de Estupefacientes y Sustancias Sicotrópicas realizada de 1988, fecha para la que ya se había acuñado el concepto de “Droga de diseño”, planteándose como medida de control que toda droga de diseño se incluyera en la lista de sustancias fiscalizadas de acuerdo a su analogismo estructural con las drogas ya incluidas en esta lista (9).

Como resultado de las medidas adoptadas en la Convención de las Naciones Unidas contra el Tráfico Ilícito de Estupefacientes y Sustancias Sicotrópicas (1988) las catinonas sintéticas ganaron popularidad en el mercado de drogas ante la prohibición en muchos países de derivados anfetamínicos como la 3,4-metilendioximetanfetamina (MDMA) y se empezaron a presentar como alternativas legales, alcanzando su mayor popularidad en la primera década de los 2000 (5,6,10,11), estas siguieron comercializándose mediante el empleo de estrategias para evadir el control de la justicia como la síntesis de sustancias con poca analogía con las sustancias prohibidas en la lista 1, vendiéndose con etiquetas con mensajes como “no apta para el consumo humano”, “sales de baño”, “mezclas herbales”, “sustancias de investigación”, entre otras, y valiéndose de tiendas virtuales para una comercialización más discreta (4,6,9).

Las catinonas más consumidas en la segunda mitad de la primera década de los 2000 fueron la 4-Metilmecatinona (Mefedrona), la 3,4-Metilendioximetcatinona (Metilona) y la 3,4-Metilendioxipirovalerona (MDPV) (5,9), cuyas estructuras químicas se pueden apreciar en la **Figura 2**. En 2009 las catinonas eran las drogas más populares en el Reino Unido, año para el cual ya representaban un problema en Estados Unidos, donde estas tres sustancias lograban evadir el control de la justicia debido a que la ley contra drogas que estaba en vigencia para finales de la primera década del 2000 solo penalizaba la fabricación y posesión para uso humano (12), razón por la cual la Administración para el Control de Drogas (DEA, por sus siglas en inglés) intervino prohibiendo totalmente el 7 de septiembre de 2011 estas tres moléculas temporalmente mientras se evaluaba la posibilidad de una prohibición permanente (12,13), acción que llevó a que en 2012 estas catinonas sintéticas fueran incluidas

en la lista 1 de sustancias prohibidas en Estados Unidos, de acuerdo con la clasificación establecida en el Convenio sobre Sustancias Sicotrópicas de 1971 y se incluyeran en la lista de drogas sintéticas de abuso (9).

**Figura 2.** Estructura química de las catinonas sintéticas más consumidas en la primera década de los 2000. Tomado de (7).



El mismo fenómeno que se presentó ante la fiscalización de otros grupos de drogas se dio lugar luego de incluir en la lista de sustancias fiscalizadas a las catinonas anteriormente mencionadas, pues ante este panorama, se diversificó la cantidad de análogos estructurales, que surgieron como alternativas para pasar desapercibidos ante las autoridades. Se pueden citar algunos ejemplos como la bufedrona, metedrona, fiefedrona, 3-fluorometcatinona, butilona y etilona, que emergieron en el mercado de drogas de diseño tras la prohibición de la mefedrona (5).

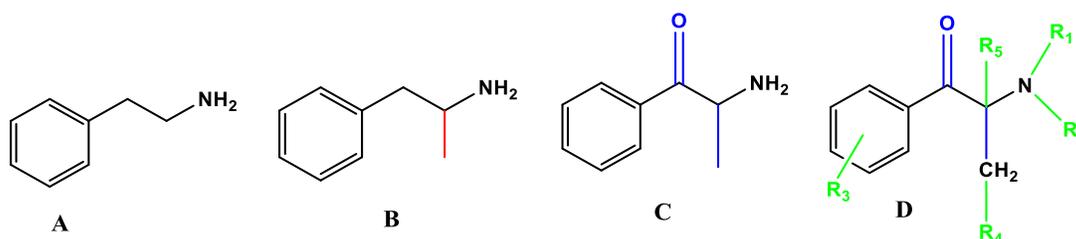
En Colombia, por medio de la ley 13 de 1974 se aprueba la Convención Única sobre Estupefacientes de 1961 y su protocolo de modificaciones de 1972. Mediante la ley 43 de 1980 se aprueba el Convenio sobre sustancias Sicotrópicas de 1971 y se autoriza al gobierno de Colombia para adherirse a este, y mediante la ley 67 de 1993 Colombia aprueba la Convención de las Naciones Unidas contra el Tráfico Ilícito de Estupefacientes y Sustancias Sicotrópicas de 1988. Por otra parte, mediante la ley 30 de 1986 Colombia adopta el estatuto nacional de Estupefacientes, el cual se reglamenta mediante el decreto 3788 de 1986.

Como una herramienta para el seguimiento de la dinámica de las drogas en Colombia se crea el Sistema de Alertas Tempranas (SAT) del Observatorio de Drogas de Colombia (ODC) mediante la Resolución No. 001 de 2016 del Consejo Nacional de Estupefacientes. El Sistema de Alertas Tempranas ha informado desde su creación la aparición de nuevas sustancias en el mercado de las drogas de abuso en Colombia, reportando así desde el observatorio de drogas de Colombia por primera vez en 2013 la presencia en el país de Metilona y Etilona (14).

### 1.1.1. Estructura química

Las catinonas sintéticas pertenecen al grupo los derivados de la fenetilamina, al igual que la anfetamina y sus derivados, siendo la estructura de fenetilamina el grupo farmacóforo, con semejanza estructural con los neurotransmisores dopamina y norepinefrina (3,9), dicha semejanza se puede observar en la **Figura 3**. Las catinonas sintéticas son  $\beta$ -ceto análogos de la anfetamina, es decir, con un grupo carbonilo unido al carbono  $\beta$  de la cadena aminoalquílica que a su vez está unida a un anillo de fenilo (6,12,15), por lo que se les suele denominar  $\beta$ -*k*-anfetaminas (12). Al igual que el resto de moléculas de tipo fenetilamina las catinonas pueden aparecer en dos formas estereoisoméricas, usualmente en forma de mezcla racémica, por lo que entre los estereoisómeros pueden haber diferencias en cuanto a efectos generados, por otro lado, se cree la racemización se puede dar también a través de la tautomería ceto-enol (6).

**Figura 3.** Diferencias estructurales entre A: fenetilamina, B: Anfetamina, C: Catinona y D: Catinona sintética. Tomado de (7).



Al poseer el mismo grupo farmacóforo que otras sustancias de tipo fenetilamina, como los derivados de tipo anfetamínico, se cree que sus mecanismos y efectos farmacológicos son similares (9,15), sin embargo, el grupo carbonilo ubicado en la posición  $\beta$  a la cadena aminoalquílica aumenta su polaridad y por ende disminuye su permeabilidad en la barrera hematoencefálica, lo cual disminuiría la intensidad de los efectos generados (6,12). No obstante, la lipofilicidad de las catinonas puede aumentar a razón del tipo y el grado de sustitución, así pues, la adición de grupos aceptores de electrones como el fluor (por ejemplo la flefedrona y la 3-fluorometcatinona), o el aumento de la longitud de la cadena carbonada sobre el grupo amino terminal o sobre el carbono alfa al grupo amino aumentan la lipofilicidad y podrían otorgarle a la molécula resistencia ante la degradación enzimática (15).

### 1.1.2. Toxicología de las catinonas sintéticas

---

La información disponible acerca de aspectos toxicológicos relacionados con las catinonas sintéticas es limitado, esto se debe al reciente interés sobre estas sustancias, la gran variabilidad estructural que se oferta en el mercado de las drogas y a que usualmente se comercializa mezclada con otras sustancias como anfetaminas y cafeína, lo cual impide tener un objeto claro de estudio (16).

Entre los efectos buscados por los consumidores se encuentran la euforia, empatía, aumento de la energía, aumento de las capacidades sociales y de trabajo, aumento de la lívido sexual, entre otras (6,17). Entre los efectos adversos más comunes se reportan taquicardia, hipertensión, hipertermia, infarto de miocardio y muerte (15).

### **1.1.2.1. Toxicocinética**

#### **1.1.2.1.1. Absorción**

El modo de consumo de las catinonas sintéticas es muy variado, las formas más comunes en que se consumen es inhaladas, fumadas e inyectadas (15).

La permeabilidad de las catinonas sintéticas en las barreras biológicas dependerá de la estructura, por ejemplo, las catinonas que poseen derivados de la pirrolidina en su estructura tienen una mayor capacidad para cruzar la barrera hematoencefálica dado a la baja polaridad del anillo de pirrolidina (6,12), sin embargo, el grupo  $\beta$ -ceto aumenta la polaridad de la molécula, es decir, disminuye su lipofilicidad, razón por la cual el efecto de las catinonas es menos intenso que el de las sustancias del grupo de la anfetaminas, las cuales no poseen este grupo carbonilo. En relación con lo anterior, la cinética de las catinonas tipo pirovalerona reveló una absorción rápida de las dosis administradas vía oral e intravenosa en ratas, reportándose que solo un 29% de la dosis administrada vía oral no se había absorbido y mantenía en el estómago 30 minutos después de la administración oral (12).

La estructura química de las catinonas evidentemente es un factor influyente en la capacidad de absorción, lo cual se asocia directamente con la velocidad con la que se presentan los efectos psicoactivos, en síntesis, se puede decir que entre mayor sea el patrón de sustitución de la sustancia con grupos que le otorguen lipofilicidad menor será el tiempo en que se observen los efectos psicoactivos. Retomando el caso de las catinonas tipo pirovalerona, como característica principal se debe tener en cuenta el efecto generado por el anillo de pirrolidina sobre la lipofilicidad de estas sustancias, ya que este grupo no solo le otorga protección ante la acción enzimática sobre la amina terminal sino que hace que la molécula sea altamente lipofílica, penetre con gran facilidad la barrera hematoencefálica y tenga un alto volumen de distribución, con vidas medias tisulares y plasmáticas más largas (18–20). La velocidad de absorción depende además de la vía por la que se introduzca la sustancia al organismo, la absorción por vía nasal e intravenosa es mucho más rápida que la absorción por vía oral (21).

Los estudios toxicocinéticos de las catinonas en humanos son muy limitados, pese a esto, se han reportado importantes avances en el modelo animal, siendo la mefedrona una de las moléculas del grupo de las catinonas sintéticas más estudiada, así pues, de acuerdo a

experimentos con mefedrona en ratas, los efectos aparecen en pocos minutos por vía nasal e intravenosa, siendo un poco más lenta la aparición de los efectos por vía oral (15 a 45 minutos), en esta última vía la velocidad de absorción se ve disminuida por la presencia de alimentos en el estómago. En consecuencia, la duración de los efectos será afectada por la velocidad de absorción, reportándose que para el modelo rata la duración del efecto de la mefedrona por vía nasal y oral fue de 2 a 3 horas y para la vía intravenosa fue de 15 a 30 minutos (21). Por otra parte, Martínez-Clemente *et al.* reportan un estudio de la toxicocinética de la mefedrona en ratas Sprague-Dawley macho donde demostraron que tras la administración de 10 mg/Kg vía intravenosa y 30 a 60 mg/Kg vía oral y posterior caracterización mediante el uso de LC/MS y LC-MS/MS que tras la administración oral las concentraciones máximas de mefedrona en el organismo se alcanzaron entre 0,5 h y 1 h, siendo los niveles indetectables a las 9h, también se estimó que la relación de niveles cerebrales/niveles plasmáticos libres de  $1,85 \pm 0,08$ , lo que indica que la mefedrona puede cruzar fácilmente la barrera hematoencefálica (22,23) .

Papaseit *et al.* reportaron un estudio concerniente a la farmacología de la mefedrona comparada con la de la MDMA en humanos, mediante la aplicación de un ensayo aleatorizado, doble ciego, cruzado y controlado con placebo en el que se suministró a 12 voluntarios varones 200 mg de mefedrona, 100 mg de MDMA y placebo para medir posteriormente la concentración plasmática de las sustancias estudiadas por GC/MS, reportándose una concentración máxima plasmática de mefedrona 1,25 h después de la administración, para la MDMA la máxima concentración plasmática se alcanzó a las 2 h; en cuanto a la vida media plasmática se reportaron grandes diferencias, para la mefedrona la vida plasmática fue de 2,15 hora, mientras que para la MDMA la vida media plasmática fue de 7,89 h, lo cual se debe principalmente a las grandes diferencias de lipofiliicidad generada por la presencia de grupo carboxilo en la estructura de la mefedrona y por la susceptibilidad a la acción enzimática que en comparación con la MDMA es mucho mayor, lo anteriormente descrito puede explicar el patrón de consumo compulsivo de la mefedrona (24).

#### 1.1.2.1.2. Distribución

La distribución de las catinonas sintéticas en el organismo ha sido poco estudiado, el modelo animal sin embargo ha permitido obtener algunos valores que pueden servir de indicativo. En ratones se ha encontrado que tras la administración de pirovalerona las concentraciones más altas de la sustancia se encuentran en bilis, hígado y riñones, siendo la concentración en cerebro de solo 1% de la dosis administrada (12).

Recientemente Vignali *et al.* reportaron los resultados obtenidos del análisis de  $\alpha$ -pirrolidinohexiofenina ( $\alpha$ -PHP) en sangre, orina, contenido gástrico, tejidos principales y cabello de una persona fallecida a partir de muestras biológicas recogidas durante la necropsia, en las cuales se cuantificó la concentración de  $\alpha$ -PHP por LC/MS-MS. Las concentraciones más altas de la molécula cuantificada se encontraron en pulmón y bazo (71,1 ng/ml y 83,8 ng/ml respectivamente), las concentraciones en bilis y orina (1,2 ng/ml y 5,6 ng/ml respectivamente) fueron inferiores a las cantidades encontradas en la sangre recolectada de la cavidad torácica (15,3 ng/ml), las concentraciones en hígado, riñón, cerebro y corazón fueron de 3,5; 7,9; 4,7 y 23,6 ng/ml respectivamente (25). Si bien los resultados

del estudio dan una idea de la distribución de las catinonas en el organismo se debe tener en cuenta que las concentraciones y los lugares donde se encuentra la molécula se pueden ver afectados por la redistribución *posmortem*.

Para la metilona se reporta en experimentos con ratas un alto volumen de distribución: 538 ml para la vía intravenosa y 433 ml para la vía oral, con una biodisponibilidad del 78-89% y aproximadamente un 13% de unión a proteínas (26). por otra parte, para la mefedrona se estima que la biodisponibilidad total es de aproximadamente 10%, con un porcentaje de unión a proteínas plasmáticas del  $21,59 \pm 3,67\%$ , en estudios hechos sobre ratas Sprague-Dawley macho (22,23).

### 1.1.2.1.3. Biotransformación

Las principales reacciones que se dan lugar en la fase 1 del metabolismo de las catinonas sintéticas son la *N*-desmetilación, la reducción del grupo ceto a hidroxilo y la oxidación de los grupos alquilo del anillo bencénico (6,27). Pese a que el metabolismo enzimático de las catinonas sintéticas en el organismo puede variar como consecuencia de polimorfismos genéticos, estructura química de la moléculas: patrón de sustitución que genere resistencia al metabolismo enzimático, entre otros, se ha reportado ampliamente que las catinonas sintéticas se metabolizan principalmente por CYP2D6, con contribuciones menores de CYP2C19, CYP1A2, CYP2C9, CYP2B6 y CYP3A4 (28–33).

En moléculas que contienen un grupo metilendioxi como la metilona, la etilona y la butilona la primera reacción de fase 1 es la desmetilación del anillo metilendioxi, después de esto se da lugar a una *o*-metilación mediada por la enzima *o*-metiltransferasa de donde resultan dos posibles metabolitos: 4-hidroxi-3-metoxi o 3-hidroxi-4-metoxi, en la fase 2 del metabolismo estos metabolitos se conjugan con ácido glucurónico y sulfatos, siendo así excretados en la orina junto con moléculas no metabolizadas (6,12,27,34). Por otro lado, en moléculas que no tienen un grupo metilendioxi como la mefedrona la reacción más importante del metabolismo de fase 1 es la *N*-desmetilación a una amina primaria, seguida de la reducción del carbonilo del grupo ceto a hidroxilo (formación de alcoholes), por último, el grupo totilo se oxida al alcohol correspondiente. La fase 2 consiste en conjugaciones con ácido glucurónico y sulfatos (6,12,27,34).

Para la metilendioxiptovalerona (MDPV) que contiene un grupo pirrolidin en su estructura se propone que como resultado del metabolismo de fase 1 los principales metabolitos son catecolptovalerona y metilcatecolptovalerona (6,12,35), que se generan por la apertura del anillo metilendioxi, con una posterior desmetilación que conduce a la formación del catecol, seguida de una metilación generada por la enzima catecol *O*-metiltransferasa (COMT) (12,35), conociéndose mediante ensayos *in-vitro* con microsomas hepáticos humanos y fracciones celulares que el 80% de la molécula de MDPV no se metabolizaba, el 10% se metabolizaba a metilcatecolptovalerona y el 7% a catecolptovalerona, dato que, según los autores, pueden verse afectados por la alta concentración de MDPV empleada para el experimento, además se determinó que las isoformas de citocromo P-450 involucradas en el metabolismo *in-vitro* de MDPV fueron CYP2C19, 2D6 y 1A2 (6,12,35). En cuanto al metabolismo de fase 2, este consiste en conjugaciones con ácido glucurónico y sulfato

(6,12,35), que según lo reportado por Strano-Rossi *et al.* (35) se dan en proporción de 40% y 50% respectivamente.

#### 1.1.2.1.4. Eliminación

La vida media de eliminación para la metilona luego de la administración vía intravenosa a ratas fue de 0,95 h y 0,55 h por la vía oral (26). En experimentos con ratas se determinó que la vida media de eliminación de la mefedrona por vía intravenosa es de 0,37 h y por vía oral fue de 0,55 h (22).

Namera *et al.* estimaron la vida media de eliminación de  $\alpha$ -PVP y  $\alpha$ -PBP a partir del monitoreo de la concentración en orina de estas dos sustancias en un individuo después de la administración intravenosa, proponiéndose una vida media de eliminación estimada de 22 h para  $\alpha$ -PVP y 11 h para  $\alpha$ -PBP, informándose que el pH de la orina puede alterar estas vidas medias de eliminación, dado que a pH ácido la tasa de eliminación puede aumentar (36).

En términos de porcentajes, la pirovalerona luego de la administración vía oral en ratones se elimina un 70% en la orina, sin embargo la eliminación en orina para la administración por vía intravenosa fue de un 90% como metabolitos y un 6-8% como compuesto inalterado en las heces (12), valor de compuesto inalterado eliminado mucho mayor que el reportado para la catinona, molécula naturalmente encontrada en la planta *Katha Edulis*, que fue del 2% con una vida media de eliminación de aproximadamente 5,2 h (6)

#### 1.1.2.2. Toxicodinamia

Debido a la similitud estructural que existe entre las catinonas sintéticas y los derivados de la anfetamina, se puede predecir que sus mecanismos toxicodinámicos son similares, por lo que se sabe que al igual que con los análogos de la anfetamina, las catinonas centran sus efectos en el sistema nervioso mediante la alteración de los sistemas monoaminérgicos centrales y periféricos como mecanismo primario (9).

Se han definido dos posibles mecanismos (37), totalmente contrarios entre ellos, pero que sin embargo conllevan al aumento de la concentración de catecolaminas en la hendidura sináptica:

- El primer mecanismo consiste en el bloqueo de la recaptación de los transportadores de dopamina (DAT) y serotonina (SERT) los cuales tienen la función de regular los niveles de neurotransmisores en la hendidura sináptica, fenómeno que genera que la concentración de neurotransmisores en la hendidura sináptica aumente tras su liberación natural, pero que no puedan reingresar al espacio presináptico (8,9,37).
- El segundo mecanismo consiste en la elevación de la liberación presináptica de neurotransmisores, específicamente en la vesícula presináptica, generada por la entrada de otros neurotransmisores tales como los sistemas colinérgicos o glutamatérgicos (8,9,37).

El mecanismo de acción de las catinonas depende de la estructura molecular, por ejemplo, moléculas como la metilona, mefedrona, entre otras, pueden aumentar la liberación de dopamina desde el espacio presináptico a la hendidura sináptica, por una despolarización interna de las células en reposo (8). Por su parte, la metilendioxipirovalerona (MDPV) es un inhibidor de la recaptación de neurotransmisores (8), que se une a los transportadores de neurotransmisores como los transportadores de dopamina (DAT) y serotonina (SERT), los cuales regulan la cantidad de neurotransmisores en la hendidura sináptica, alterando el alcance y la duración de la señalización entre neuronas (9).

En el caso de las catinonas sintéticas, el efecto de la inhibición de transportadores puede generar una pérdida en la función del transportador, fenómeno que se asocia a los efectos agudos, y conlleva a deficiencias a largo plazo en los sistemas de la dopamina (DA) y serotonina (5-HT) tras la exposición a niveles tóxicos (9).

Las catinonas sintéticas pueden afectar a algunos sistemas de órganos autónomos mediante la alteración de las monoaminas periféricas como norepinefrina (NE), las cuales son importantes reguladores de la función del sistema nervioso autónomo, lo cual puede llevar a alteraciones en órganos del sistemas periférico tales como los sistemas cardiovascular y digestivo (9).

En el mercado actual de nuevas sustancias psicoactivas se suelen comercializar las catinonas sintéticas como mezcla de catinonas, lo que abre la posibilidad de que el consumidor experimente mecanismos de elevación de la liberación de neurotransmisores y mecanismos de inhibición de la recaptación de estos al mismo tiempo (8). Por otro lado, se pueden presentar mezclas de catinonas con otras sustancias como anfetaminas o cocaína, lo cual puede amplificar la toxicidad por efecto del sinergismo y aumentar la tasa de mortalidad (9).

## 1.2. Anfetaminas

A diferencia de las catinonas sintéticas (**apartado 1.1.**) cuyo origen no estuvo relacionado con la aplicación médica (razón por la cual actualmente se cuenta con poca información toxicológica) las anfetaminas surgieron como alternativas terapéuticas que serían exploradas principalmente en el campo de la psiquiatría, lo cual permitió que en la actualidad se cuente con una amplia base de información farmacológica y toxicológica.

Las anfetaminas son un voluminoso grupo de psicotrópicos cuyo consumo abusivo se basa en la obtención de efectos corporales causados por sus propiedades estimulantes, eufóricas, anoréxicas y, en algunos casos, enfatógenas, entactogénicas y alucinógenas. (38) Pese a que actualmente todos los compuestos de tipo anfetamínico con presencia en el mercado de las drogas son sintéticos y con fines de uso recreativo, dichos compuestos son análogos estructurales derivados de la efedrina, un alcaloide presente en las plantas de género *Ephedra* como la *Ephedra sinica* que se ha utilizado desde hace 5000 años en la medicina tradicional china bajo el nombre de Ma Huang para tratar enfermedades como el asma y el resfriado. (39) La efedrina paso de ser empleada en la medicina tradicional china a convertirse en un compuesto activo con aplicación médica a partir de los trabajos del japonés Nagayoshi Nagai que aisló por primera vez *L*-efedrina y *R*-pseudofedrina, además de otros compuestos activos de Ma Huang, junto con los estudios farmacológicos realizados por Kinnoyuki Muira

donde se advierte la alta toxicidad de la efedrina para usos en vías internas de absorción, por lo que se propuso su empleo como midriático de uso tópico.(40) Pese a que desde la década de 1880 se reportó el potencial farmacológico de la efedrina, no fue hasta 1901 cuando se introdujo a la medicina por su semejanza estructural y farmacológica a la adrenalina, los trabajos de Schmidt y Chen (41,42) a principios de la década de 1920 llevaron a que las aplicaciones farmacológicas de la efedrina se extendieran por todo Estados Unidos y Europa como descongestionante y como tratamiento para el asma en forma de píldoras y como medicamento de uso tópico, constituyéndose así una alternativa a la adrenalina que se empleaba con el mismo propósito. Para finales de la década de 1920 se convirtió en una molécula ampliamente conocida en la práctica médica. (40)

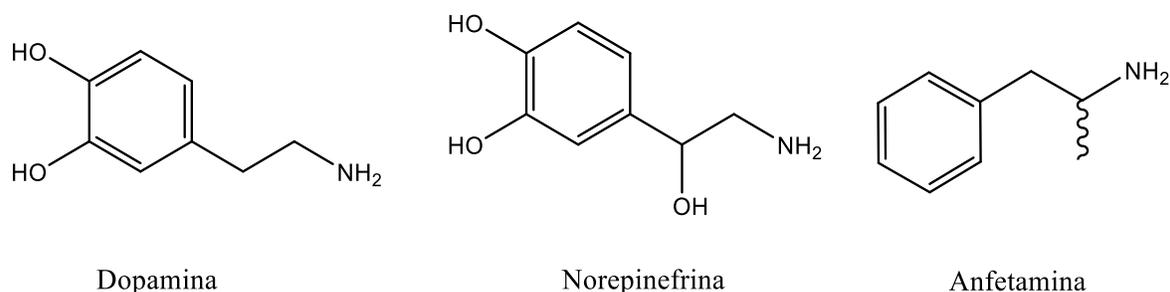
La anfetamina fue la primera molécula sintética análoga de la efedrina reportada en la historia, su síntesis se debe al químico Lazar Edeleano de la Universidad de Berlín en 1887 (43), sin embargo, dicho descubrimiento se enfocó en la síntesis, sin explorar el potencial farmacológico de la molécula (39,40). En 1927 el químico Gordon Alles sintetizó y estudio los efectos de la anfetamina en la búsqueda de un sustituto de la efedrina económico y fácil de sintetizar, como resultado se evidenció que la anfetamina podía revertir la anestesia inducida por otros fármacos y producía excitación e insomnio, a raíz de estos hallazgos nacieron tres fármacos: Bazedrina® que corresponde a la mezcla racémica del *d*-isómero y el *l*-isomero de la anfetamina, Dexedrina® que corresponde al *d*-isómero y Cydryl® que hace referencia al *l*-isomero, dichos fármacos se probarían en el tratamiento de la narcolepsia y del trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH) (44) manteniéndose su uso hasta la actualidad, como por ejemplo bajo la presentación de mezclas enantioméricas 3:1 de *d*-anfetamina: *l*-anfetamina con el nombre de Adderall® y adderall XR® para el tratamiento de TDAH.(45) Otros análogos estructurales de la anfetamina serían explorados para su uso, principalmente en tratamientos psiquiátricos, como es el caso de la metanfetamina que genera efectos fisiológico casi indistinguibles con respecto a la anfetamina pero que estaba libre de patentes como la otorgada a Alles en 1932 para la anfetamina y que posteriormente sería cedida en 1934 a la empresa farmacéutica Smith, Kline y francesa (SKF) de Filadelfia. (40)

La 3,4-metilendioximetanfetamina (MDMA) es otra molécula derivada de la anfetamina que, al igual que otros análogos estructurales como la metanfetamina, fue probada su aplicación médica. La MDMA fue sintetizada y patentada en 1912 por la compañía Merck con el nombre de “metilsafrilamina”, sin embargo, fue hasta 1976 cuando se utilizó por primera vez en tratamientos psiquiátricos por su capacidad de aumentar la autoestima del paciente y permitir la apertura del paciente en las sesiones de tratamiento. El uso médico de MDMA se pudo desarrollar hasta principios de la década de 1980, pues para este momento se incluyó en la lista 1 de sustancias fiscalizadas como resultado de las acciones emprendidas mundialmente a partir de la Convención Única de 1961 sobre estupefacientes y la posterior fiscalización de los estimulantes de tipo anfetamínico en el Convenio sobre Sustancias Sicotrópicas de 1971, y tras dictaminarse que de acuerdo a los criterios de clasificación de la lista 1 de sustancias fiscalizadas esta posee un alto potencial de abuso, carece de aplicación clínica, carece de seguridad aceptada para su uso bajo supervisión médica y tras evidenciarse que podría ser neurotóxico. Al mismo tiempo que se prohibió el uso médico de la sustancia emergió con gran fuerza el uso recreativo de esta, permaneciendo dicha popularidad hasta la actualidad. (39)

### 1.2.1. Estructura química

Los compuestos de tipo anfetamínico se derivan de una estructura central  $\beta$ -feniletilamina (38), la cual se compone de un anillo de fenilo unido a un grupo amino a través de una cadena lateral de dos carbonos, explicándose así el surgimiento del nombre genérico anfetamina: **AlphaMethylPHenETHylAMINE**. La estructura de las anfetaminas presenta alta similitud con la estructura de catecolaminas como la dopamina y la norepinefrina, tal como se puede observar en la **Figura 4**, lo cual explica su alta actividad en el organismo.(46)

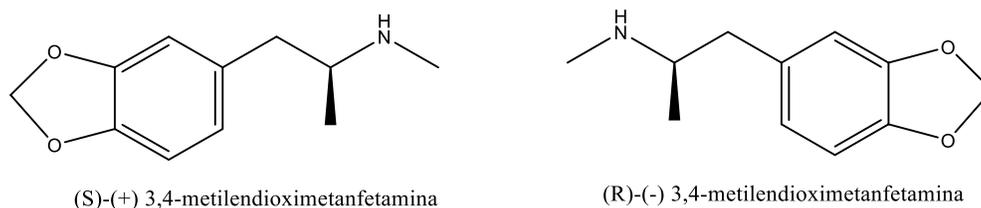
**Figura 4.** Similitud estructural entre anfetaminas y los neurotransmisores dopamina y norepinefrina. Adaptado de (46).



El grupo de las anfetaminas expone una amplia gama de variaciones estructurales, esto se debe a las diversas sustituciones que se pueden presentar en el anillo aromático, en los carbonos  $\alpha$  y  $\beta$  de la cadena amino alquílica, y en el grupo amino terminal. Las anfetaminas sin sustitución sobre los anillos tienden a ser de estimulación psicomotora, cuando se presentan sustituciones en la cadena  $\alpha$  y  $\beta$  amino alquílica los efectos generados tienden a ser estimulantes y anorexígenos, por otro lado, cuando se sustituye la amina terminal se tienen efectos estimulantes a dosis bajas y alucinógenos a dosis altas. Por último, las anfetaminas con sustituciones sobre el anillo aromático suelen ser estimulantes débiles y alucinógenos en algunos casos. Con respecto a la 3,4- metilendioximetanfetamina (MDMA), la presencia de la sustitución metilendioxi sobre el anillo aromático le otorga efectos alucinógenos y estimulantes en dosis relativamente bajas.(38)

La 3,4-metilendioximetanfetamina es una anfetamina similar a la metanfetamina y la mescalina, con un anillo de fenilo sustituido (47), posee un centro quiral que hace que el consumo de este tipo de sustancias se presente en modo de mezclas racémicas, sin embargo, la actividad farmacológica, toxicológica y el metabolismo pueden variar dependiendo de su forma isomérica.(47) La presencia de dos formas isoméricas en la MDMA (como se presenta en la **Figura 5**) es la razón de su efecto dual, donde por un lado el isómero *S* (+) es responsable de los efectos psicoestimulantes y empáticos, mientras el isómero *R* (-) se relaciona con los efectos alucinógenos.(47,48)

**Figura 5.** Formas isoméricas de 3,4-metilendioximetanfetamina. Adaptado de (49).



## 1.2.2. Toxicología de las anfetaminas

La toxicología de las anfetaminas ha sido explorada ampliamente, el interés que se ha puesto sobre este grupo de sustancias ha sido la principal razón. El grupo de moléculas derivadas de la anfetamina es bastante amplio, por tal razón en la siguiente sección se procura tener un enfoque general, pero sin dejar a un lado a la molécula de interés en la presente investigación: la MDMA.

### 1.2.2.1. Toxicocinética

#### 1.2.2.1.1. Absorción

El grupo de las anfetaminas se caracteriza por su homogeneidad en término de toxicocinética, pues se trata de sustancias estructuralmente relacionadas cuyos tiempos en que alcanzan valores de concentraciones máximas plasmáticas presentan gran similitud, sin embargo, se debe tener en cuenta la vía de absorción de la especie estudiada, pues una particularidad de las anfetaminas es que diferentes moléculas de este tipo cuentan con gran popularidad y mercados sólidos que les proveen sus propios patrones de consumo, la vía oral es la más usada en el consumo abusivo de anfetaminas, la absorción por esta vía es rápida, llegando a alcanzar concentraciones máximas plasmáticas en un periodo de 2,6 a 3,6 h (39). En sustancias como la metanfetamina cuyo modo de consumo generalmente consiste en ingestión por vía oral, inyección intravenosa, inhalación directa de cristales o en forma de vapores se debe tener en cuenta la vía de absorción al momento de abordar un estudio toxicológico, especialmente en toxicología clínica donde la vida depende de un tratamiento oportuno, así pues, las concentraciones máximas plasmáticas de metanfetamina fumada o administrada mediante inyección intravenosa se alcanzan en un lapso de tiempo de 1 a 2,5h versus las 3 h que tarda por la vía oral.(38)

Otras anfetaminas con popularidad en el mercado ilícito de las drogas de abuso son la anfetamina y la MDMA, las cuales cuentan con mercado propio y patrones de consumo característico, siendo la vía oral las más común. La anfetamina alcanza concentraciones máximas plasmáticas a las 4h posteriores a la ingestión, mientras que la MDMA alcanza dichos valores en una ventana de tiempo de 1,5 a 3 h con consumos que se basan en dosis únicas comúnmente de 100 a 200 mg (1,4 a 2,8 mg/Kg).(38,39)

### 1.2.2.1.2. Distribución

Las anfetaminas son bases débiles con valores de pKa entre 9,4 y 10,1 y bajo peso molecular, por lo que son altamente solubles en lípidos y atraviesan fácilmente la barrera hematoencefálica.(39) Por lo general las anfetaminas tienen una baja unión a proteínas plasmáticas pues dicha unión es del 20%, lo cual implica que la mayor parte del contenido absorbido estará en forma libre, es decir, biodisponible, fenómeno que favorece la difusión desde el plasma a compartimientos extravasculares. Los volúmenes de distribución de las anfetaminas oscilan entre 6 y 4 L/Kg, dichos valores pueden ser cercanos a 6 L/Kg en personas dependientes de las anfetaminas, en las que se ve aumentado el volumen de distribución, y cercanos a 4 L/Kg en personas sin antecedentes de dependencia, dicho fenómeno podría atribuirse a procesos de tolerancia a la droga. Por otro lado, en términos de volúmenes de distribución y de unión a proteínas no se encuentran diferencias significativas entre isómeros.(38,39)

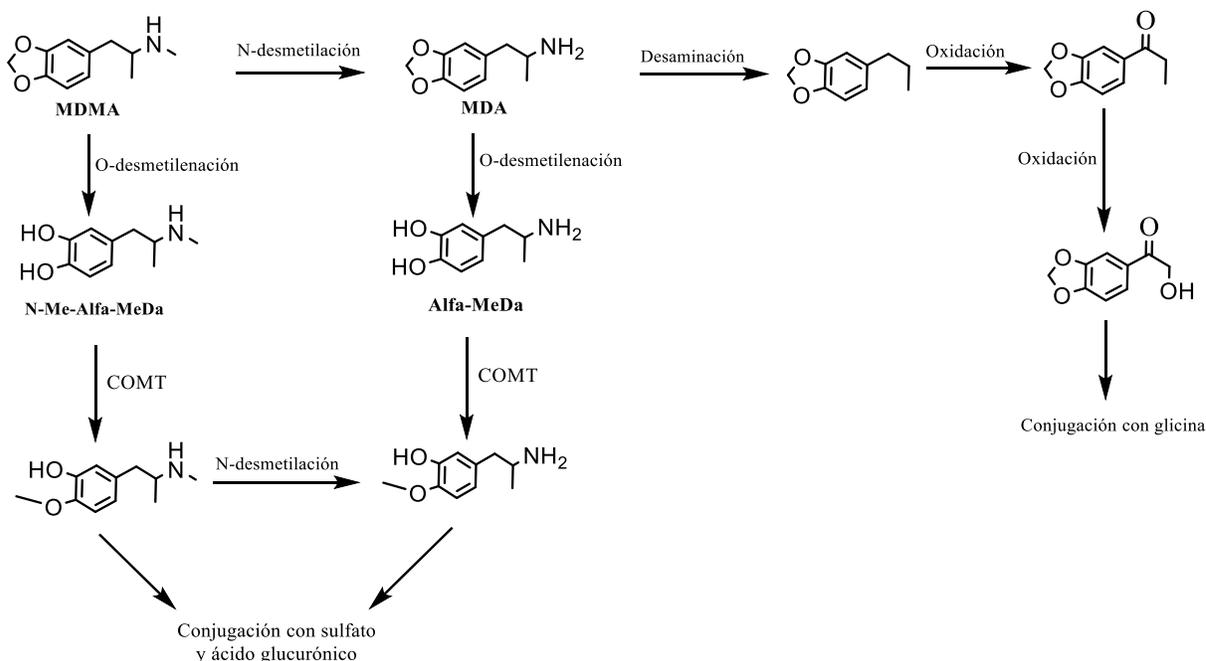
Generalmente las anfetaminas se distribuyen y concentran principalmente en el hígado, riñón, pulmones, líquido cefalorraquídeo y cerebro.(39) La distribución de metanfetamina y anfetamina comparte gran similitud, se sabe que se acumula también en sitios no convencionales como saliva, cabello y uñas, por lo que estas matrices de análisis podrían ser de gran interés, principalmente en el análisis forense. Por otro lado, MDMA se puede acumular en grandes cantidades en diferentes tejidos y órganos en concentraciones más altas que las plasmáticas, como en el hígado donde puede llegar a ser 18 veces mayor, sin embargo, la distribución de MDMA y en general su toxicocinética puede presentar gran variabilidad interindividual debido a polimorfismos genéticos y variaciones en el mecanismo enzimático involucrado en el metabolismo de la MDMA, como la isoforma CYP2D6 del citocromo P450.(38)

### 1.2.2.1.3. Biotransformación

La biotransformación de MDMA consiste en 4 reacciones metabólicas: N-desmetilación, O-desmetilación, desaminación y conjugación con metilo (O-metilación), glucurónido y sulfato, las cuales se pueden observar en la **Figura 6**. Las dos vías más importantes del metabolismo de MDMA consisten por un lado en la apertura del anillo metilendioxi mediante una O-desmetilación que formará un catecol, por otro lado se puede presentar una N-desmetilación que lleva a la formación de 3,4-Metilendioxi-anfetamina (MDA), la cual es una anfetamina con acción biológica, posteriormente la MDA puede sufrir una O-desmetilación que llevará a la formación de catecol, o puede sufrir una desaminación y oxidación de la cadena aminoalquílica que formará fenilcetonas, que a su vez serán oxidadas a derivados del ácido benzoico que tras conjugarse con glicina se excretan como ácidos hipúricos. La apertura de anillo metilendioxi constituye la principal vía metabólica de la MDMA, por lo que este se puede presentar tanto en MDMA como en su metabolito MDA, dando paso a la formación de N-metil- $\alpha$ -metildopamina (N-Me- $\alpha$ -MeDa) a partir de MDMA o  $\alpha$ -metildopamina ( $\alpha$ -MeDa) a partir del metabolito MDA, adicionalmente la acción enzimática de la catecol-O-metiltransferasa (COMT) genera una metilación de los grupos hidroxilo del catecol formado, comúnmente una monometilación sobre el hidroxilo en

posición 4 del anillo de benceno, finalmente estos metabolitos pueden glucuronidarse o sulfoconjugarse.(38)

**Figura 6.** Mecanismo de biotransformación de MDMA. Adaptado de (38).



El mecanismo de biotransformación al que se somete la MDMA está basado principalmente en la acción enzimática de isoformas del citocromo P450 como CYP2D6, CYP2B6, CYP1A2 y CYP3A4, principalmente en las reacciones de desmetilación que llevan a la formación del catecol. La isoenzima CYP2D6 juega un papel importante en la biotransformación de MDMA, pues su contribución en la O-desmetilación de MDMA es de aproximadamente el 30% en humanos y en experimentos *in vitro* dicha contribución podría alcanzar el 50%, siendo la acción enzimática más rápida para el enantiómero S-(+)-MDMA.(38,39)

Por otra parte, la metanfetamina se metaboliza en menor grado que la MDMA, lo cual implica que la cantidad de molécula no metabolizada en el proceso de eliminación es mayor. La biotransformación de la metanfetamina consiste una N-desmetilación mediada por CYP2D6 que lleva a la formación de anfetamina (especie activa), otra vía alternativa catalizada de igual manera por CYP2D6 es la hidroxilación de la posición 4 del anillo bencénico para formar 4-hidroximetanfetamina, los subsiguientes procesos de biotransformación corresponden con las reacciones de biotransformación de la anfetamina, donde una de las vías de biotransformación se basa en la N-desaminación y posterior oxidación que concluye en la formación de derivados del ácido benzoico, que luego se conjugan con glicina y son excretados como los correspondientes ácidos hipúricos; la segunda vía consiste en una hidroxilación del carbono 4 del anillo bencénico, reacción antes vista en la biotransformación de MDMA y metanfetamina, pero que en este caso genera 4-hidroxianfetamina como metabolito.(38,39)

La participación de la isoenzima CYP2D6 en la biotransformación de las anfetaminas tiene un papel representativo, por tal razón los polimorfismos genéticos podrían no solo variar el metabolismo sino las manifestaciones clínicas de un individuo a otro.(38)

#### 1.2.2.1.4. Eliminación

La principal vía de eliminación de las anfetaminas es la vía renal y dicha eliminación es dependiente del pH de la orina. La anfetamina, la molécula mas simple del grupo de las anfetaminas, puede excretarse sin biotransformación en hasta un 55% de la dosis absorbida, siendo más rápida la eliminación del enantiómero S-(+)-anfetamina. En cuanto a la metanfetamina, cuya vida media de eliminación es de 25 h, es excretada por la vía renal aproximadamente un 70% de la dosis consumida, donde 50% corresponde a la molécula sin biotransformación, 15% al metabolito 4-hidroximetanfetamina y 10% como anfetamina.(38) Debido al extenso proceso de biotransformación al que se somete la MDMA la cantidad que se excreta sin ser biotransformada es menor; con una vida media de 6 a 9h se excreta hasta un 80% de la dosis administrada luego del metabolismo hepático, aproximadamente un 60% por vía urinaria, de este 60% solo un 20% se elimina sin biotransformar, mas de un 20% se elimina como el metabolito N-Me- $\alpha$ -MeDA hidroxilado en la posición 4 del anillo bencénico por acción de catecol-O-metiltransferasa (COMT), siendo el principal metabolito presente en orina, seguido por el metabolito N-Me- $\alpha$ -MeDA, finalmente, menos del 10 % de la dosis consumida se elimina como MDA.(38)

Varios factores caracterizan la eliminación de MDMA, por un lado se destaca por ser una eliminación estereoselectiva con una eliminación más rápida del enantiómero S-(+)-MDMA, por otro lado se debe tener en cuenta que pese a que la tasa de eliminación por vía urinaria es constante independientemente de la dosis, la eliminación por vías no renales es dependiente de la dosis administradas, sabiéndose que a dosis altas la MDMA podría inhibir competitivamente a la isoenzima CYP2D6 mediante la formación un carbeno que cuyo origen se da por la oxidación enzimática de moléculas que contienen aminas terciarias o grupos metilendioxi como la MDMA que posee ambas características.(38)

#### 1.2.2.2. Toxicodinamia

Los efectos generados por las anfetaminas se manifiestan a partir de mecanismos toxicodinámicos similares para las diferentes moléculas que integran este grupo de sustancias, dichos efectos se manifiestan como sensación de placer que se debe al aumento de dopamina en el espacio sináptico. La acción de las anfetaminas sobre receptores endógenos se debe a la afinidad que tienen con estos, actividad que les confiere su similitud estructural con los neurotransmisores monoamínicos endógenos, así pues, la metanfetamina tiene la capacidad de aumentar los niveles sinápticos de dopamina, serotonina (5-HT) y noradrenalina, además de tener efecto agonista sobre adrenoreceptores  $\alpha$  y  $\beta$ . La anfetamina por su parte, debido a su gran similitud con la dopamina (ver **Figura 4**) es sustrato del transportador de dopamina (DAT) y puede alterar el transporte activo de las monoaminas a las vesículas presináptica por la interferencia en la función del transportador vesicular-2 (VMAT-2), este último efecto se extiende a las demás moléculas similares a la anfetamina, ya que pueden impulsar los transportadores de monoaminas al interrumpir el gradiente de pH al tratarse de bases débiles, lo que puede llevar a agotamiento de monoaminas de sus centros

de almacenamiento, este fenómeno trae como consecuencia una liberación de neurotransmisores, principalmente dopamina, mediante transporte inverso al espacio sináptico. La inhibición de la síntesis de dopamina como consecuencia de la inhibición de tirosina hidroxilasa y la monoamino oxidasa puede no solo generar desbalances en la síntesis sino también en el metabolismo de las monoaminas endógenas.(39)

La MDMA difiere en sus efectos con respecto a la metanfetamina y la anfetamina, pues posee menos propiedades estimulantes (pese a que también genera aumento en los niveles de noradrenalina y dopamina), en su lugar se destaca por sus propiedades alucinógenas, dicho efecto se debe a la alta afinidad que tiene la MDMA por los receptores de serotonina (5-HT<sub>2</sub>) y su capacidad de acumularse dentro de las neuronas a través de los transportadores de serotonina (SERT), sin embargo, dicha afinidad puede causar una disminución de serotonina y depresión de la síntesis de esta. (39)

Los mecanismos descritos con anterioridad generan un aumento en los niveles de dopamina, a su vez se genera un aumento en el metabolismo oxidativo de estas monoaminas y como consecuencia la generación de radicales libres que están asociados a la citotoxicidad de las anfetaminas, en el caso de la MDMA se conoce su efecto neurotóxico generado por el metabolito MDA que es más neurotóxico que la molécula original y destruye las neuronas productoras de serotonina. En cuanto a las manifestaciones clínicas se conoce que las anfetaminas generan alteraciones de la percepción, psicosis, estimulación psicomotora, manifestaciones que se relacionan con el aumento en los niveles de dopamina, por otro lado, estados de alerta, anorexia, alteraciones en la locomoción y efectos simpaticomiméticos son atribuidos a alteraciones en los niveles de noradrenalina. Por último, la acción de la serotonina (5-HT) se asocia a psicosis y delirios. Los efectos generados por las anfetaminas en el organismo pueden escalar a cuadros clínicos de mayor preocupación como insuficiencia renal y hepática, ataque cardíaco, hipertermia, arritmias cardíacas, convulsiones, accidente cerebro vascular y muerte.(39)

### **1.3. Panorama actual de las anfetaminas y catinonas sintéticas**

Según el Reporte Mundial de Drogas, emitido por la Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (UNODC), en la mayoría de los años reportados las NPS estimulantes han sido el grupo más grande de sustancias identificado e informado por los Estados miembros, con un aumento durante el periodo 2009-2017 de cuatro veces, pasando de 48 sustancias identificadas en 2009 a 206 en 2015 (50). Los estimulantes de tipo anfetamina (ETA) han sido los que más destacan dentro del grupo de los estimulantes, después de la cocaína; los diversos cambios que ha experimentado este grupo de sustancias en el mercado ilícito ha generado una diversificación estructural, en el modo de consumo, en la presentación del producto y en el contenido del producto, este último cambio no es propio de las anfetaminas, pues casi en la totalidad de drogas de abuso se presenta el fenómeno de la adulteración y suplantación, sin embargo es el foco que pretende abordar la presente investigación.

No cabe duda de que el siglo XXI dio inicio con grandes cambios en la dinámica de las drogas, los fuertes controles que implementaron los países para hacer frente a la problemática

de las drogas de abuso llevaron a que algunas drogas llegaran a tener una disminución en su oferta, tal fue el caso de la 3,4-metilendioxi metanfetamina (MDMA), fenómeno también asociado al control de sus precursores, siendo así menos disponibles para los fabricantes de la droga en mención. Como resultado de este gran cambio en la dinámica de la oferta de MDMA se dio lugar a tendencias como tabletas de MDMA con contenido variables de MDMA, lo cual implicó un aumento de la adulteración y la sustitución con análogos como MDA, otras anfetaminas como 4-metoxianfetamina (PMA) o parametoximetanfetamina (PMMA), o con nuevas sustancias psicoactivas como 4-bromo-2,5-dimetoxifeniletamina (2C-B) y catinonas sintéticas. De acuerdo a lo anterior, en la actualidad el término “éxtasis”, que se utilizó originalmente para referirse a MDMA, ha tomado un carácter mucho más diverso, por lo que el término éxtasis puede referirse a un gran grupo de sustancias, ya sea porque hace referencia a mezclas de otras sustancias con presencia variable de MDMA en ella, a sustancias que imitan el efecto de la MDMA bien sea como adulterantes o sustitutos, como también sustancias que tienen sus propios mercados bajo este nombre.(51)

Pese a las diversas medidas que han optado la autoridades de los diferentes países frente al MDMA, el mercado de esta sustancia persiste y resurge gradualmente, es así como en los productos “éxtasis” se ha reportado un aumento en las concentraciones de MDMA en las tabletas, según el informe mundial sobre las drogas 2021 de la Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (51) se han reportado en Europa contenidos promedio de 125 mg de MDMA, cuando el contenido promedio en la década de 1990 y 2000 era de 50-80 mg. El consumo de “éxtasis” en Suramérica, Centro América y el caribe es relativamente bajo (0,2%) frente a países como Nueva Zelanda (2,8%), América del Norte (0,9%) y Europa central y occidental (0,9%), sin embargo la tendencia del consumo continúa en aumento.(51) De acuerdo con lo mencionado anteriormente, actualmente el concepto de “éxtasis” abre espacio a un gran número de sustancias que pueden encajar en el concepto, bien sea por similitud estructural o en cuanto a efectos con la MDMA. Las catinonas sintéticas suelen ser adulterantes comunes en muestras de éxtasis, por tal razón es importante que se considere el papel de estas sustancias tanto en su estudio desde el ámbito técnico-analítico, como desde el abordaje clínico. Las NPS estimulantes más ampliamente incautados entre 2014 y 2017 fueron las catinonas sintéticas, las incautaciones de estas aumentaron en un 4% (a 2,8 toneladas) en 2017 con respecto al año anterior, lo cual generó que las cantidades de NPS estimulantes incautadas aumentaran ligeramente (5%) en el mismo periodo (50).

En el 2012 la incautación de mefedrona alcanzó un pico de 4,2 toneladas a nivel mundial, centrándose la mayor parte de las incautaciones en el Reino Unido (50). En el periodo 2014-2017 la mefedrona fue la sustancia con mayor cantidad de incautación en Rusia, siendo de 0,7 toneladas en 2014, 3,1 toneladas en 2015 y 2 toneladas en 2016 (50). El Reino Unido también informó las mayores cantidades de mefedrona incautadas durante el período 2013-2017, además de India, Polonia y Hong Kong, China, entre otros, que suman un total de 20 países que reportaron el decomiso de mefedrona en este periodo (50). Contrariamente a los esperado, luego de que se fortaleciera el control de este tipo de drogas en 2015, se observó un aumento en las incautaciones de mefedrona, especialmente en Europa, probablemente debido a que esta sustancia ha establecido su propio mercado y este mercado puede evolucionar en respuesta a las políticas de control, por otro lado, tras el aumento del control internacional, catinonas sintéticas como MDPV alcanzaron sus niveles más bajos de incautaciones en 2017, a pesar de que su punto más alto de incautaciones fue en 2013 (50).

Los cambios en las políticas antidroga y el evidente aumento en el control de estas ha conllevado a que diferentes catinonas sintéticas como mefedrona, 3-MMC, 4-metiletilatinona, pentedrona y derivados de pirovalerona como MDPV y  $\alpha$ -PVP pasaran de ser nuevas sustancias psicoactivas no fiscalizadas para estar en la lista de sustancias prohibidas (50). El mercado de la droga es dinámico, y la variabilidad estructural y los múltiples patrones de sustitución de las moléculas permiten la rápida búsqueda de alternativas a las sustancias prohibidas, por ejemplo, en Eslovenia, después de la prohibición de la mefedrona los consumidores de este tipo de nuevas sustancias psicoactivas buscaron los mismos efectos en otras catinonas sintéticas como 3-metilmetcatinona (3-MMC), metilona, 4-metiletcatinona y pentedrona, además de reportarse el uso simultaneo de 3-MMC con opioides como medida de sustitución de la cocaína (50).

En Colombia se reportaron en el periodo 2006-2017 la aparición de 28 nuevas sustancias psicoactivas, de las cuales 7 corresponden a catinonas sintéticas, viéndose en el 2016 un aumento significativo en el número de catinonas sintéticas reportadas (14). La aparición de catinonas sintéticas en el mercado de drogas se inició en el 2013, cuando se conoció la iniciativa de ingresar al país la metilona y otras catinonas sintéticas haciéndolas pasar como “destapacañerías” para evadir el control de la justicia (14).

En el periodo 2013-2014 se reportó el hallazgo de etilona y  $\alpha$ -PVP en el territorio nacional, y para el año 2016 se detectó la presencia de butilona, dibutilona, dimetilona y n-etilpentilona (14). Esta gran variabilidad de sustancias reportadas se debe a que la mayoría de estas no son controladas por la legislación colombiana, lo cual las hace alternativas tentadoras para anfetaminas controladas como la MDMA, sustancia que es suplantada engañosamente por catinonas sintéticas debido a su similitud en cuanto a efectos generados (14). La dinámica en el mercado de las nuevas sustancias psicoactivas en Colombia contrasta con el panorama mundial, sabiéndose que algunos reportes como el de la n-etilpentilona en Colombia fueron de los primeros a nivel mundial (14).

En Colombia, la presencia de estimulantes de tipo anfetamínico y catinonas sintéticas en el mismo producto ha sido ampliamente reportado por el Observatorio de Drogas de Colombia (ODC), organismo que en su reporte del 2017 expone productos incautados que contenían diferentes estimulantes de tipo anfetamínico en una sola muestra: Anfetamina – metanfetamina – MDA – MDMA; estimulantes de tipo anfetamínico acompañados de catinonas sintéticas: MDMA – dibutilona, metanfetamina – metilona – dimetilona – dibutilona; y productos que contenían mezclas de catinonas sintéticas: metilona – dimetilona – dibutilona, además de la presencia de benzofuranos, cocaína, ketamina, 2-CB y cafeína en las muestras reportadas.(52) En la actualidad se observa que el fenómeno de suplantación de estimulantes de tipo anfetamínico con catinonas sintéticas sigue presentándose en Colombia, pues para el año 2020 se informó a través del Sistema de Alertas tempranas (SAT) del Observatorio de Drogas de Colombia (ODC) la presencia nuevas catinonas sintéticas en el territorio nacional: N-etilpentilona, dipentilona, eutilona, N,N-dimetilpentilona y pentilona, que se comercializaban como MDMA en presentación de cristales y polvo.(53) Además del reto analítico que representan este tipo de matrices mixtas se debe destacar el gran riesgo a la salud del consumidor por efectos sinérgicos, que acompañados de un desconocimiento de la toxicocinética y toxicodinamia por tratarse de drogas totalmente nuevas en el mercado ilícito, dificultaría el abordaje clínico.(9)

## 1.4. Técnicas electroquímicas

La electroquímica se basa en el estudio de la relación entre las señales eléctricas y los sistemas químicos.(54) Dicha relación se fundamenta en la reacción electroquímica que tienen lugar sobre la superficie del electrodo de trabajo en una interfaz sólido/líquido. Así, la reacción en un proceso electroquímico se genera por la transferencia de electrones desde un elemento a otro, y es conocida como una reacción de oxidación-reducción (“Redox”). En este sentido, una reacción Redox implica un cambio en el estado de oxidación de uno o más elementos (55). En otras palabras, la detección electroquímica se basa en el movimiento de electrones entre un conductor electrónico, por lo general fabricado en metal o carbono, y un analito redox sobre la superficie de este conductor (electrodo). De acuerdo a lo anterior, teniendo en cuenta que el analito necesariamente debe poseer la capacidad de presentar procesos redox, donde los procesos de oxidación implican una pérdida de electrones del orbital molecular ocupado más alto, y por su parte la reducción implica la inyección de electrones en el orbital molecular desocupado más bajo del analito, para oxidar o reducir un analito se aplica un potencial de electrodo, este a su vez debe ser suficientemente positivo para oxidar el analito o suficientemente negativo para reducirlo, de tal manera que el flujo de electrones (corriente) de una reacción es la medida de la tasa de oxidación o reducción de un analito.(56)

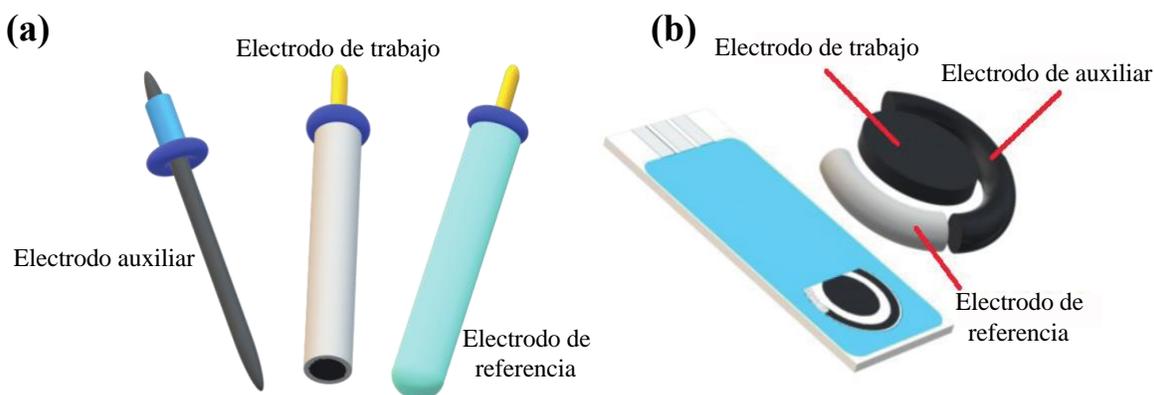
### 1.4.1. La celda electroquímica

Para poder estudiar las reacciones electroquímicas se debe contar con una celda electroquímica, la cual está controlada por un potenciostato que es el hardware electrónico que realiza las mediciones electroquímicas. Por lo general, una celda electroquímica usada en electroanálisis se compone de un sistema de dos o tres electrodos, donde es imprescindible contar con un electrodo de trabajo en el que se aplica el voltaje y se mide la corriente resultante, y un electrodo de referencia con un voltaje fijo lo más cercano posible a un voltaje no polarizado. En el presente estudio se emplea un sistema de tres electrodos, por lo tanto el enfoque del presente apartado se basa en este tipo de sistemas.

Un sistema de electrodos empleados para el análisis electroquímico consta de tres electrodos: un electrodo de trabajo, donde ocurre el proceso Redox. Un electrodo auxiliar, a menudo también llamado contraelectrodo, que tiene el propósito de completar el circuito eléctrico y permite el flujo de carga. Finalmente, un electrodo de referencia que presenta un potencial de equilibrio estable y conocido, permitiendo conocer el potencial aplicado al electrodo de trabajo. (55) En los sistemas de electrodos tradicionales los electrodos de trabajo y auxiliar usualmente se basan en barras de diferentes materiales como metales o carbono en forma de carbón vítreo, pasta de carbono, grafito, etc. Por su parte, los electrodos de referencia empleados usualmente se basan en electrodos de vidrio, el más conocido es el electrodo de Ag/AgCl que consiste en un tubo de vidrio en el cual se sumerge un alambre de Ag recubierto de AgCl en un electrolito de cloruro de potasio (KCl) con concentración conocida, el potencial constante del electrodo de referencia depende de la concentración del electrolito ( $\text{Cl}^-$ ) alrededor del electrodo Ag/AgCl, lo que asegura un potencial constante.(57) Pese a ser la alternativa más común en análisis electroquímico, los electrodos convencionales presentan algunas limitaciones, especialmente en su aplicabilidad a análisis *in situ*, factores como la fragilidad de los materiales con los que están fabricados puede ser una limitante al momento

de llevarlos a campo, además, se deben tener en cuenta el tamaño de estos y los requisitos de pretratamiento y mantenimiento.(57) A raíz de lo mencionado anteriormente ha ganado popularidad el uso de electrodos serigrafiados, que presentan la misma configuración de tres electrodos, pero en forma de tintas conductoras impresas sobre un sustrato, las tintas más utilizadas son la tinta de plata, que usualmente se imprime como una pista conductora, y las tintas de carbono y de oro que se emplean principalmente para la impresión de electrodos de trabajo, siendo la tinta de carbono la mas común por ser relativamente económica, fácil de modificar y químicamente inerte, por su parte la tinta de oro, pese a ser mas costosa, ha ganado popularidad en los últimos años por su aplicabilidad a la generación de monocapas autoensambladas (SAM, por sus siglas en inglés) a través del enlace Au-S.(58) En la **Figura 7** se presenta la configuración de un sistema de electrodos convencionales (a) y de un electrodo serigrafiado (b).

**Figura 7.** Componentes de un sistema de tres electrodos convencionales (a) y de un electrodo serigrafiado (b). Fuente: autor.



La ciencia actual se inclina hacia la miniaturización de las herramientas de las que se vale para la obtención de información, en este sentido, la electroquímica no ha sido ajena a esta tendencia, pues la serigrafía, técnica aplicada a publicidad, textiles y arte desde hace décadas, ha permitido explorar diseños de electrodos a menor costo, a una escala masificada y con mejor desempeño: salida lineal, bajo requerimiento de energía, respuesta rápida, alta sensibilidad y capacidad para operar a temperatura ambiente. (58,59)

De acuerdo con el procedimiento graficado en la **Figura 8**, la fabricación de electrodos serigrafiados consiste generalmente en la utilización de una malla tejida que sirve como soporte para la plantilla sobre la superficie del sustrato sobre el cual se hará la impresión, dicha plantilla tiene como función bloquear la tinta y que de esta manera solo se imprima sobre el sustrato el patrón que contiene la plantilla, para ello se emplea un rodillo o escobilla de goma que permite la dispersión uniforme de la tinta conductora u otros materiales imprimibles, cabe destacar que en el proceso se requieren de diferentes plantillas para impresión de las diferentes partes del electrodo serigrafiado. Respecto a la tinta conductora, después de la impresión y posterior retiro de la plantilla esta es sometida a un tratamiento térmico que permite la solidificación del material impreso, este tratamiento debe repetirse antes de la impresión de nuevas capas de tinta. El paso final en la fabricación de un electrodo

serigrafiado es la impresión de una tinta aislante que tiene como función proteger las pistas conductoras de los electrodos. (58–60)

**Figura 8.** Etapas del proceso de fabricación electrodos serigrafiados. Adaptado de (59).



Los electrodos serigrafiados difieren de los electrodos tradicionales en la capacidad de producción en masa de estos, la cual se ve favorecida por los bajos costos de producción (bajo costo de los materiales) y la simplicidad de la técnica de serigrafía, además, se destaca la versatilidad en el diseño de estos, pues se puede ajustar al patrón de impresión y al sustrato que requiera el fabricante, teniéndose en cuenta que dichas características descritas anteriormente permiten que incluso se puedan realizar a mano, pues el diseño de electrodos serigrafiados se puede abordar con software comunes como Adobe Illustrator, AutoCAD, PowerPoint, etc. Permitiendo que estos puedan configurarse en diferentes formas geométricas y que en el proceso de fabricación se puedan usar sustratos de diferentes materiales como plástico, papel, cerámica, tela, etc. (59) Sin embargo, la diferencia más destacable se relaciona con la capacidad de aplicabilidad a campo, pues los electrodos tradicionales no son de un solo uso y requieren fases de pretratamiento para su utilización, de esta manera, los electrodos serigrafiados son descartables tras su uso y con diseño miniaturizado, mientras los electrodos convencionales son de mayor tamaño y requieren de pulido de la superficie del electrodo de trabajo y mantenimiento del electrolito del electrodo de referencia.

#### 1.4.2. Voltamperometría

La voltamperometría surgió a partir del descubrimiento de la polarografía en 1922 por el químico Jaroslav Heyrovsky (premio Nobel de química en 1959). La polarografía consiste en el estudio de las soluciones de electrólisis y las sustancias que presentan fenómenos redox en un electrodo de gota de mercurio, de esta manera, al variar el potencial aplicado a estos electrodos se mide los cambios en el flujo de corriente, obteniendo como resultado una gráfica corriente vs voltaje. Las décadas posteriores al desarrollo de la polarografía sirvieron para el desarrollo teórico de la voltamperometría, pero también para la exploración de nuevos métodos e instrumentación, permitiendo así el desarrollo de nuevas técnicas voltamperométricas y la mejora de la sensibilidad de estas.(61)

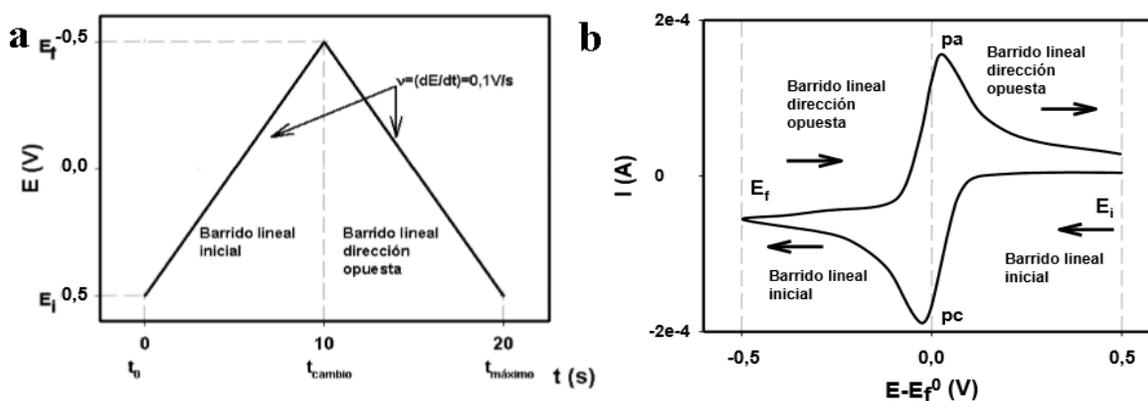
Las técnicas voltamperométricas se clasifican de acuerdo con la clase de técnica electroanalítica de la cual se obtiene información al variar el potencial y determinar la corriente resultante. La gran variedad de formas en que se puede cambiar el potencial conduce a numerosos tipos de técnicas voltamétricas, incluida la polarografía, voltametría cíclica (VC), diferencial de pulsos (VDP) y de onda cuadrada (VOC), entre otros.(62)

Pese a la gran variedad de formas en se puede modificar el potencial, el principio general de la voltamperometría es el mismo, a rasgos generales, esta se basa en la aplicación de un potencial (E) en un electrodo y el monitoreo de la corriente resultante (I), adicionalmente el potencial aplicado o la corriente se pueden controlar durante un periodo de tiempo (t), por lo tanto, las técnicas voltamperométricas se pueden describir como una función del potencial, la corriente y el tiempo.

### 1.4.2.1. Voltamperometría cíclica (VC)

La VC es uno de los métodos más comunes utilizados para obtener información sobre los potenciales redox, investigar los mecanismos y parámetros cinéticos (por ejemplo, constante de velocidad electroquímica) involucrados en las reacciones de analitos electroactivos. (63,64). En este método, el potencial se escanea desde un valor dado ( $E_i$ ) a uno predeterminado ( $E_f$ ) antes de que regrese a su valor inicial, tal como se observa en la **Figura 9-(a)**. El gráfico resultante es la intensidad de corriente I (proporcional a la velocidad de transferencia de electrones) en función del potencial aplicado al sistema en estudio, denominado voltamperograma (**Figura 9-(b)**). (65)

**Figura 9.** Voltamperometría cíclica: a) La forma de la onda del potencial aplicado durante un experimento típico de voltamperometría cíclica. En este caso el potencial inicial,  $E_i$ , es 0,5 V, el potencial final,  $E_f$ , es -500 mV, y la velocidad de barrido,  $v$ , es de 100 mV/s. b) Un voltamograma cíclico típico producido por la aplicación de la forma de onda de potencial. Tomado de (65).

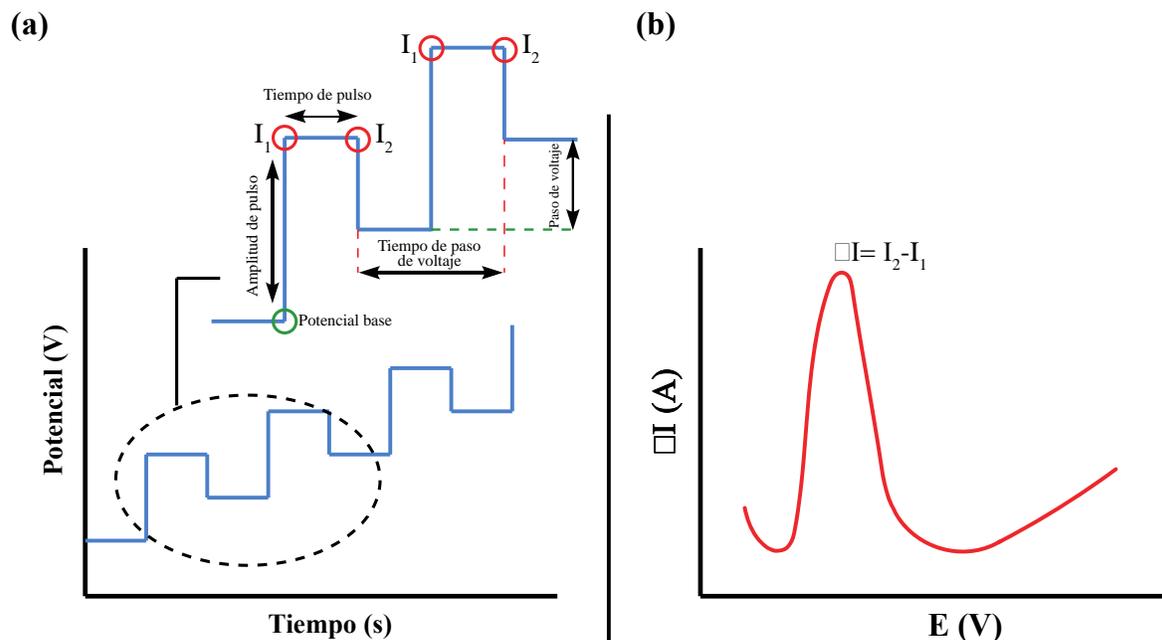


### 1.4.2.2. Voltamperometría diferencial de pulsos (VDP)

La voltamperometría diferencial de pulsos se basa en la aplicación de pulsos de potencial de amplitud en un potencial de rampa lineal, es decir, que se inicia con un potencial base, el cual consiste en un valor de potencial en el que no hay reacción faradámica, y a partir de este valor se aplican aumentos de potencial entre pulsos con incrementos iguales, lo anteriormente descrito se puede observar en la **Figura 10-(a)**. La respuesta obtenida se basa en la medida de la corriente antes de la aplicación del pulso ( $I_1$ ) y al final de este ( $I_2$ ), por tanto la respuesta

voltamperométrica ( $\Delta I$ ) consiste en una diferencia entre estos dos valores de corriente ( $I_2 - I_1$ ), lo que permite obtener picos corriente-voltaje como el mostrado en la **Figura 10-(b)**.

**Figura 10.** Voltamperometría diferencial de pulsos: (a) La forma de la onda del potencial aplicado durante un experimento típico de voltamperometría diferencial de pulsos. (b) Un voltamperograma diferencial de pulsos típico producido por la aplicación de la forma de onda de potencial. Adaptado de (61)



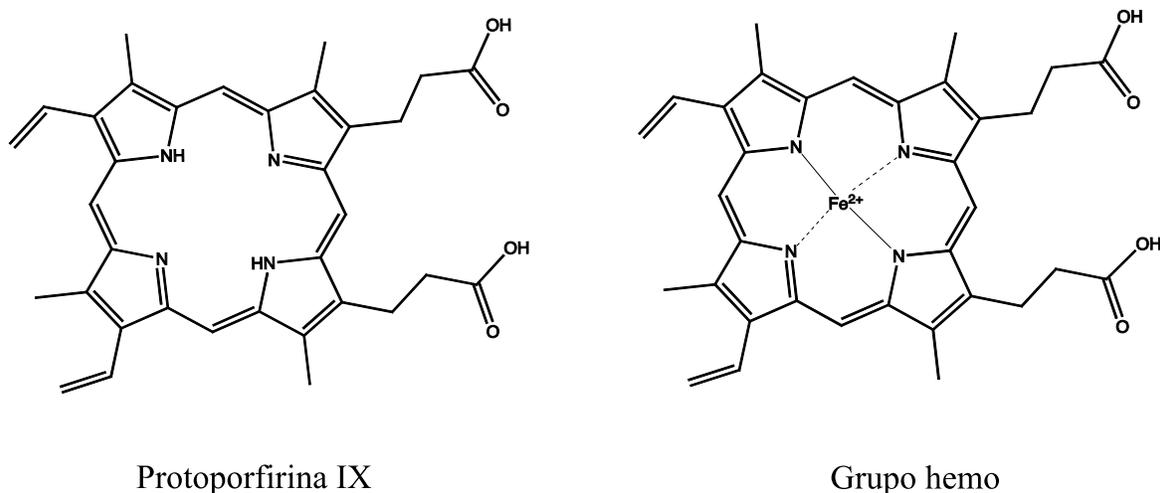
Una característica destacable de la voltamperometría diferencial de pulsos es que debido a que la respuesta generada está basada en la diferencia entre las dos medidas de corriente ( $\Delta I = I_2 - I_1$ ) se reduce efectivamente la corriente de fondo, por tanto respuesta en modo de corriente faradámica se obtiene libre de corrientes capacitivas, lo cual le otorga a la voltamperometría diferencial de pulsos un gran sensibilidad en comparación con la voltamperometría de barrido lineal.(56)

### 1.5. Citocromo P450

El citocromo P450 es una superfamilia de hemoproteínas con acción monooxigenasa que está involucrada en procesos de biotransformación de más de 200.000 productos químicos, donde la acción catalítica del citocromo juega un papel importante en la desintoxicación de compuestos o metabolitos que pueden generar efectos adversos sobre el organismo, entre los que se destacan los xenobióticos lipofílicos (66,67). Los citocromos P450 a su vez hacen parte de las denominadas proteínas redox, que son proteínas involucradas en distintos procesos biológicos en los que se presentan transferencias de electrones, fenómenos esenciales en procesos como la fotosíntesis, la respiración, la fijación de nitrógenos, biosíntesis de ácidos nucleicos, apoptosis, entre muchos otros (68).

La actividad catalítica del citocromo P450 se debe que poseen un único grupo prostético hemo, en el cual se llevan a cabo los fenómenos redox. Este grupo hemo esta compuesto por un derivado de porfirina, específicamente la protoporfirina IX, que actúa como ligando quelante de cuatro posiciones, es de esta manera que mantiene en su centro un átomo de hierro que es responsable del par redox Fe(III)/Fe(II). (69) En la **Figura 11** se presentan las estructuras de la protoporfirina IX y del grupo hemo con el fin de mostrar la similitud entre ambas.

**Figura 11.** Similitud estructural entre protoporfirina IX y grupo hemo.



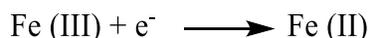
El mecanismo por el cual el citocromo P450 ejerce su actividad catalítica es complejo (67), pues este consiste en la adición de oxígeno al sustrato, para lo que necesita de proteínas asociadas y un aporte energético, que en medios biológicos es generado por el cofactor NADPH, como se describe en la **Ecuación 1.** (67,70)

**Ecuación 1.** Mecanismo de aporte de electrones mediado por cofactor NADPH en el citocromo P450.



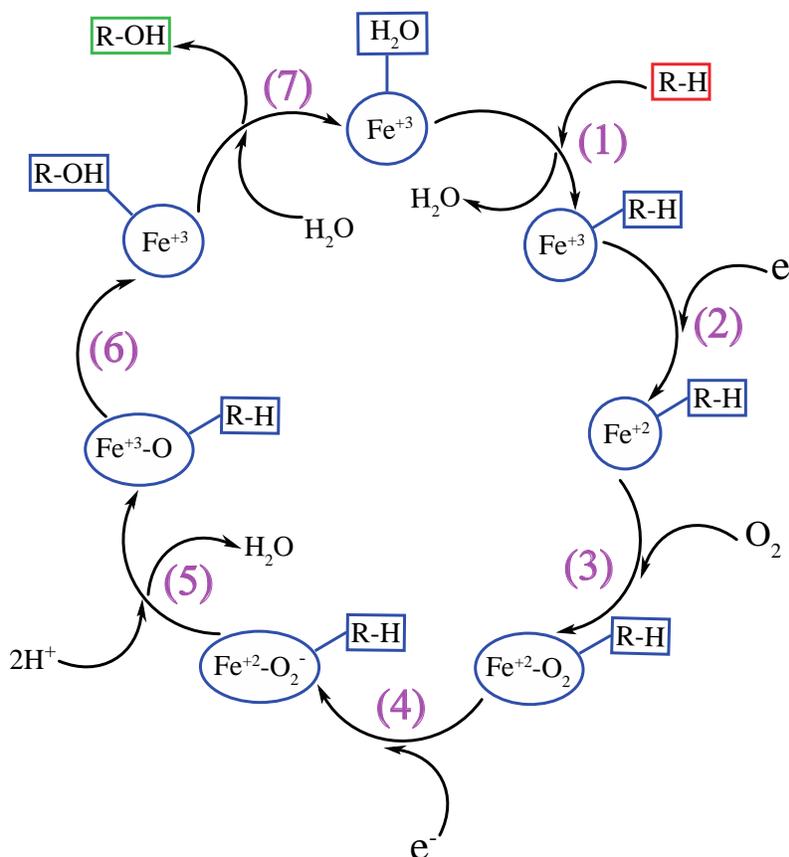
El mecanismo enzimático del citocromo P450 depende del NADPH, del que recibe dos electrones, y del oxígeno molecular, todo esto mediado por una reductasa (citocromo P450 oxidorreductasa (CPR)) (67,70). Además de la inserción de oxígeno al sustrato, según la isoforma de la que se trate, puede también catalizar reacciones de deshidratación, deshidrogenación, isomerización, dimerización, reducción, entre otras (71). El intercambio de electrones que se presenta en el mecanismos enzimático del citocromo P450 consiste en distintos pasos en los que se generan cambios en el estado de oxidación del grupo hemo, tal como se describe en la **ecuación 2** (67).

**Ecuación 2.** Representación del cambio de estado de oxidación del hierro del grupo hemo del citocromo P450.



De acuerdo con lo anterior, en la **Figura 12** se muestra de manera genérica el ciclo catalítico mediante el cual el citocromo P450 metaboliza un sustrato, en este se observan 7 pasos donde el primero (1) consiste en la unión del sustrato (R-H) al grupo hemo del citocromo P450, esto genera un cambio conformacional de su entorno, es decir, en la estructura de la enzima. El paso (2) consiste en la transferencia de un electrón que genera un cambio en el estado de oxidación del hierro de férrico a ferroso ( $\text{Fe}^{+3} \rightarrow \text{Fe}^{+2}$ ), luego, en el tercer paso (3) se une una molécula de oxígeno al sitio metálico impulsado por el nuevo estado de oxidación y la alta afinidad hierro-oxígeno, seguidamente, en el paso (4) se reduce el oxígeno unido al hierro para formar un ion superóxido, dicha especie cargada negativamente produce una transferencia electrónica interna que da como resultado a la especie  $\text{Fe}^{+3}\text{-O}$  (5), luego esta especie generada oxidará al sustrato y posteriormente el sustrato (R-H) se separará del grupo hemo como un metabolito oxidado (R-OH) tras ser desplazado por una molécula de agua. (69)

**Figura 12.** Ciclo catalítico del citocromo P450. Adaptado de (69).



A pesar de que el mecanismo enzimático del citocromo P450 requiere cofactores y enzimas reductasas para el intercambio de electrones, la aplicación vía electroquímica simplifica el

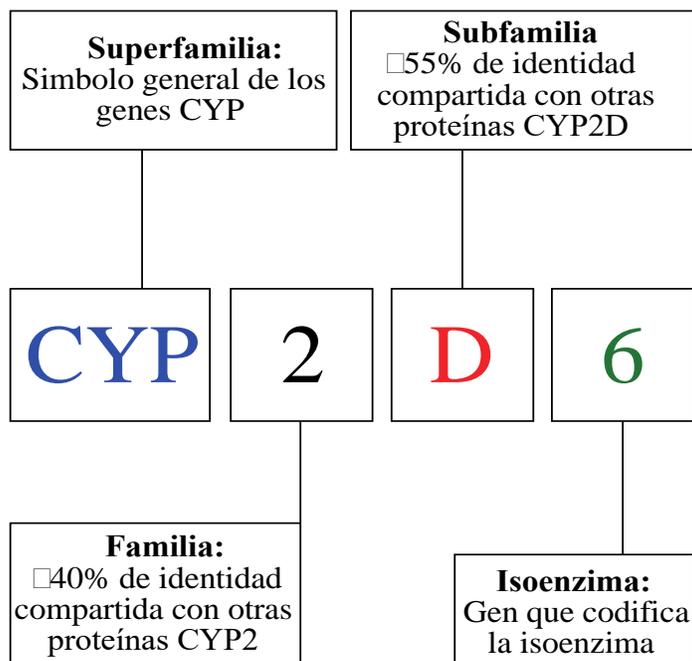
mecanismo, esto se origina gracias a la doble función del sistema electroquímico al sustituir la enzima reductasa y ser la fuente de electrones. De este modo, la transferencia de electrones se genera desde el grupo hemo del citocromo P450 hacia la superficie del electrodo a partir del cambio de estado de oxidación  $Fe^{+3}/Fe^{+2}$ . (67)

### 1.5.1. Clasificación y nomenclatura del citocromo P450

El citocromo P450 es una extensa familia de enzimas que catalizan una enorme cantidad de sustratos, tanto endógenos como exógenos, siendo el principal grupo de enzimas involucrado en la fase 1 del metabolismo de xenobióticos, previniendo la bioacumulación de sustancias con potencial para causar efectos adversos en el organismo. Lo que hace aún mas interesante a este grupo de hemoproteínas es que los genes CYP están presentes en casi todas la formas de vida, probablemente sea consecuencia de procesos evolutivos que hicieron que se diversificaran este grupo de enzimas como herencia adquirida de un único ancestro.(72)

De acuerdo con lo anterior, se debe tener en cuenta que entre diferentes especies existen diferencias en la expresión, regulación y función de los CYP, razón por la cual algunas especies pueden tolerar xenobióticos que en otras causarían efectos adversos, además de esto, existen diferencias inter e intraindividuales que pueden generar diferencias en la capacidad de metabolizar, desintoxicar y extruir xenobióticos aun cuando son especies de la misma especie, esto se debe a factores de origen genético, epigenético, ambiental, fisiológico y fisiopatológico, que pueden variar a lo largo de la vida de un individuo.(72)

**Figura 13.** Sistema de nomenclatura de genes CYP tomando como ejemplo CYP2D6. Adaptado de (72).



---

Para clasificar y nombrar enzimas del citocromo P450 a raíz de la magnitud de variaciones que existen entre estas se propuso en 1987 un sistema que las nombra con base en el porcentaje de identidad de secuencias de aminoácidos de acuerdo a los criterios que se presentan en la **Figura 13**, haciendo uso de letras y números arábigos para dicho fin. (72,73) De esta manera se sabe que la superfamilia de CYP en el humano consta de 57 genes y 58 pseudogenes divididos en 18 familias y 44 subfamilias.(72)

## 1.6. Biosensores electroquímicos

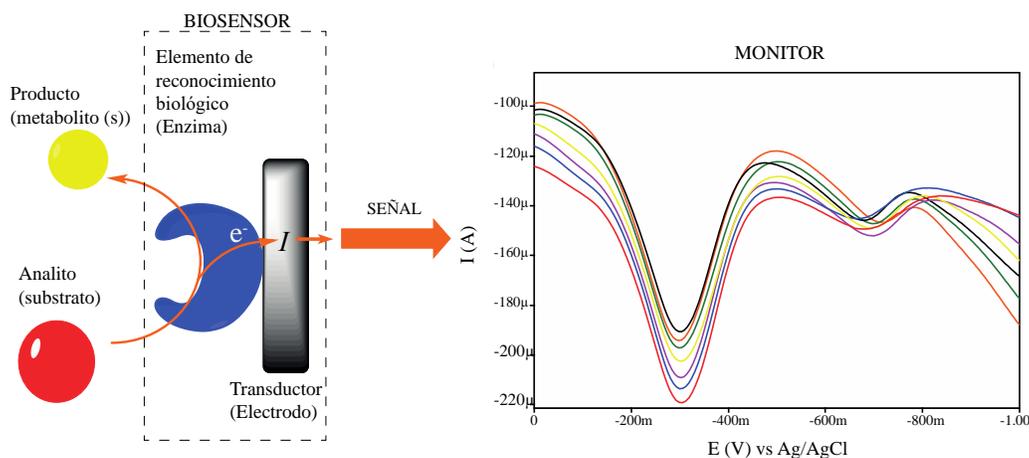
Según la definición aportada por la IUPAC, un biosensor electroquímico es un dispositivo autónomo e integrado que se basa en el contacto directo existente entre un elemento de reconocimiento biológico (receptor bioquímico) con un transductor electroquímico, dicho contacto genera información aprovechable analíticamente de tipo cuantitativa o semicuantitativa acerca de un analito de interés (74,75). En otras palabras, un biosensor electroquímico es básicamente un electrodo modificado químicamente con una película bioquímica (75). La señal que es obtenida a partir de la interacción del analito con la superficie del electrodo modificada con un receptor bioquímico puede ser de tipo amperométrica, que mide la corriente; potenciométrica, que detecta acumulación de carga o potencial celular; conductimétrica, que monitorea los cambios en la conductividad e impedimétricos, que sondea las variaciones de resistencia y capacitancia. (74,76)

El tipo de receptor aplicado a un biosensor electroquímico dependerá del tipo de sustancia de interés (77), entre los receptores bioquímicos con los que se puede modificar un electrodo están los anticuerpos, bacterias, células, ácidos nucleicos y enzimas (74). El presente proyecto pretende usar como receptor bioquímico a la enzima CYP2D6, una isoforma del citocromo P450, la cual se ha reportado ampliamente como la principal enzima implicada en el metabolismo enzimático de catinonas sintéticas y anfetaminas (28,78), y que a su vez pertenece al grupo de las hemoproteínas.

La composición y funcionamiento del biosensor enzimático en el cual se centra el presente estudio se ilustra en la **Figura 14**, a rasgos generales, se basa en una enzima inmovilizada sobre la superficie del electrodo, esta enzima corresponde al elemento de reconocimiento biológico del biosensor, a su vez, el electrodo cumple la función de transductor, es decir, es el puente que permite el flujo de electrones hacia la enzima y a la vez registra los cambios en la respuesta de esta frente a analitos. En síntesis, estos dos componentes conforman el biosensor enzimático.

En cuanto al funcionamiento de biosensores enzimáticos, independientemente de la generación de biosensor que se estudie, el funcionamiento resulta de una interacción enzima-sustrato, ya sea directa, indirecta o mediada, lo cual repercute en una respuesta catalítica por parte de la enzima que generará cambios en la respuesta electroquímica, en el caso de la **Figura 14** se trata de un biosensor enzimático de tercera generación y su respuesta se presenta en forma de cambios de corrientes de pico como resultado del potencial aplicado, lo cual constituye el principio básico de la voltamperometría.

**Figura 14.** Composición y funcionamiento del biosensor enzimático basado en CYP2D6 empleado en el presente estudio. Fuente: autor.



La aplicación de biosensores electroquímicos basados en enzimas ha sido ampliamente estudiada, cabe citar el ejemplo del biosensor basado en la enzima glucosa oxidasa ( $G_{ox}$ ) reportado por Clark y Lyons en 1962 (79), cuya aplicación se extendió a la monitorización amperométrica de glucosa, y fue el primer biosensor electroquímico reportado en la literatura científica (74) y cuyo principio básico se sigue empleando en la actualidad para el monitoreo del nivel de glucosa. Por otro lado, los biosensores electroquímicos pueden aplicarse al monitoreo de la concentración de especies de interés en el cuerpo humano, también pueden aplicarse a entornos externos a un sistema biológico, siendo de gran utilidad para el monitoreo y control de especies tóxicas en alimentos, sustancias de interés en matrices ambientales e investigación farmacéutica, basándose en interacciones biológicas (74,76,77).

De acuerdo a lo mencionado anteriormente, el foco sobre el cual se aborda el presente estudio se basa en el estudio de un biosensor enzimático mediante voltamperometría, ya que estos se basan en la medida de corriente es necesario que exista una transferencia eficiente de electrones desde el electrodo hasta la enzima, por tanto el estudio de dicha transferencia juega un papel importante en el diseño de biosensores enzimáticos. De acuerdo con lo anterior, según el modo de transferencia de electrones los biosensores enzimáticos pueden ser de tres clases:

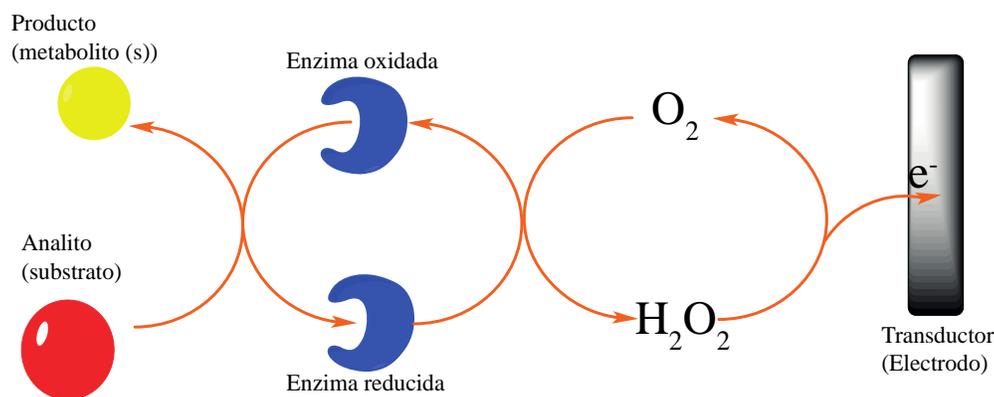
### 1.6.1. Biosensores enzimáticos de primera generación:

Los biosensores de primera generación se basan en enzimas como oxigenasas y oxidasas donde el cosustrato es  $O_2$ , es decir, dichas enzimas son dependientes de  $O_2$ . En estos biosensores la oxidación se da directamente sobre la superficie del electrodo, por lo que los potenciales de trabajo típicamente se dan a valores positivos. La respuesta en biosensores de primera generación puede ser obtenida a partir del cosustrato ( $O_2$ ) o del producto ( $H_2O_2$ ) generado de la actividad enzimática (76), tal como se muestra en la **Figura 15**.

Pese a su gran aplicabilidad y sencillez, los biosensores enzimáticos de primera generación presentan dos inconvenientes principales: el primero se relaciona con la ventana de potencial

de trabajo, pues esta suele ser altamente anódicos con valores de potenciales por encima de 500 mV, razón por la cual da espacio a la aparición de señales de interferentes presentes en la muestra, lo cual afecta la selectividad. El segundo inconveniente se relaciona con la dependencia a  $O_2$ , pues se necesitan cantidades abundantes para asegurar que la actividad enzimática no se vea afectada por déficit de cosustrato, además de que la respuesta del biosensor puede ser variable en entornos donde no se tiene control de la concentración de  $O_2$ .(76)

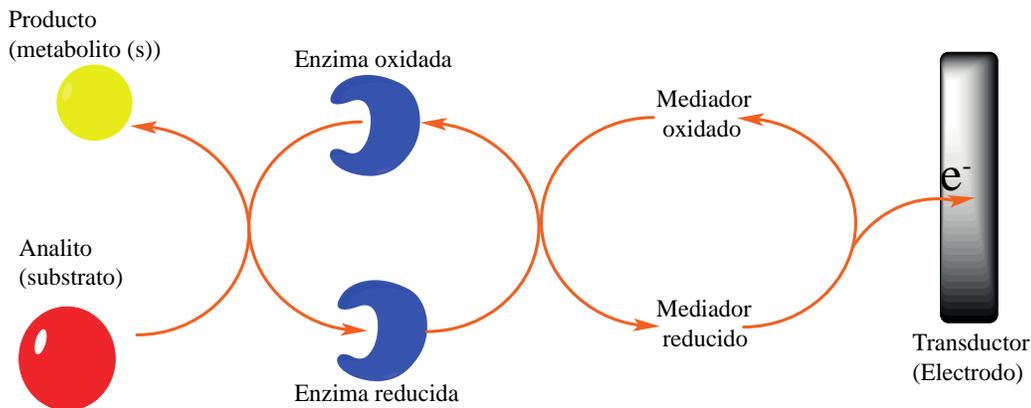
**Figura 15.** Representación gráfica del funcionamiento general de un biosensor de primera generación. Adaptado de (56).



### 1.6.2. Biosensores enzimáticos de segunda generación:

Los biosensores enzimáticos de segunda generación se caracterizan por una transferencia de electrones mediada, es decir, no se genera una medición directa sino que se emplean especies químicas denominadas mediadores artificiales redox, tal como se muestra en la **Figura 16**, entre los mediadores redox conocidos se encuentran quinonas, ferroceno, ferricianuro, complejos de osmio y rutenio, azul de metileno, entre otros. Entre las características que deben cumplir estos mediadores redox se destaca que deben reaccionar fácilmente con el sitio activo de la enzima para así garantizar un intercambio eficiente de electrones entre el mediador y la enzima, además de esto, se debe tener en cuenta que la especie empleada como mediador redox debe tener una electroquímica sencilla, conocida y reversible sobre la superficie del electrodo de trabajo, sin embargo, la principal limitación de este tipo de biosensores enzimáticos es la dificultad para asegurar los mediadores en la superficie del electrodo.(76)

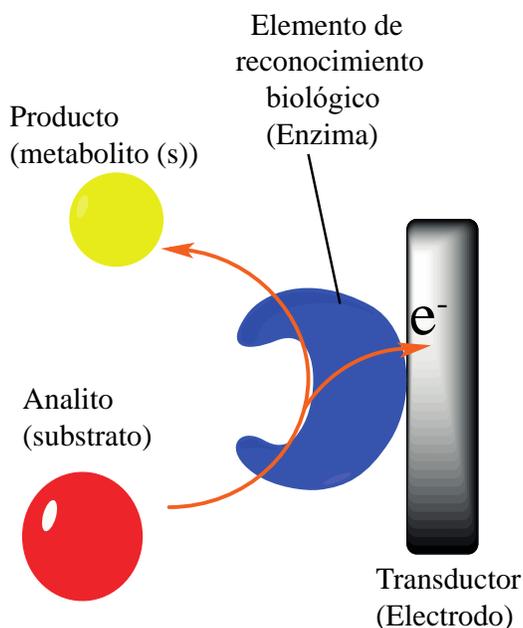
**Figura 16.** Representación gráfica del funcionamiento general de un biosensor de segunda generación. Adaptado de (56).



### 1.6.3. Biosensores enzimáticos de tercera generación:

Este tipo de biosensores enzimáticos se basan en la transferencia directa de electrones entre la enzima y el transductor electroquímico (electrodo), como se muestra en la **Figura 17**, este sistema tiene un diseño simplificado que no requiere de mediadores redox o cosustratos, además de presentar grandes ventajas sobre los biosensores de primera y segunda generación como una mayor selectividad y potenciales de trabajo cercanos al potencial de trabajo de la enzima, lo que evita las exploraciones a potenciales con valores extremos, disminuyendo así la probabilidad de detección de interferentes.

**Figura 17.** Representación gráfica del funcionamiento general de un biosensor de tercera generación. Adaptado de (56).



El diseño de biosensores enzimáticos de tercera generación debe tener en cuenta que las enzimas son sensibles a cambios en el entorno en que se encuentran, de esta manera se puede presentar alteración en la conformación de la enzima, desnaturalización y pérdida de actividad catalítica de la enzima luego del contacto de esta con la superficie del electrodo, por tanto, la técnica de inmovilización de la enzima es un factor clave en el diseño eficiente de este tipo de biosensores.(76) Respecto a las técnicas de inmovilización, estas serán abordadas en el siguiente apartado.

## 1.7. Métodos de inmovilización de enzimas sobre la superficie del electrodo.

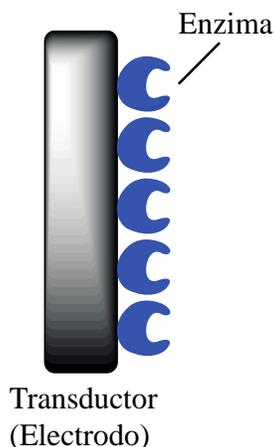
El rendimiento de un biosensor electroquímico basado en enzimas se puede limitar por la inestabilidad de las mismas, es por esta razón que un factor clave en la fabricación de este tipo de electrodos es el método de inmovilización usado, influyendo directamente sobre la sensibilidad, robustez, estabilidad en el medio ambiente y en los medios de prueba (77).

A continuación se presentan cuatro métodos de inmovilización enzimática: adsorción, unión covalente, atrapamiento/encapsulamiento y entrecruzamiento (77).

### 1.7.1. Adsorción:

Consiste en uniones enzima-electrodo débiles basadas en fuerzas intermoleculares como las fuerzas de Van der Waals, iónicas,  $\pi$ -  $\pi$  o puentes de hidrógeno (77). Es el tipo de inmovilización más sencilla y en la que se generan uniones más débiles, siendo estas uniones favorecidas por la afinidad estructural del material depositado con el material del electrodo (como se muestra en la **Figura 18**), por lo que tanto el material del electrodo como los grupos funcionales del material depositado tienen gran relevancia en este método.

**Figura 18.** Inmovilización de enzima por método de adsorción. Adaptado de (56).



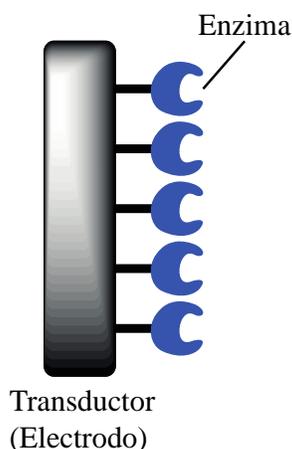
### 1.7.2. Unión covalente:

Este método genera uniones estables, lo cual se logra mediante la activación de grupos químicos sobre la superficie del electrodo para que generen una unión covalente con los

grupos de la molécula que se pretende estabilizar sobre la superficie del electrodo, tal como se muestra en la **Figura 19**. Pese a sus grandes ventajas, este método tiene mayor complejidad (77).

De acuerdo con lo anterior, la unión covalente aprovecha los grupos funcionales superficiales de la enzima como cadenas laterales de amino (Lys), tiol (Cys) o ácido carboxílico (Asp, Glu) y dicha unión se da gracias al uso de activadores como glutaraldehído o carbodiimidas (**ver apartado 1.8.**). La unión covalente puede mejorar la orientación de la enzima y su sitio activo, sin embargo, entre las desventajas que presenta se pueden mencionar alteraciones en la conformación de la enzima que pueden verse reflejadas en disminución de la actividad catalítica y la estabilidad. (76)

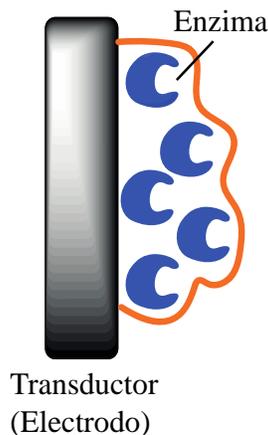
**Figura 19.** Inmovilización de enzima por método de unión covalente. Adaptado de (56).



### 1.7.3. Atrapamiento/encapsulamiento:

En este método la enzima es inmovilizada y estabilizada dentro de una red polimérica, siendo usados hidrogeles, polímeros conductores, sol-geles, etc. que deben ser permeables para permitir la interacción del receptor bioquímico con el analito, además debe garantizar una conductividad eficiente para que tras la unión se puede inducir la reacción esperada (77).

**Figura 20.** Inmovilización de enzima por método de atrapamiento/encapsulamiento.  
Adaptado de (56).

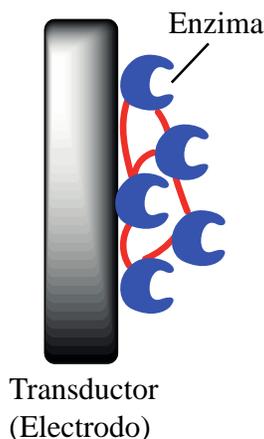


Básicamente en esta forma de inmovilización la enzima se queda atrapada físicamente y estabilizada en direcciones no controladas dentro de la red polimérica, como se muestra en la **Figura 20**, esto a su vez constituye su principal desventaja, dado que la orientación de la enzima no es controlable por tal razón la actividad catalítica de la enzima inmovilizada se puede ver limitada por una orientación no favorable, además, al encontrarse libremente en una red polimérica se puede presentar separación entre la enzima y la superficie del electrodo, disminuyendo así la actividad enzimática.(77)

#### **1.7.4. Reticulación/entrecruzamiento:**

Se basa en la unión del receptor bioquímico a la superficie del electrodo a través de un enlazador químico bifuncional, es decir, que posee un grupo funcional que permite entrecruzar moléculas de enzima con otras mediante la formación de enlaces covalentes, como también a la superficie del electrodo, tal como se muestra en la **Figura 21**. Entre los grupos bifuncionales utilizados se encuentran el glutaraldehído, tiourea, glioxal, imidoésteres, polipirrol, L-cisteína, entre otros, siendo el glutaraldehído el enlazador químico más conocido. Este tipo de inmovilización da lugar a electrodos muy estables, disminuye la pérdida de enzima de la superficie del electrodo y mejora la concentración enzimática superficial, sin embargo, los procesos experimentales suelen ser complicados.(77)

**Figura 21.** Inmovilización de enzima por método de reticulación/entrecruzamiento. Adaptado de (56).



### 1.8. Unión covalente mediante electrografting

La modificación de electrodos requiere de un previo estudio de los materiales y los métodos que se emplearán (80), especialmente si se trata de la preparación de biosensores donde dicha unión del agente de reconocimiento biológico a la superficie del electrodo debe caracterizarse por un eficiente intercambio de señales eléctricas, con alta estabilidad de la unión superficie de electrodo de trabajo-capa orgánica y con reproducibilidad en su aplicación.

De acuerdo con las diferentes técnicas de inmovilización tratadas con anterioridad se pueden clasificar entre técnicas de inmovilización físicas y químicas. Entre las técnicas de inmovilización física se tiene la de adsorción como la más sencilla y económica, sin embargo, el componente adsorbido puede lixiviar de la superficie del electrodo con facilidad debido a las uniones débiles en las que se basa, además de caracterizarse por una baja reproducibilidad y sensibilidad.

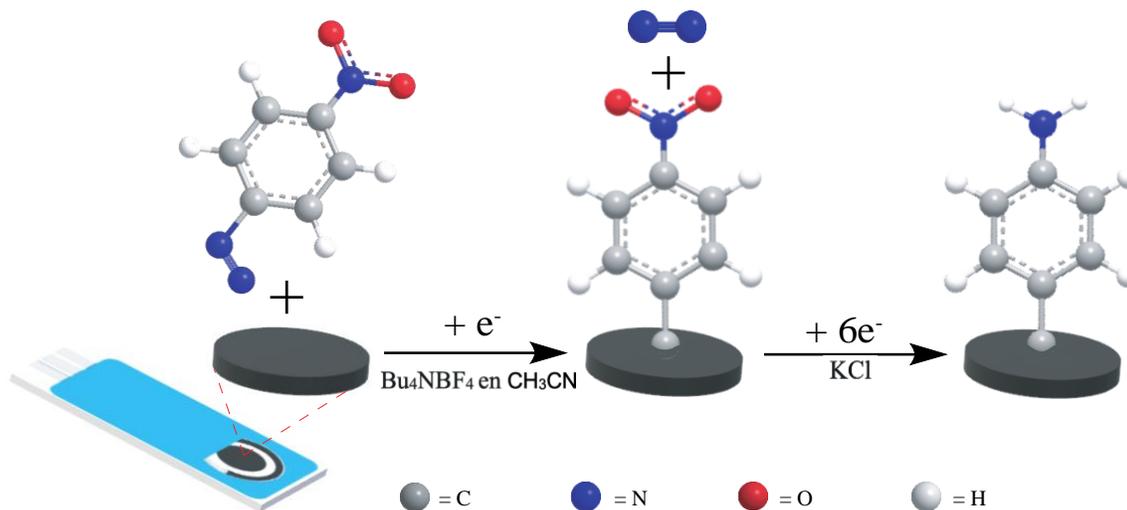
Otra técnica de inmovilización física es la de atrapamiento/encapsulamiento que permiten mejorar la estabilidad del componente de reconocimiento biológico de la superficie del electrodo, pero que al tratarse de un sistema que integra una capa inmovilizadora permeable permitiría la filtración de moléculas de tamaño pequeño, además de que la presencia del recubrimiento inmovilizador podría obstaculizar la unión de afinidad del receptor biológico inmovilizado con el sustrato de interés.(80)

Con respecto a las técnicas de inmovilización química, la unión covalente presenta grandes ventajas sobre las técnicas de inmovilización física como la alta estabilidad del biosensor, alta sensibilidad y reproducibilidad. Entre las técnicas de unión mediante enlace covalente se han explorado ampliamente las técnicas de electrografting que consisten en una reacción electroquímica que permite la unión entre el receptor biológico a la superficie del electrodo a partir de superficies activadas que contienen restos funcionales que hacen posible la unión, lo cual implica una transferencia de electrones proveniente del generador de potencial, que

llega a la superficie del electrodo de trabajo y a su vez supe al receptor biológico de los electrones necesarios para su actividad de reconocimiento del sustrato.(81)

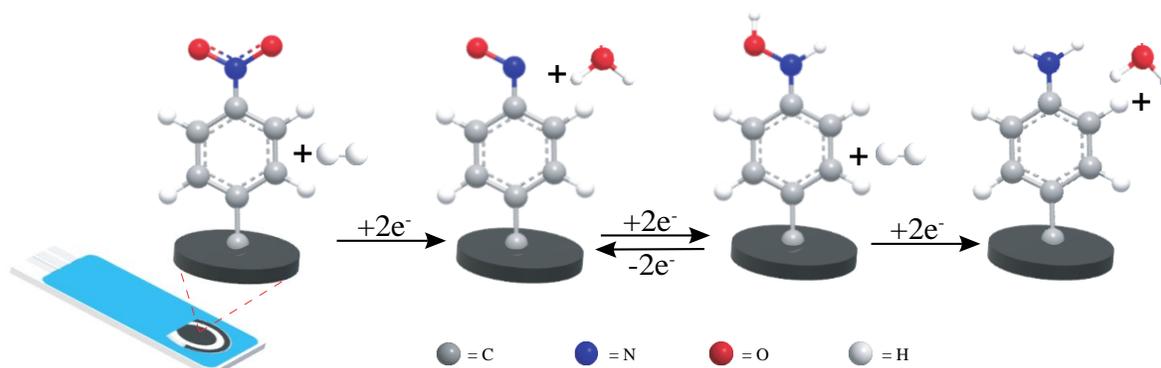
En el presente trabajo de investigación se empleó la técnica de electrografting a partir de la reducción de sales de diazonio, dicho proceso se basa en la reducción de la función diazonio de la molécula a partir de la participación de un electrón suministrado a través del electrodo en presencia de  $\text{Bu}_4\text{NBF}_4$  en  $\text{CH}_3\text{CN}$ , el electrodo en mención a su vez contiene la superficie que será modificada. Como resultado de la reducción de la función diazonio se produce escisión de  $\text{N}_2$  de la molécula involucrada, dando lugar a la formación de un radical que posteriormente se une fuertemente a la superficie del electrodo mediante enlace covalente (C-C) para generarse así una capa de grupos nitrobenzénico que posteriormente se reducen a grupos aminofenilo en presencia de solución de  $\text{KCl}$  y luego de aplicar el potencial necesario para que se lleve a cabo la reducción (**Figura 22**) (82,83)

**Figura 22.** Pasos de la funcionalización de electrodo a partir de sales de diazonio. Adaptado de (84).



La reducción de nitrobenzénico a aminobenzénico se lleva a cabo en tres pasos que son ampliamente conocidos y que se esquematiza en la **Figura 23**. En el primer paso de la reducción se genera la pérdida de un oxígeno de la función nitro a partir del aporte de 2 electrones y dos 2 equivalentes de hidrógeno, como resultado se genera una molécula de agua. En el segundo paso se genera una especie intermedia reversible correspondiente a la función hidroxilamina, que se presenta tras el aporte electrónico necesario ( $+2e^-$ ), en el tercer paso finalmente se obtiene la reducción completa del grupo nitrobenzénico.

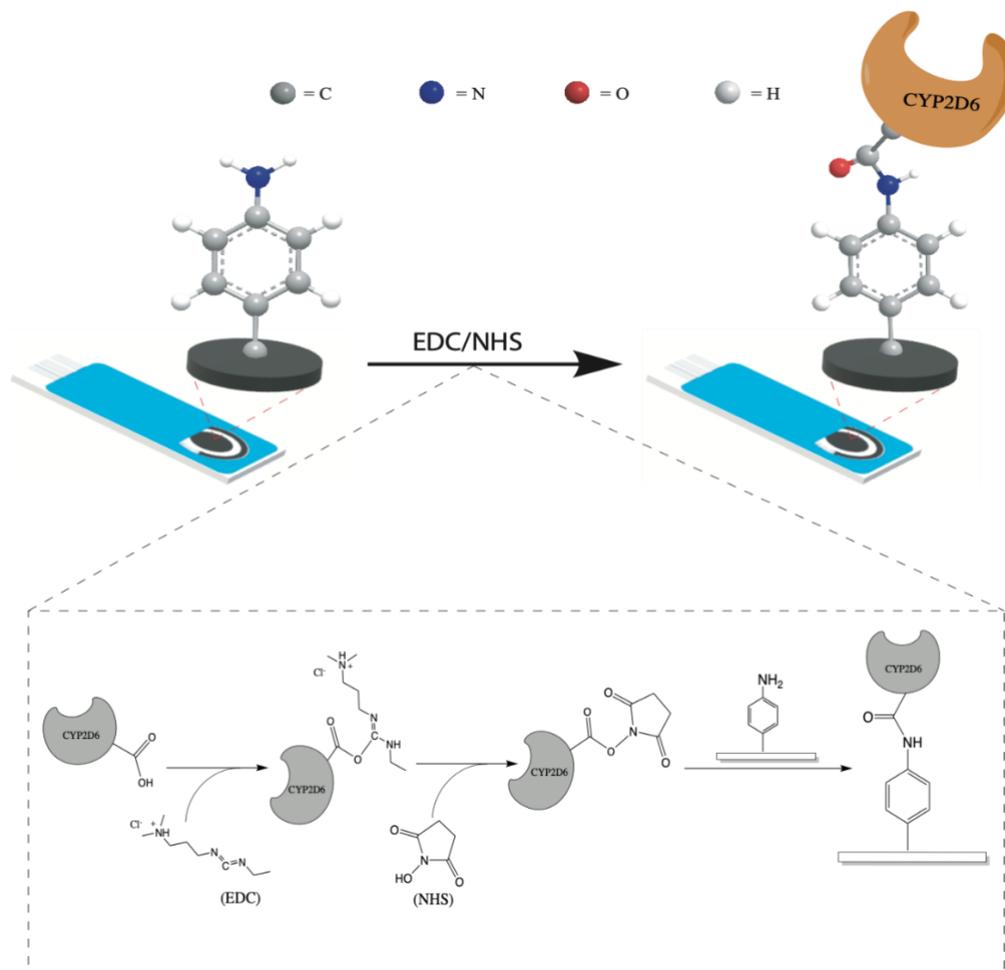
**Figura 23.** Reducción electroquímica de grupos nitro ( $\text{NO}_2$ ) a grupos amino ( $\text{NH}_2$ ). Adaptado de (84,85).



Las reacciones de acoplamiento de dos moléculas a partir de activadores como 1-(3-Dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (EDC) y N-Hidroxisuccinimida (NHS) funcionan tanto en solución como en superficies y sin necesidad de condiciones ambientales optimizadas.(86) En la presente investigación se emplearon estas dos especies químicas para generar la unión de la enzima CYP2D6, a partir de sus terminales de ácidos carboxílicos, con los grupos aminofenilo unidos covalentemente a la superficie del electrodo, dicha unión se da entonces a partir de un enlace de amida.

El mecanismo mediante el cual EDC/NHS permiten la generación del enlace amida consiste en una serie de reacciones que dan inicio con la unión de EDC con moléculas que contienen restos ácidos (función  $\text{COOH}$ ) dando como resultado una especie inestable en la cual la función ácida pasa a ser una función éster, dicha especie es reactiva frente a aminas por lo que puede formar uniones con estas, sin embargo, la adición de NHS estabiliza los ésteres activados por EDC sin perder la reactividad frente a aminas, lo cual mejora la capacidad de acoplamiento, a la vez que aumenta la solubilidad del éster activado y del grupo saliente, lo que permite la eliminación de residuos y enzima no enlazada de la superficie del electrodo luego de la reacción de acoplamiento.(86) En la **Figura 24** se describe gráficamente el mecanismo mencionado.

**Figura 24.** Mecanismo de unión de CYP2D6 a superficie de electrodo mediado por activadores EDC y NHS. Adaptado de (84).



## **2. Justificación**

La detección de 3,4-Metilendioximetanfetamina (MDMA) y  $\alpha$ -pirrolidinopentiofenona ( $\alpha$ -PVP), ya sea individualmente o como matrices mixtas, mediante técnicas electroquímicas aun conserva mucho por explorar, especialmente en la detección a partir de biosensores electroquímicos basados en isoformas del citocromo P450, enfoque para el cual no se encuentran hasta la actualidad reportes en la literatura científica con los analitos de interés en el presente estudio, según lo consultado.

Es de destacar que la aplicación de la electroquímica a la detección de sustancias psicoactivas es una alternativa novedosa y razonable, entre sus ventajas incluyen alta sensibilidad, selectividad hacia especies electroactivas, un amplio rango lineal, instrumentación portátil y de bajo costo, capacidad de especiación y una amplia gama de electrodos que permiten ensayos en entornos inusuales (55,87). Adicionalmente, las técnicas electroquímicas pueden alcanzar límites de detección extremadamente bajos, del rango nanomolar (55), comparables a los obtenidos con los procedimientos cromatográficos (88,89), con volúmenes de muestras muy pequeños (5-20  $\mu$ L) (55), lo cual es un factor muy importante en ambientes complejos, como por ejemplo en su aplicación en escenarios forenses donde las evidencias se pueden encontrar en cantidades muy pequeñas. A lo anterior se le puede sumar la alta sensibilidad y especificidad del citocromo P450 por sus sustratos (67), lo cual además de permitir la detección de los analitos de interés permitiría eliminar la interferencia de especies que no son sustratos de la enzima empleada en el biosensor electroquímico.

Es evidente el aumento del interés por aplicar este tipo de técnicas a la detección de sustancias psicoactivas (7), aún mas frente al contexto actual en el que se encuentra la problemática del consumo de drogas de abuso, con agravantes como la gran diversidad de sustancias, la adulteración/suplantación y el policonsumo, razón por la que el presente estudio es una contribución a la base científica reportada, siendo el primer reporte de este tipo en Colombia, con potencial aplicabilidad en escenarios reales para hacer frente a una problemática de carácter mundial.

### **3. Objetivos**

#### **3.1. Objetivo general**

- Detectar  $\alpha$ -Pirrolidinopentiofenona ( $\alpha$ -PVP) y 3,4-Metilendioximetanfetamina (MDMA) a través de un electrodo modificado con la enzima CYP2D6.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Modificar electrodos serigrafiados de carbono con la enzima CYP2D6 para el desarrollo de un biosensor electroquímico
- Caracterizar el biosensor electroquímico a través de pruebas de inhibición con quinidina.
- Aplicar técnicas electroquímicas para la caracterización del electrodo modificado
- Determinar el límite de detección (LDD) y de cuantificación (LDC) en la detección electroquímica de  $\alpha$ -Pirrolidinopentiofenona ( $\alpha$ -PVP) y 3,4-Metilendioximetanfetamina (MDMA).
- Evaluar la interferencia generada por agentes de corte en la respuesta electroquímica.

## 4. Materiales y equipos

### 4.1. Materiales

Se emplearon estándares de referencia certificados marca Cerilliant de  $\alpha$ -Pirrolidinvaleronfenona HCl ( $\alpha$ -PVP HCl) presentación de 1mg/mL como base libre en metanol, referencia P-090-1ML, y de ( $\pm$ )-Metilendioximetanfetamina (( $\pm$ )-MDMA) presentación de 1mg/mL como base libre en metanol, referencia M-013-1ML para la preparación de soluciones stock. Cafeína 98% (HPLC) grado reactivo, marca AK Scientific, referencia O926-5G para la preparación de soluciones de cafeína para análisis de interferencia de adulterantes. Se usó CYP2D6 recombinante y quinidina del Kit de ensayo de inhibición de CYP2D6 (fluorométrico), referencia (ab211079) de la marca abcam. Para inmovilización del bioreceptor a la superficie del electrodo se usó tetrafluoroborato de 4-nitrobenzodiazonio (97%) referencia 294438 de la marca Sigma-Aldrich, tetrafluoroborato de tetrabutilamonio (98%) referencia C357-25G de la marca AK Scientific, 1-(3-Dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida HCl (EDC) grado reactivo (99%) con referencia A300-25G de la marca AK Scientific y N-Hidroxisuccinimida (NHS) grado reactivo (>99%) con referencia A300-25G de la marca AK Scientific. Para la preparación del electrolito de soporte se empleó cloruro de potasio (KCl) p.a. Emsure® de la marca Merck con referencia 104936, sodio dihidrogenofosfato dihidrato p.a. Emsure® Reag. Ph Eur de la marca Merck con referencia 106342, di-sodio hidrogenofosfato dihidrato p.a. Emsure® Reag. Ph Eur de la marca Merck con referencia 106580 y ácido fosfórico (85%) p.a. Emsure® ACS, ISO, Reag. Ph Eur de la marca Merck con referencia 100573. Como solventes se emplearon Acetonitrilo P.A. Emsure® grado ACS, Reag. Ph Eur de la marca Merck con referencia 100003, Etanol absoluto p.a. Emsure® grado ACS, ISO, Reag. Ph Eur de la marca Merck con referencia 100983 y agua desionizada tipo 1 con resistividad de 18.2 M $\Omega$ /cm.

Se usó un sistema de tres electrodos serigrafados (Electrodo de trabajo de carbono con un área de 4 mm, electrodo auxiliar de carbono y electrodo de referencia de Ag/AgCl) de la marca Metrohm, línea DropSens, con referencia C11L, para la conexión al equipo se usó un conector de cable para electrodos serigrafados con referencia DSCAC de la marca Metrohm y las medidas voltamperométricas se llevaron a cabo en una celda para electrodos serigrafados de la marca Metrohm con referencia DSCELL.

### 4.2. Equipos

Las medidas voltamperométricas se tomaron con un potenciostato con galvanostato integrado 797 VA Computrace de la marca Metrohm a través del programa 797 VA Computrace software en un sistema Windows XP. Tanto el equipo como el montaje necesario para el uso de electrodos serigrafados (celda para electrodos serigrafados y cable para electrodos serigrafados) se muestran en la **Figura 25**.

**Figura 25.** Stand de medida voltamperométrico 797 VA Computrace con accesorios para uso de electrodos serigrafados. Fuente: autor.



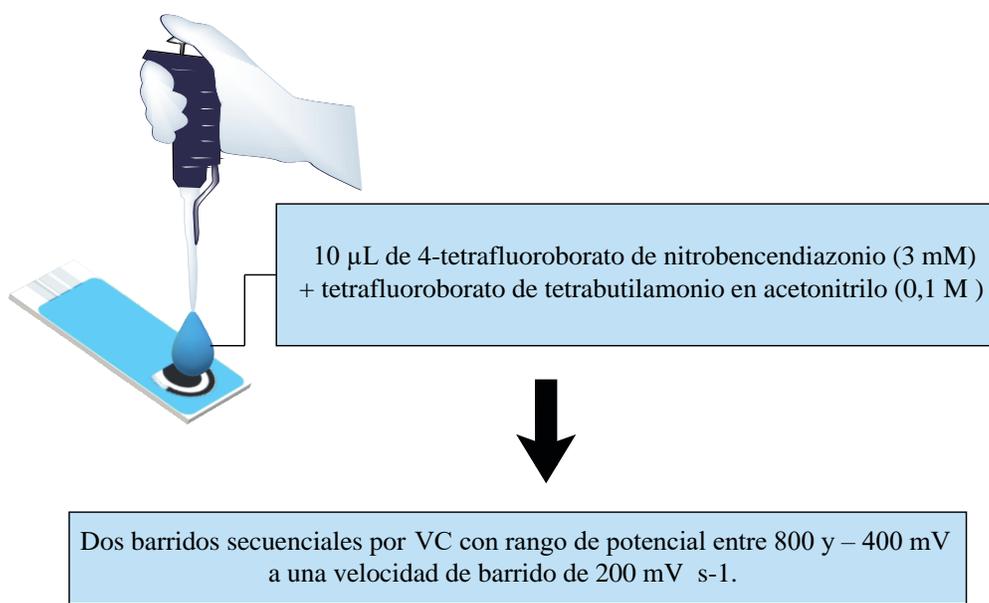
## 5. Métodos

### 5.1. Preparación del biosensor electroquímico

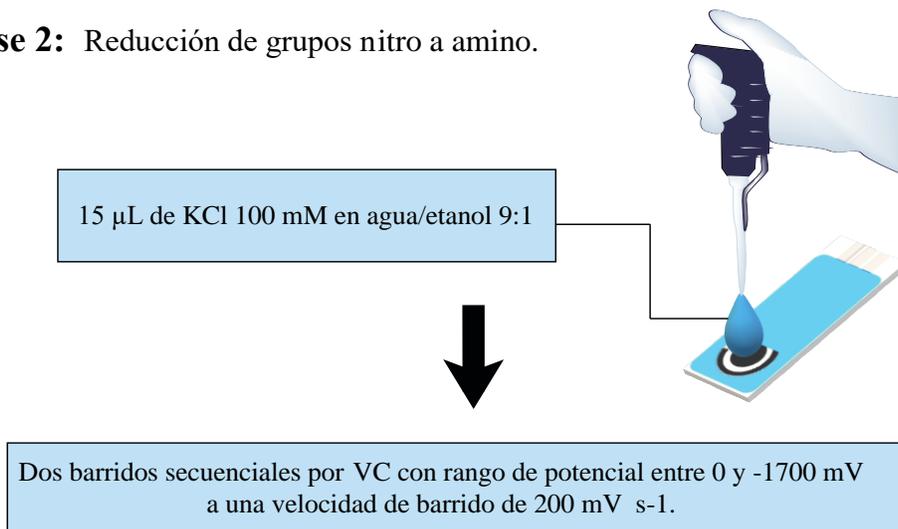
El protocolo establecido para el desarrollo del presente estudio está basado en las metodologías reportadas por Asturias-Arribas *et al.* (90,91) y Alonso-Lomillo *et al.* (92). El cual consiste en dos etapas: Funcionalización del electrodo serigrafado de carbono e inmovilización de enzimas CYP2D6 a través de un enlace covalente.

**Figura 26.** Fase 1 y 2 de la preparación del biosensor electroquímico. Fuente: autor.

**Fase 1:** Enlace entre sal de diazonio y la superficie del electrodo de trabajo.

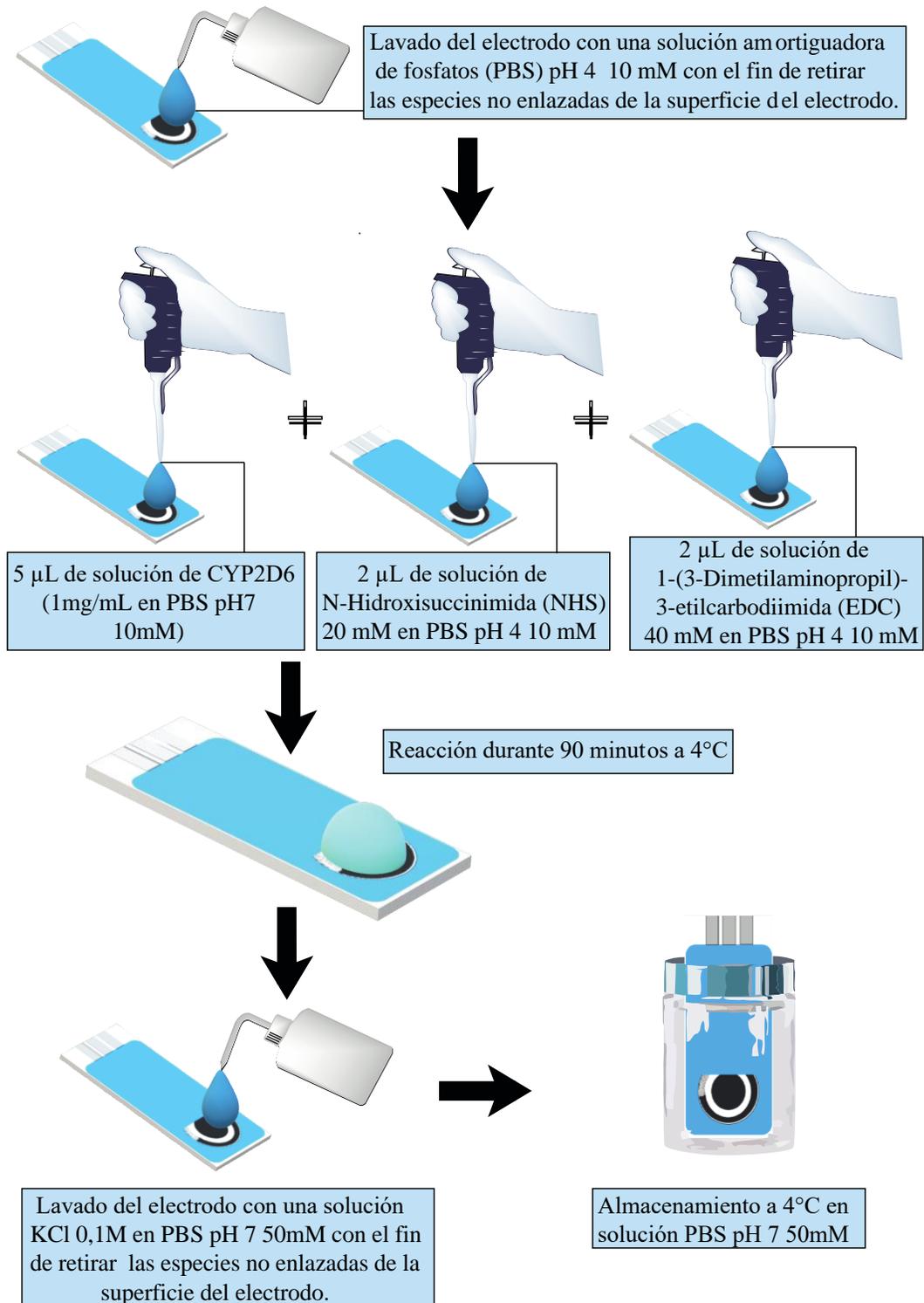


**Fase 2:** Reducción de grupos nitro a amino.



**Figura 27.** Fase 3 de la preparación del biosensor electroquímico. Fuente: autor.

**Fase 3:** Unión covalente de CYP2D6.



## 5.2. Optimización de parámetros experimentales

El procedimiento de optimización de las condiciones experimentales consistió en la evaluación de la respuesta electroquímica del biosensor variando los parámetros amplitud de pulso, tiempo de pulso, tiempo de paso de voltaje y pH del electrolito de soporte. Los parámetros amplitud de pulso, tiempo de pulso y tiempo de paso de voltaje se optimizaron en un rango de potencial de 0 a -1000 mV, empleando como electrolito una solución 0,05 M de PBS pH 7 en ausencia de analito. El parámetro pH del electrolito de soporte se optimizó en un rango de potencial de 0 a -1000 mV, en ausencia de analitos y con soluciones con concentración 0,5  $\mu$ M de los analitos de interés para el estudio ( $\alpha$ -PVP y MDMA) en soluciones 0,05 M de PBS con pH de 4 a 10. En todos los casos las medidas se realizaron en una celda electroquímica para electrodos serigrafados empleando volúmenes de 5 mL.

**Tabla 1.** Parámetros tenidos en cuenta en la optimización y rango de valores evaluados.

Parámetro	Rango evaluado
Amplitud de pulso (V)	0,04 a 0,2
Tiempo de pulso (s)	0,02 a 0,12
Tiempo de paso de voltaje (s)	0,2 a 1,6
pH de solución buffer fosfato	4 a 10

El criterio para seleccionar los valores óptimos en los parámetros amplitud de pulso, tiempo de pulso y tiempo de paso de voltaje se basó en la relación altura del pico (A) vs valores del parámetro evaluado, de esta manera se seleccionaron los valores de los parámetros en los cuales el pico voltamperométrico presenta una mayor altura.

Para la selección del valor óptimo de pH del electrolito de soporte se evaluaron tres parámetros:

- **Intensidad de la corriente de pico basal del biosensor:** Consistió en seleccionar el valor de pH al cual se presenta un pico catódico con valores más altos de corriente de pico en ausencia de analitos.
- **Separación de los picos voltamperométricos ( $\Delta E$ ):** Mediante la aplicación de la **Formula 1** se calculó el valor de  $\Delta E$  que tiene como finalidad cuantificar el grado de cercanía entre dos picos catódicos, esto con el fin de seleccionar el valor de pH en el cual se presenta una mayor separación entre picos con el fin de evitar superposición y solapamiento de picos, por tanto entre más alto es el valor de  $\Delta E$  mayor es la separación entre picos.

**Formula 1.** Formula para el calculo de  $\Delta E$ .

$$\Delta E = |E_1 - E_2|$$

$E_1$ = potencial de pico (mV) de la señal menos catódica.

$E_2$ = potencial de pico (mV) de la señal mas catódica.

- **Intensidad de la corriente de pico tras la adición de analito:** consistió en seleccionar el valor de pH en el cual, tras la adición de analito, se presentó un mayor aumento en los valores de corriente de pico catódico, en comparación con los valores obtenidos en las medidas realizadas sin la presencia de analito en la celda.

### 5.3. Caracterización electroquímica

Con el fin de confirmar la correcta preparación del biosensor electroquímico, es decir, la unión de la enzima CYP2D6 a la superficie del electrodo, se realizaron dos pruebas: la primera consistió en una prueba con la cupla ferro/ferricianuro de potasio para evidenciar mediante VC el grado de modificación del electrodo en las diferentes etapas de la preparación del biosensor electroquímico mediante el análisis de las señales obtenidas en los voltamperogramas. La segunda prueba buscó evaluar la respuesta de la enzima inmovilizada sobre la superficie del electrodo frente a un inhibidor de esta.

#### 5.3.1. Caracterización a través de la cupla Ferrocianuro/Ferricianuro de potasio

Se realizaron escaneos mediante voltamperometría cíclica (VC) en el rango de -1000 mV a 1000 mV a una solución 0,05M de Ferrocianuro/Ferricianuro de potasio ( $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$ ) en solución 0,1M de KCl empleando electrodos serigrafiados de carbono en las diferentes etapas de la funcionalización: Electrodo desnudo (C-SPE), electrodo funcionalizado con grupos nitro (C-SPE-NO<sub>2</sub>), electrodo funcionalizado con grupos amino tras la reducción de grupos nitro (C-SPE-NH<sub>2</sub>), y finalmente el sistema con la enzima enlazada covalentemente (C-SPE-CYP2D6). Los voltamperogramas se registraron por triplicado.

#### 5.3.2. Caracterización con inhibidor quinidina

Se exploró mediante voltamperometría diferencial de pulso (VDP) la respuesta inhibitoria generada por quinidina en el biosensor desarrollado en una ventana de potencial de 0 a -1000 mV, para ello se reconstituyó la quinidina liofilizada incluida en el kit de ensayo de inhibición de CYP2D6 (fluorométrico), referencia (ab211079) de la marca abcam en 115  $\mu$ L de acetonitrilo y a partir de esta solución madre se realizaron diluciones usando solución buffer fosfato salino a pH 8 como solvente, de esta manera se prepararon soluciones de quinidina

con concentraciones 0,05mM, 0,1mM, 0,2mM y 0,4mM. El grado de inhibición se midió mediante la comparación de los voltamperogramas de inhibición frente al voltamperograma del biosensor sin la adición de inhibidor (blanco), registrando las corrientes de pico obtenidas y analizando el grado de inhibición en términos de porcentaje de inhibición mediante la aplicación de la **Formula 2**.

**Formula 2.** Cálculo de porcentaje de inhibición.

$$I\% = \left( \frac{I_1 - I_2}{I_1} \right) \times 100$$

$I_1$ = Corriente de pico del blanco (respuesta de C-SPE-CYP2D6 frente a solución 0,05 M de PBS pH 8 sin adición de quinidina).

$I_2$ = Corriente de pico obtenida tras la adición de quinidina (quinidina en solución 0,05 M de PBS pH 8)

#### 5.4. Respuesta electroquímica del biosensor enzimático frente a $\alpha$ -PVP y MDMA

Se registró la respuesta electroquímica del biosensor frente a los analitos  $\alpha$ -PVP y MDMA individualmente mediante voltamperometría diferencial de pulsos (VDP) en una ventana de potencial de 0 a -1000 mV bajo condiciones optimizadas. Se exploró un rango de concentración de 0,005  $\mu$ M a 5  $\mu$ M en ambos analitos, las soluciones fueron preparadas mediante método de adición estándar a partir de los respectivos estándares de referencia certificados, empleando como solvente solución 0,05 M de buffer fosfato salino a pH 8. Los voltamperogramas se registraron por triplicado ( $n=3$ ) y a partir de las corrientes de pico obtenidas se calculó un promedio y se ajustó la relación  $I_2-I_1$  ( $\mu$ A) – concentración de analito ( $\mu$ M) a un modelo de regresión lineal para luego evaluar su ajuste al modelo y calcular el límite de detección y de cuantificación. La variable  $I_2-I_1$  ( $\mu$ A) corresponde a la diferencia entre las corrientes de pico de muestras con analito y la corriente de pico del blanco, este último corresponde a la respuesta voltamperométrica del electrolito de soporte (solución 0,05 M de buffer fosfato salino a pH 8) sin la adición de analito. La corriente de pico del blanco es un resultado del promedio de 10 medidas ( $n=10$ ).

Los límites de detección (LDD) y límites de cuantificación (LDC) se calcularon aplicando las formulas 3 y 4, respectivamente.

**Formula 3.** Cálculo de límite de detección.

$$LDD = \frac{3 * \text{Desviación estándar del blanco}}{\text{Pendiente de la curva de calibración}}$$

**Formula 4.** Cálculo de límite de cuantificación.

$$LDC = \frac{10 * \text{Desviación estándar del blanco}}{\text{Pendiente de la curva de calibración}}$$

## 5.5. Evaluación de efecto de adulterantes en la respuesta electroquímica del biosensor frente a $\alpha$ -PVP y MDMA

El estudio del efecto generado por adulterantes en la respuesta electroquímica del analito de interés se llevó a cabo mediante el registro por triplicado de la respuesta electroquímica de del biosensor mediante voltamperometría diferencial de pulsos frente a las matrices binarias mostradas en la **Tabla 2**:

**Tabla 2.** Matrices binarias estudiadas.

Matriz 1	$\alpha$ -PVP (0,05 $\mu$ M) + MDMA (0,05 $\mu$ M)
Matriz 2	$\alpha$ -PVP (0,05 $\mu$ M) + Cafeína (5mM)
Matriz 3	MDMA (0,05 $\mu$ M) + Cafeína (5mM)

Los voltamperogramas diferenciales de pulso registrados se compararon con los voltamperogramas registrados para el analito en una matriz aislada a fin de calcular el porcentaje de error relativo a partir de los valores de corriente de pico de los voltamperogramas estudiados, aplicando la **Formula 5**.

**Formula 5.** Cálculo de error relativo porcentual.

$$\delta = \left| \frac{v_A - v_E}{v_E} \right| * 100\%$$

$\delta$  = Error relativo porcentual

$v_A$  = Valor real observado (corriente de pico de la matriz binaria: analito + adulterante)

$v_E$  = Valor esperado (corriente de pico del analito en una matriz aislada)

## 6. Resultados y discusión

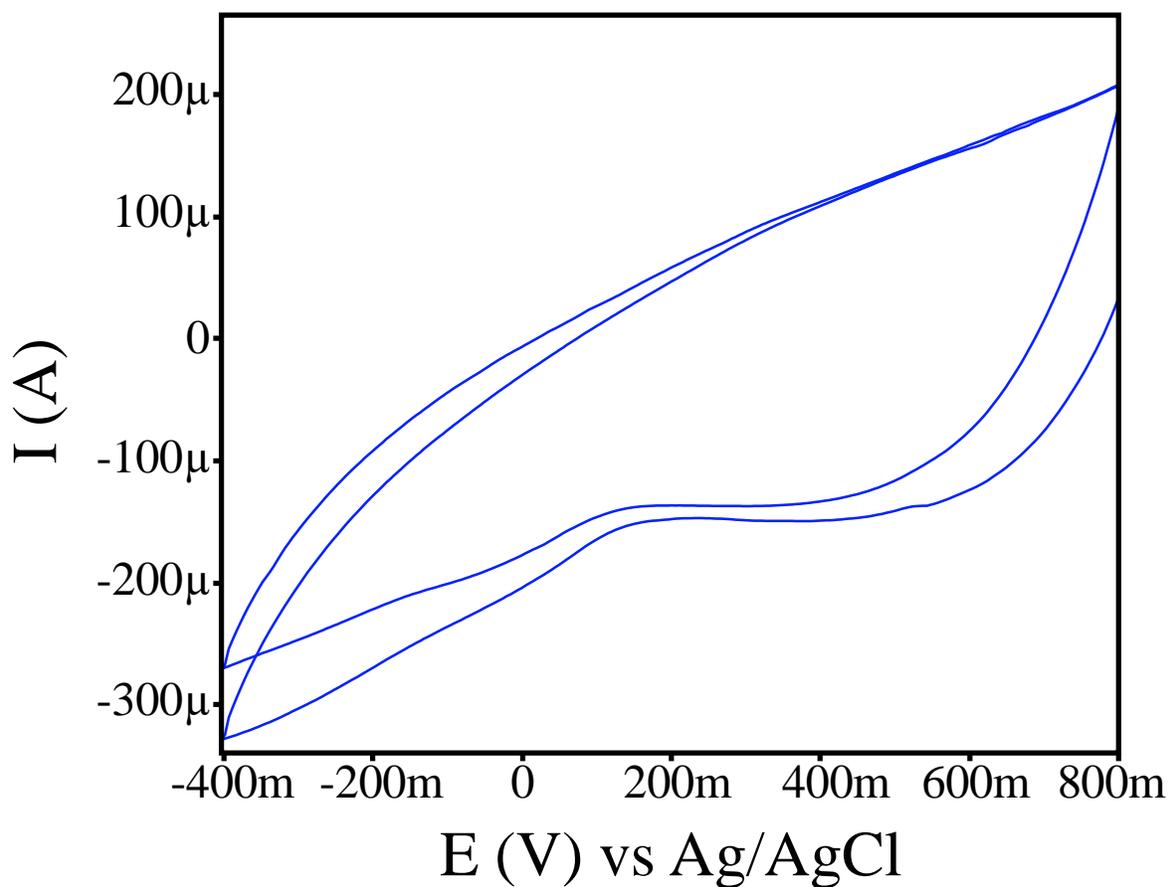
### 6.1. Preparación del biosensor

#### Fase 1

La primera fase en la preparación del electrodo consistió en la generación de una capa de grupos nitrobenzénico sobre la superficie del electrodo, dicho proceso requirió de la aplicación de dos barridos de potencial en el rango de 800 y -400 mV. La reacción que se dio lugar en esta fase de la preparación del biosensor consiste en la formación de un radical arilo que reacciona con la superficie del electrodo de trabajo para formar un enlace covalente C-C, procedimiento conocido como electrografting (**ver apartado 1.8.**) y que ha sido estudiado por diferentes autores (83,93–96).

Como evidencia del proceso de unión covalente de grupos nitrobenzénico se presenta la **Gráfica 1** que plasma los voltamperogramas cíclicos obtenidos. Se observa una amplia señal catódica (200 a 800 mV) que corresponde a la reducción de la función diazonio de tetrafluoroborato de 4-nitrobenzénico y posterior escisión del grupo dinitrógeno para dar lugar a la formación del radical arilo en un rango de potencial de 800 a -400 mV (**Figura 22**). Entre las características destacables de los voltamperogramas registrados se encuentra su naturaleza irreversible, lo cual confirma la formación de una unión covalente C-C entre el radical y la superficie de carbono del electrodo de trabajo, otra característica notable es la disminución de la corriente de pico del segundo ciclo con respecto al primero, este fenómeno se atribuye a la ocupación de la superficie del electrodo con los grupos nitrobenzénico injertados (96). Los resultados anteriormente descritos tienen relación con las observaciones reportadas por Lacroix *et al.* y recientemente por Tehrani *et al.* quienes además de observar el pico generado por la escisión del dinitrógeno de la estructura de la sal de diazonio reportaron la desaparición de la señal mencionada tras aplicar varios ciclos consecutivos en VC, lo cual atribuyeron a la ausencia de procesos de reducción debido a la saturación de la superficie del electrodo de carbono con grupos nitrobenzénico (84,96). Por otra parte, la disminución en la intensidad del pico catódico se puede relacionar también con la formación de multicapas, fenómeno estudiado y reportado por Phal *et al.* (97) y que puede ser el generador de un bloqueo de la superficie del electrodo con multicapas de las especies injertadas, por tal razón, en el presente estudio se realizaron solo dos ciclos de VC en la fabricación de los biosensores para evitar este fenómeno y favorecer la formación de monocapas.

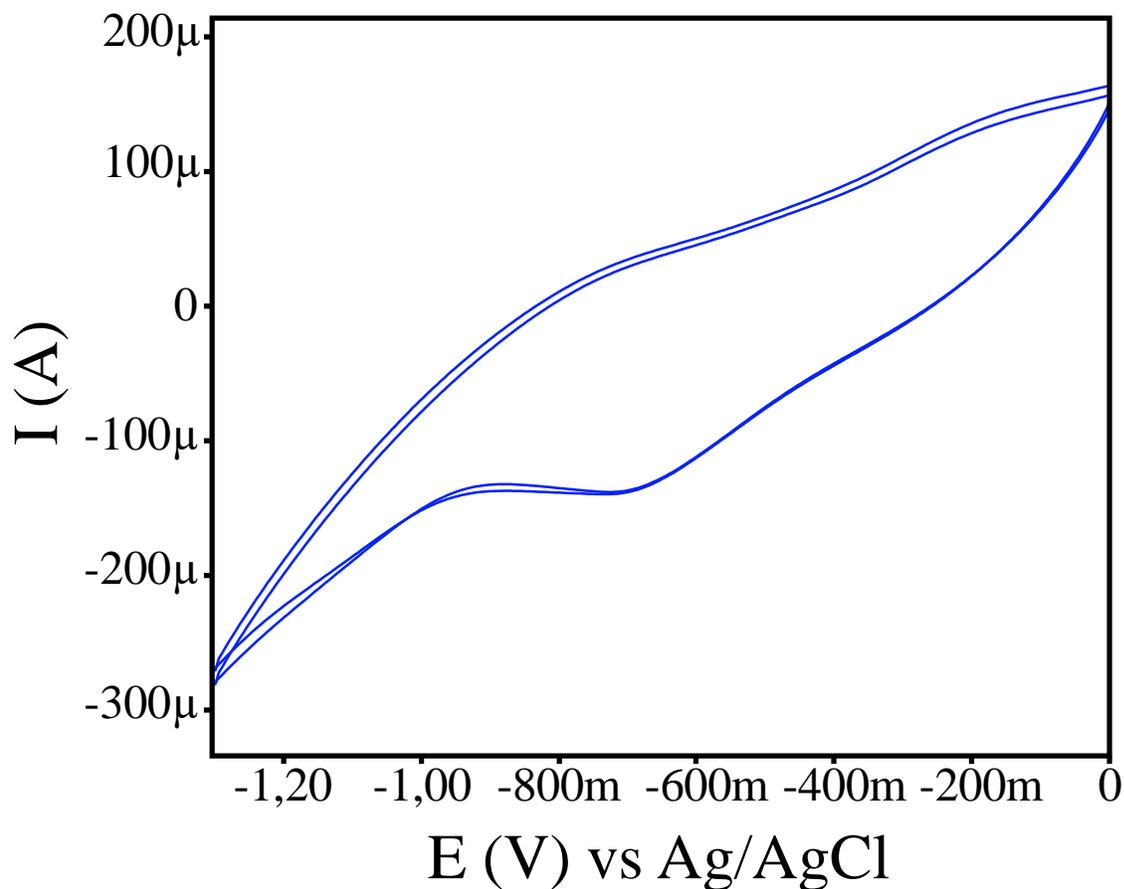
**Gráfica 1.** Electrorreducción de función diazonio mediante voltamperometría cíclica (ventana de potencial: 800 a -400 mV; velocidad de barrido: 200 mV s<sup>-1</sup>).



## Fase 2

La segunda fase consistió en la reducción de la función nitro de la capa nitrobenzeno unida covalentemente a la superficie del electrodo, como resultado se obtiene una capa de grupos aminobenceno (**Figura 23**). La reducción electroquímica mencionada se llevó a cabo mediante la aplicación de dos ciclos voltamperométricos en un rango de 0 a -1700 mV y se registra en la **Gráfica 2**, como resultado se obtiene un pico catódico cercano a ~ -700 mV que corresponde a la reducción de la función nitro a amino.

**Gráfica 2.** Electrorreducción de nitrobenzeno a aminobenceno mediante voltamperometría cíclica (Ventana de potencial: 0 a -1700 mV; velocidad de barrido: 200 mV s<sup>-1</sup>).



En la tercera fase de la preparación del biosensor se llevó a cabo la unión de la enzima CYP2D6 mediante unión tipo amida a los grupos amino que recubren la superficie del electrodo, esta unión permite una sólida inmovilización de la enzima mediante el mecanismo descrito en la **Figura 24**, sin embargo, para tener la certeza de dicha unión se debe caracterizar el sistema, lo cual se discutirá en el apartado **6.2**.

## 6.2. Caracterización electroquímica

### 6.2.1. Caracterización a través de la cupla Ferrocianuro/Ferricianuro de potasio

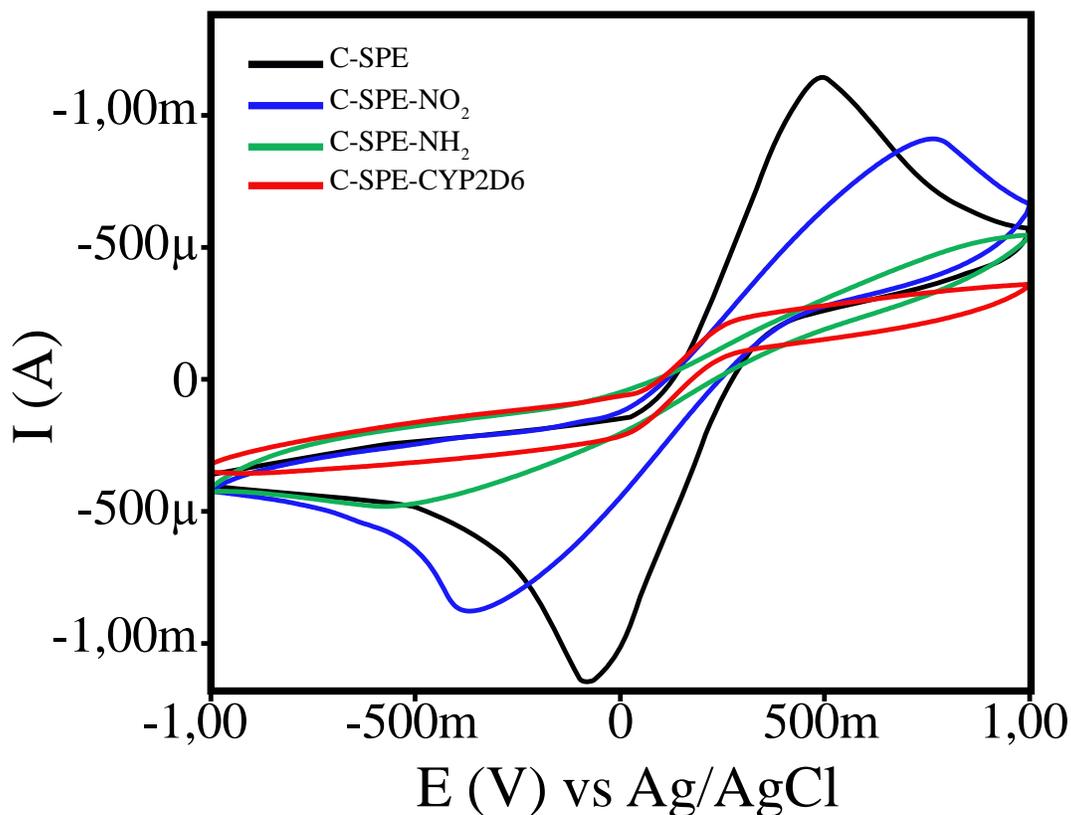
La caracterización mediante la cupla ferro/ferricianuro de potasio permitió evidenciar el grado de modificación del electrodo, esto implica que se evaluó el comportamiento de la cupla en mención en las diferentes etapas de la modificación del electrodo, para referenciar los sistemas evaluados en virtud del grado de modificación se les asignó nombres característico, así pues, al electrodo desnudo que corresponde a la fase cero de la

modificación se le denominó C-SPE, al electrodo en la primera fase de modificación se le denominó C-SPE-NO<sub>2</sub> haciendo referencia a la formación de una capa de grupos nitrobenzoceno unidos mediante enlace covalente a la superficie de carbono del electrodo, por su parte, al electrodo resultante de la segunda fase de modificación se le denominó C-SPE-NH<sub>2</sub> haciendo referencia a la reducción de los grupo nitrobenzoceno a grupos aminobenceno, por último, al sistema funcionalizado con la enzima CYP2D6 mediante unión covalente se le denominó C-SPE-CYP2D6.

La cupla Ferro/Ferri permite caracterizar el grado de modificación de un electrodo mediante la obtención de curvas corriente-voltaje que permiten evaluar el grado de electroactividad de la cupla frente al sistema evaluado, este sistema es ampliamente conocido y aplicado en el campo de la electroquímica, en general el proceso se basa en la oxidación-reducción de las especies de hierro [Fe(CN)<sub>6</sub>]<sup>-3/-4</sup>. En sistemas donde la modificación del electrodo tiene como objeto la mejora de la transferencia electrónica se obtendrá un aumento en la intensidad del pico de corriente anódico y catódico, como en el caso de la modificación con nano materiales (98), sin embargo, en sistemas de mayor selectividad como los sistemas biológicos empleados como elementos de reconocimiento en los biosensores (como enzimas, bacterias, anticuerpos, entre otros) se espera que la intensidad de los picos disminuya conforme aumenta el grado de modificación del electrodo, esto se debe a que la dupla ferro/ferri no es un sustrato del biorreceptor, por tal razón no se espera una interacción entre ambas partes.

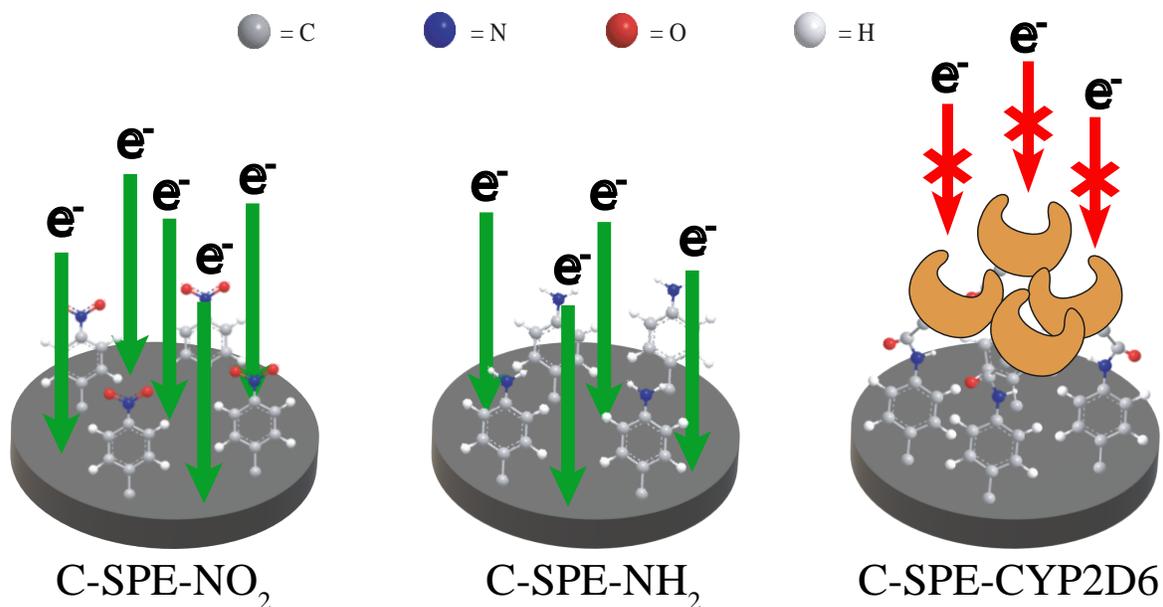
En la **Gráfica 3** se pueden observar los VCs obtenidos en la caracterización electroquímica de los electrodos en las diferentes fases de modificación, en esta se puede observar una disminución progresiva de las corrientes, tanto del pico anódico como del pico catódico, obteniendo picos más intensos en C-SPE (línea negra), una disminución de estos en el sistema C-SPE-NO<sub>2</sub> (línea azul) y C-SPE-NH<sub>2</sub> (línea verde) que está relacionado con disminución en la transferencia tanto de masa como de carga, pues en ellos se observa que además de disminuir la intensidad de los picos se observa una mayor disminución del pico anódico con respecto al pico catódico, esta diferencia de intensidad entre ambos picos sugiere una disminución de la reversibilidad en sentido anódico. Finalmente se observa la pérdida de dichos picos en el sistema C-SPE-CYP2D6 (línea roja). Los resultados obtenidos son satisfactorios, pues los VCs obtenidos con los electrodos modificados difieren notablemente del VC del electrodo desnudo (línea negra), el comportamiento electroquímico de los sistemas evaluados indica un bloqueo parcial de los sitios de transferencia electrónica en el electrodo de trabajo, pese a esto, el recubrimiento no bloquea totalmente la transferencia electrónica en los sistemas C-SPE-NO<sub>2</sub> y C-SPE-NH<sub>2</sub>, se presume que la capa injertada disminuye la cinética de transferencia de electrones, a la vez que la presencia de poros que conforman pequeños electrodos en la superficie modificada, ya sea que se comuniquen entre ellos o no, podrían influir en que la corriente de pico no desaparezca completamente.(96)

**Gráfica 3.** Voltamperogramas cíclicos registrados en una solución de PBS 0,05 M (pH 7) que contiene 0,05 M de  $K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6]$  + KCl 0,1 M con C-SPE (línea negra), C-SPE-NO<sub>2</sub> (línea azul), C-SPE-NH<sub>2</sub> (línea verde) y C-SPE-CYP2D6 (línea roja); (Ventana de potencial: -1000 a 1000 mV; velocidad de barrido: 200 mV s<sup>-1</sup>).



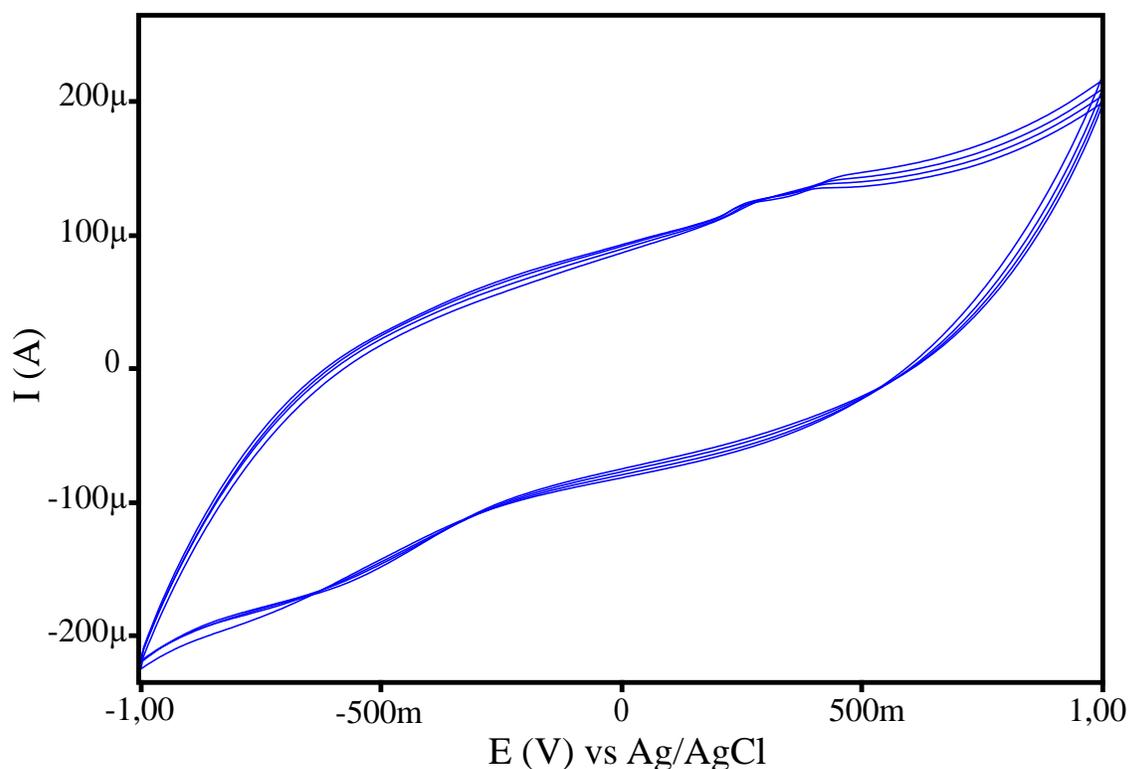
En el sistema C-SPE-CYP2D6 se presenta un bloqueo total de la superficie del electrodo, la nula respuesta voltamperométrica es una clara evidencia de la formación de una capa no conductora uniforme, pues en el caso de no presentarse una ocupación uniforme de la superficie del electrodo se presentarían picos de corriente debido a la presencia de sitios de transferencia de carga y de masa. La ocupación de la superficie del electrodo de trabajo por moléculas de gran tamaño como enzimas disminuye el área disponible sobre el cual se podrían llevar a cabo la transferencia de masa y de carga, dando como resultado una disminución notable de la intensidad de los picos de corriente de la cupla redox  $[Fe(CN)_6]^{-3/-4}$ . La **Figura 28** representa los fenómenos mencionados.

**Figura 28.** Representación de ocupación de espacios de transferencia electrónica en la superficie de electrodo de trabajo de plataformas C-SPE-NO<sub>2</sub>, C-SPE-NH<sub>2</sub> y C-SPE-CYP2D6. Fuente: autor.



Además de lo anteriormente mencionado, se debe tener en cuenta la participación del grupo prostético de la enzima inmovilizada en el sistema C-SPE-CYP2D6 en los VCs correspondientes a la caracterización mediante la cupla  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/-4}$  (línea roja de la **Gráfica 3**), pues como ya se ha mencionado (**apartado 1.5.**) la actividad catalítica del citocromo P450 se basa en el cambio de estado de oxidación del grupo hemo (Fe (III)/Fe(II)), proceso reversible en ausencia de sustrato o inhibidor y que podría generar una señal tanto anódica como catódica en los VCs. Para evaluar la influencia de esta señal en la caracterización electroquímica del biosensor se realizó una exploración mediante VC de la respuesta electroquímica del sistema C-SPE-CYP2D6 en el mismo rango de potencial y la misma velocidad de barrido de la caracterización mediante la cupla ferro/ferricianuro de potasio, usando solución de PBS 0,05 M (pH 7) pero sin presencia de la cupla en mención, el resultado de dicha evaluación se presentan en la **Gráfica 4**.

**Gráfica 4.** CVs de C-SPE-CYP2D6 en solución 0,05M de PBS pH7 (ventana de potencial: -1000 a 1000 mV; velocidad de barrido: 200 mV s<sup>-1</sup>)



Los cuatro VC's presentados en la **Gráfica 4** permiten evidenciar la ausencia de picos voltamperométricos en el sistema C-SPE-CYP2D6, lo cual no se relaciona directamente con la ausencia de la respuesta redox del grupo prostético de la enzima inmovilizada, en su lugar, esta ausencia de picos voltamperométricos se puede atribuir a la corriente de fondo que no permite observar los procesos redox, es decir, como característica inherente de la voltamperometría cíclica se sabe que la principal limitante de esta técnica es la presencia de fenómenos capacitivos (corrientes no faradáicas), especialmente a valores altos de velocidad de barrido donde conforme aumenta esta variable también aumenta la corriente faradámica y la corriente capacitiva, por lo que el resultado es que la corriente total es la suma de ambas. Por otro lado, las técnicas de pulso como la voltamperometría diferencial de pulsos (VDP) se caracterizan por minimizar los fenómenos capacitivos, esto debido a que en VDP se mide la corriente antes y después de cada pulso, siendo la señal voltamperométrica una resta de ambas corrientes, este procedimiento reduce la corriente de fondo permitiendo así la obtención de una corriente faradámica libre de corriente capacitiva, esto hace que esta técnica sea más sensible y que además permita la obtención de picos más estrechos debido a los tamaños de paso de voltaje más pequeños.(56,61) De acuerdo con lo anterior, como prueba de que la enzima inmovilizada presenta actividad redox proveniente de su grupo hemo y es observable mediante VDP se presentan en el **apartado 6.4.** los VDPs tanto de oxidación como de reducción del sistema C-SPE-CYP2D6 en solución 0,05 M de buffer pH 8 (**Gráfica 12**) donde se observan tanto el pico anódico como catódico relacionados con el fenómeno

redox del grupo hemo de la isoforma 2D6 del citocromo P450 inmovilizada sobre la superficie del electrodo, lo cual permite concluir que la respuesta del sistema C-SPE-CYP2D6 frente a la cupla ferro/ferricianuro de potasio (**Gráfica 3, línea roja**) efectivamente da información del grado de modificación del electrodo.

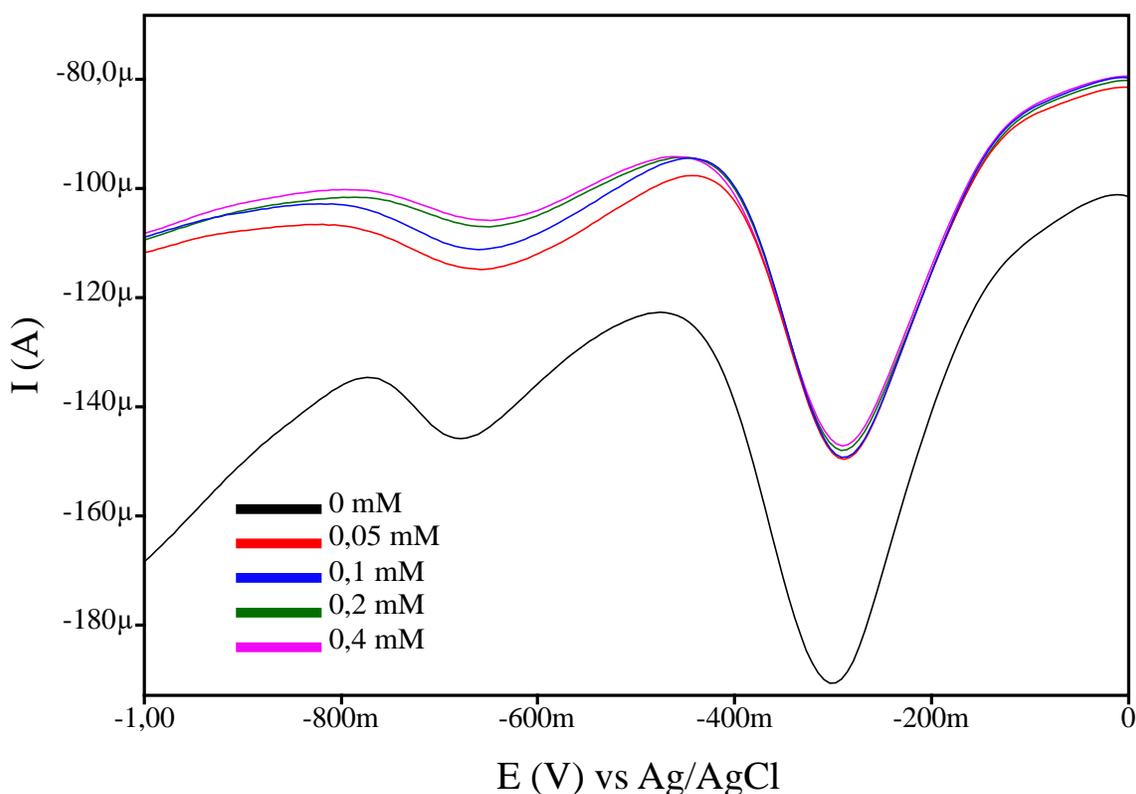
### 6.2.1. Prueba de inhibición con quinidina

La quinidina es un agente antiarrítmico clase 1, es decir, un agente que actúa a nivel del corazón mediante el bloqueo de canales de sodio, es sustrato de la isoforma CYP3A4 a diferencia de la quinina, su isómero quiral, que es sustrato de CYP2D6. De acuerdo con lo anterior, la quinidina no es metabolizada por CYP2D6 pese a que presenta características estructurales propias de los sustratos de esta isoenzima, como un átomo de nitrógeno polar y una región hidrófoba plana (anillo aromático), en su lugar la quinidina es un inhibidor competitivo de CYP2D6, siendo el efecto inhibitorio resultado de una unión muy similar a la que se presenta con sustratos de la enzima en mención, pues la quinidina se une estrechamente al sitio activo de la enzima pero en una orientación inversa a la orientación común de los sustratos, y es así como en lugar de activarse el ciclo catalítico que metaboliza la molécula se genera un bloqueo del sitio activo de CYP2D6. Por otra parte, la unión de quinidina al sitio activo de la enzima afecta las propiedades fisicoquímicas de esta última, pues se sabe que el sitio activo de CYP2D6 libre de ligando es propenso a la desnaturalización, sin embargo, tras la unión con quinidina se genera una disminución de la flexibilidad de este sitio activo, que a la vez de otorgarle mayor resistencia a la degradación hace que dicho sitio activo repela las moléculas de agua. (99,100)

En el presente apartado se presentan los resultados obtenidos de las pruebas de inhibición de la enzima CYP2D6 como receptor del biosensor desarrollado frente a quinidina, la inhibición de la enzima objeto de estudio permite confirmar la modificación del electrodo con este bioreceptor, por lo tanto, una disminución de la intensidad de pico de reducción de CYP2D6 basal es una evidencia de unión de la enzima a la superficie del electrodo. En la **Gráfica 5** se presentan los VDPs obtenidos en un rango de potencial de 0 a -1000 mV, en ellos se observa claramente la disminución de la intensidad de pico con el aumento de la concentración de quinidina, de este modo, la línea de color negro con una señal a un potencial de -279 mV y con una corriente de pico de -191  $\mu\text{A}$  representa la respuesta electroquímica del sistema C-SPE-CYP2D6 en buffer fosfato pH 8 sin quinidina (respuesta del biosensor en estado basal), señal que constituye el blanco de la prueba. A continuación, se puede observar la disminución progresiva de la corriente de pico luego de exponer el biosensor electroquímico a concentraciones de 0,05 mM (línea roja) hasta 0,4 mM (línea violeta). Además de la ocupación del sitio activo de CYP2D6 con el inhibidor la disminución de la señal también se puede relacionar con la disminución de la permeabilidad de moléculas de agua, teniendo en cuenta que  $\text{O}_2$  es un cosustrato necesario en la activación del ciclo catalítico del citocromo P450, razón por la cual en las soluciones evaluadas disminuyó drásticamente la interacción del oxígeno proveniente del agua con el centro hemo de la enzima.(99,100) Por otro lado, se observó una leve disminución en la corriente de pico en los voltamperogramas obtenidos en el presente experimento, dicho fenómeno se puede relacionar con la concentración del inhibidor, pues estas estuvieron al nivel milimolar (mM) cuando en los demás experimentos que conforman el presente estudio se emplearon concentración en el rango micromolar ( $\mu\text{M}$ ),

esto podría causar que las concentraciones de inhibidor fueran muy altas y por tal razón no se pudiese observar un cambio notorio en las corrientes de pico generadas por la saturación del sitio de unión en la enzima. En cuanto al comportamiento del pico catódico correspondiente a la reducción electroquímica del sitio activo de CYP2D6, este mostró tener un comportamiento similar al reportado por Iwuoha *et al.* en su estudio de un biosensor electroquímico basado igualmente en la isoforma CYP2D6, el cual en presencia de paroxetina mostró una disminución de la corriente de pico a valores por debajo del obtenido por el biosensor en ausencia de inhibidor.(101)

**Gráfica 5.** VDPs de C-SPE-CYP2D6 frente a diferentes concentraciones de quinidina (Amplitud de pulso: 200 mV, Tiempo de pulso: 0,12 s, Tiempo de paso de voltaje: 0,5 s).



Para determinar el grado de inhibición se aplicó la **Formula 2** de acuerdo a la metodología establecida en el **apartado 5.3.2.** con el fin de obtener los porcentajes de inhibición a partir de las corrientes de pico a diferentes concentraciones de inhibidor con respecto a la señal de referencia del blanco ( $-191 \mu\text{A}$ ), de esta manera la fórmula se basa en obtener el delta de corriente que resulta de la resta del valor en  $\mu\text{A}$  de la corriente de pico del blanco ( $I_1$ ) y el valor de corriente de pico de la concentración respectiva de inhibidor adicionado ( $I_2$ ), el valor obtenido se divide por  $I_1$  y el resultado se multiplica por 100. En la **Tabla 3** se presentan los datos correspondientes a las concentraciones y corrientes de pico evaluadas, y los porcentajes de inhibición obtenidos.

**Tabla 3.** Porcentaje de inhibición a diferentes concentraciones de quinidina.

Concentración (mM)	Corriente de pico ( $\mu\text{A}$ )	Porcentaje de inhibición (%)
0	-191	-
0,05	-150	21,4
0,1	-149	21,9
0,2	-148	22,5
0,4	-147	23

De acuerdo a los datos de porcentaje de inhibición obtenidos y consignados en la **Tabla 3**, se puede afirmar que los resultados en términos de caracterización fueron satisfactorios, confirmando la efectiva unión covalente de CYP2D6 a la superficie del electrodo de trabajo y evidenciando una respuesta del sistema C-SPE-CYP2D6 frente al inhibidor, lo cual demuestra la actividad de la enzima tras la unión covalente a la superficie del electrodo.

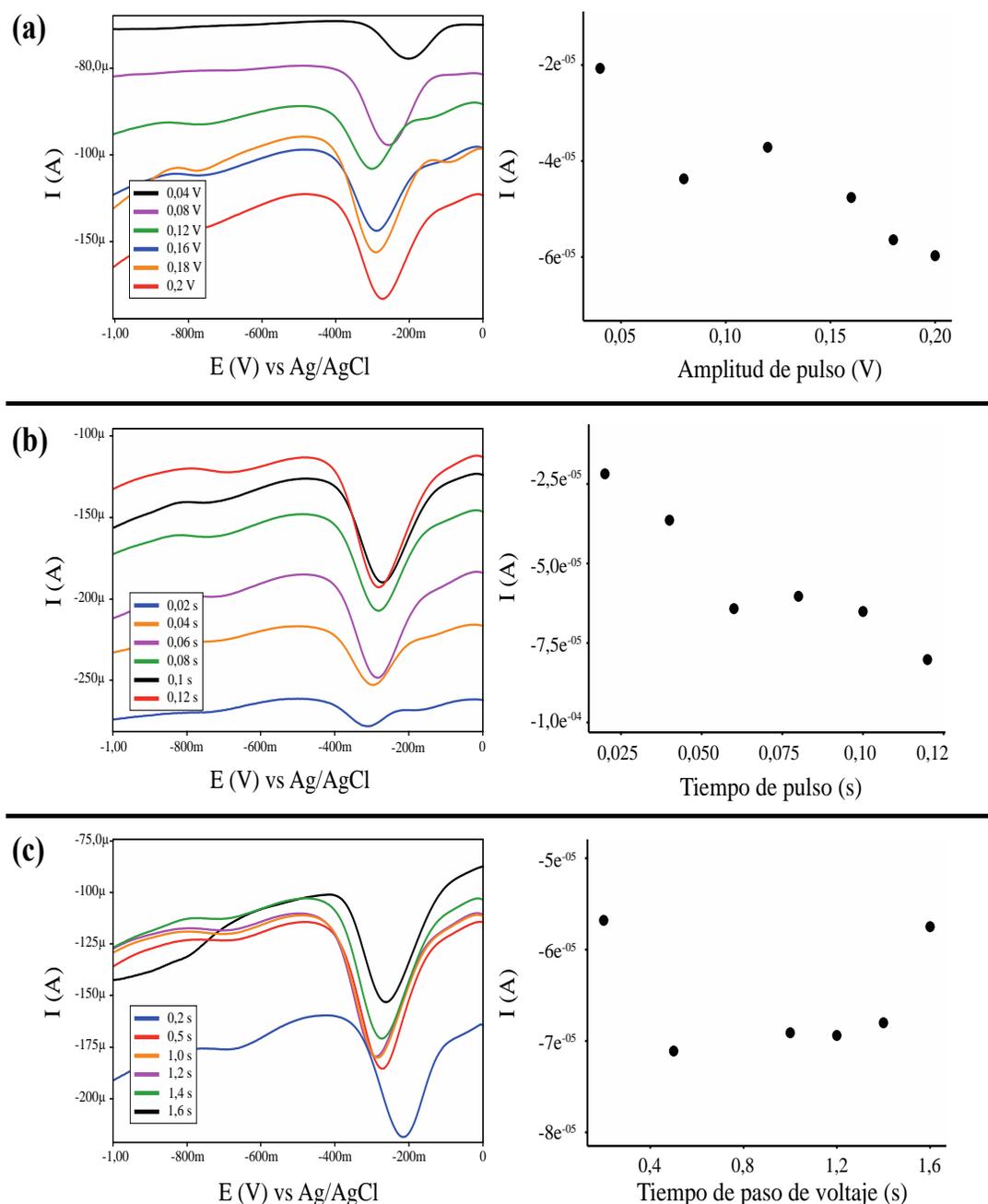
### 6.3. Optimización de parámetros experimentales en la respuesta voltamperométrica de C-SPE-CYP2D6

Previamente a evaluar la influencia del pH del electrolito de soporte se evaluaron en solución buffer fosfato pH 7 los demás parámetros tenidos en cuenta: amplitud de pulso (V), tiempo de pulso (s) y tiempo de paso de voltaje (s). Los rangos evaluados para cada parámetros fueron:

- **Amplitud de pulso (V):** 0,04 a 0,2.
- **Tiempo de pulso (s):** 0,02 a 0,12.
- **Tiempo de paso de voltaje (s):** 0,2 a 1,6.

La optimización de parámetros experimentales es la manera en que se puede evaluar las condiciones técnicas bajo las cuales la señal corriente-voltaje que se obtiene a partir de la interacción del biosensor con el analito es la mejor que se puede obtener, es decir, son las condiciones que permiten tener una señal en la que no se presentan superposición con otras señales contiguas y donde la señal presenta un pico más definido e intenso. La respuesta electroquímica del biosensor electroquímico frente a cambios en los parámetros optimizados fue registrada en la **Gráfica 6**, el criterio para la selección de los parámetros óptimos se basó en la mejor relación entre altura del pico catódico y valor del parámetro evaluado.

**Gráfica 6.** Optimización de parámetros: (a) Amplitud de pulso (V), (b) Tiempo de pulso (s) y (c) Tiempo de paso de voltaje (s). Respuesta voltamperométrica del biosensorelectroquímico frente a cambios en los parámetros optimizados (parte izquierda de la gráfica) y relación altura de pico – valores del parámetro evaluado (parte derecha de la gráfica).



De acuerdo con los resultados presentados en la **Gráfica 6-(a)**, que corresponde al parámetro amplitud de pulso, se observa un aumento en la altura de pico en la transición del valor de 0,04V, donde se obtuvo un pico con una altura de  $-2,07 \times 10^{-5}$  A ( $-20,7 \mu$ A), hasta 0,2V donde el pico tuvo un valor de  $-5,64 \times 10^{-5}$  A ( $-56,4 \mu$ A), siendo este último el valor mas alto obtenido

en el rango de valores explorado, por tanto se estableció el valor de amplitud de pulso de 0,2V como valor óptimo. Por otro lado, respecto al parámetro tiempo de pulso presentado en la **Gráfica 6-(b)**, este presentó la misma tendencia observada en el parámetro amplitud de pulso, de esta manera, las alturas de pico fueron desde un valor de  $-2,18 \times 10^{-5}$  A ( $-21,8 \mu\text{A}$ ) para un valor de tiempo de pulso de 0,02 s, hasta un valor de altura de pico de  $-8,02 \times 10^{-5}$  A ( $-80,2 \mu\text{A}$ ) para un valor de tiempo de pulso de 0,12 s, siendo este último en el que se presentó una mayor altura de pico en el rango de tiempo de pulso explorado, por tal razón se tomó 0,12 s como valor de tiempo de pulso óptimo. Finalmente, en la **Gráfica 6-(c)** que corresponde al parámetro tiempo de paso de voltaje se obtuvo un valor más alto de altura de pico en un valor de tiempo de paso de voltaje de 0,5 s con una altura de pico de  $-7,11 \times 10^{-5}$  A ( $-71,1 \mu\text{A}$ ) dentro de un rango de valores explorados de 0,2 a 1,6 s, de esta manera el valor de 0,5 s se estableció como el valor de tiempo de paso de voltaje óptimo.

En conclusión, en la **Tabla 4** se resumen los parámetros y los rangos en que se evaluaron, además, se resaltan en color rojo los valores seleccionados como óptimos por tener la mejor relación altura de pico – valor de parámetro evaluado.

**Tabla 4.** Optimización de parámetros: amplitud de pulso (V), tiempo de pulso (s) y tiempo de paso de voltaje (s).

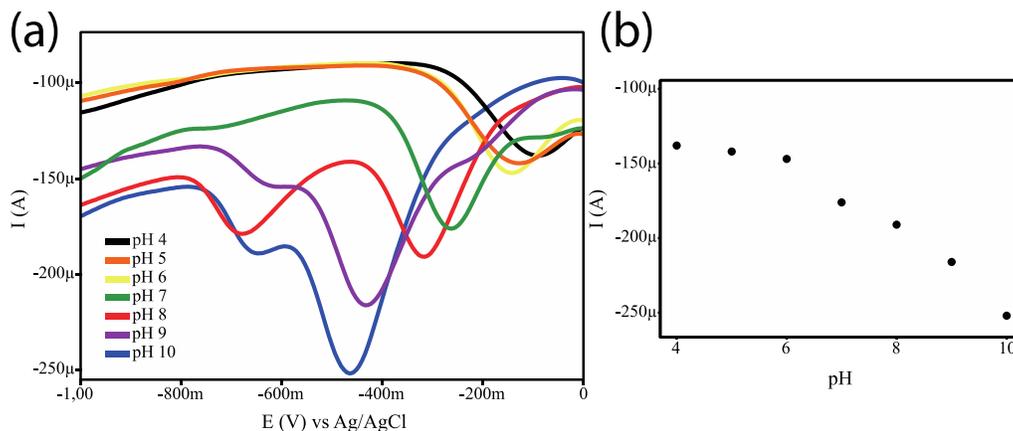
Parámetro	Rango evaluado					
Amplitud de pulso (V)	0,04	0,08	0,12	0,16	0,18	<b>0,2</b>
Tiempo de pulso (s)	0,02	0,04	0,06	0,08	0,1	<b>0,12</b>
Tiempo de paso de voltaje (s)	0,2	<b>0,5</b>	1,0	1,2	1,4	1,6

#### 6.4. Influencia del pH del electrolito de soporte

Una vez que se establecieron los valores óptimos de amplitud de pulso, tiempo de pulso y tiempo de paso de voltaje se evaluó la influencia que podría tener el pH del electrolito de soporte sobre la respuesta corriente-voltaje del sistema C-SPE-CYP2D6, de esta manera, teniendo en cuenta que el citocromo P450 es un amplio grupo de monooxigenasas, las reacciones relacionadas con los mecanismos de catálisis enzimática se dan a potenciales catódicos (102), partiendo de esto, el presente estudio se enfoca en las respuestas electroquímicas que se generan en un rango de potencial de 0 a -1000 mV.

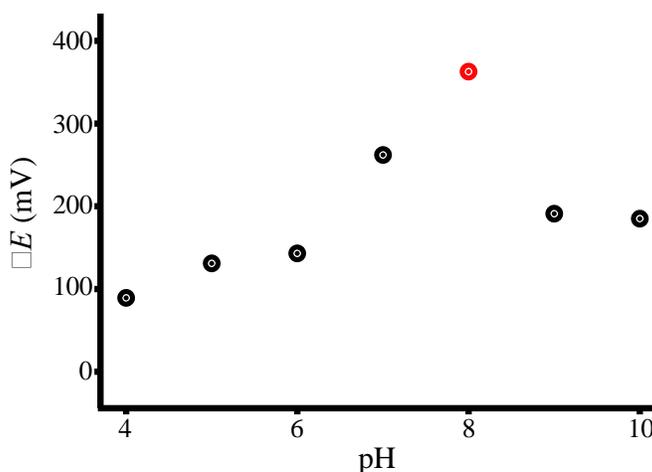
La **Gráfica 7** presenta el resultado de la evaluación del cambio en la respuesta corriente-voltaje del sistema C-SPE-CYP2D6 (en ausencia de sustrato) tras variar el pH en un rango de 4 a 10, como resultado se observa que al aumentar el pH, es decir, al pasar de pH 4 a 10 las señales voltamperométricas se desplazan a potenciales más catódicos (valores más negativos), por otra parte, la transición de pH 4 a 10 genera un aumento en los valores de pico de corriente, obteniéndose picos más intensos a pHs por encima de 7, pero a la vez se observa la aparición de una segunda señal ( $\sim 650$  mV) a partir de pH 8, además se observó que conforme se incrementa el pH a valores más alcalinos la separación de ambos picos disminuye.

**Gráfica 7.** Influencia del pH de solución buffer fosfato en la respuesta electroquímica de C-SPE-CYP2D6. (a) VDPs (Amplitud de pulso: 200 mV, Tiempo de pulso: 0,12 s, Tiempo de paso de voltaje: 0,5 s) (b) relación pH-corrientes de pico catódico presentado en un rango de potencial de 0 a -1000 mV.



Pese a que uno de los criterios de mayor importancia en el presente estudio es la intensidad de la señal corriente-voltaje, la presencia de un segundo pico es un factor a tener en cuenta, pues el aumento de la señal basal del sistema C-SPE-CYP2D6 tras la adición de los analitos de interés (sustratos) podría dar lugar a fenómenos como la superposición de señales por la cercanía entre los dos picos, por tal razón, para seleccionar el valor de pH óptimo se tuvo en cuenta los resultados presentados en la **Gráfica 7**, pero también la relación pH-  $\Delta E$  (**Gráfica 8**), donde el valor de  $\Delta E$  corresponde a la diferencia entre el valor de potencial en el que se presenta el primer pico y el del segundo pico voltamperométrico (ver **Formula 1**), por lo que a valores más altos de  $\Delta E$  la separación entre ambos picos será mayor.

**Gráfica 8.**  $\Delta E$  (mV) vs pH de solución PBS.



De acuerdo con lo anterior, a pesar de que en la **Gráfica 7-(b)** el pH 10 presenta la intensidad de pico más alta (-252 µA) la presencia de un segundo pico a -649 mV con una corriente de pico de -189 µA (**Gráfica 7-(a)**) podría generar una superposición de señales, como se

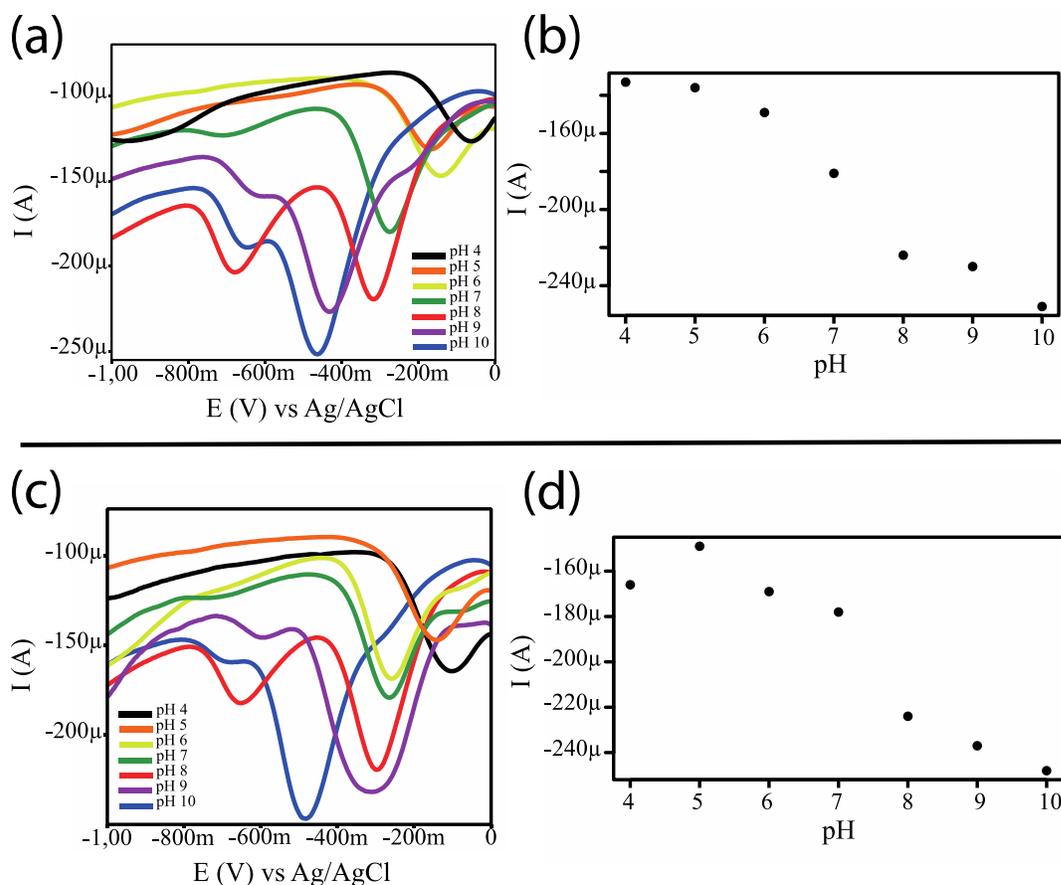
---

mencionó con anterioridad. Por otra parte, en un rango de pH de 4 a 6 se presenta una sola señal voltamperométrica, sin embargo los valores de corriente de pico son bajos ( $-89,3 \mu\text{A}$  para pH 4,  $-131 \mu\text{A}$  para pH 5 y  $-143 \mu\text{A}$  para pH 6) en comparación con los valores de pH de 7 a 10, razón por la cual dichos valores de pH se descartan en la selección de un valor de pH óptimo.

Una vez que se descartaron los valores de pH por debajo de 7 se tuvo en cuenta los valores de  $\Delta E$ , partiendo del hecho de que por encima de pH 7 se tendría siempre la influencia de una segunda señal voltamperométrica. De acuerdo con lo anterior, en los resultados de la relación pH- $\Delta E$  presentados en la **Gráfica 8** se puede observar que el valor mas alto de  $\Delta E$  corresponde al pH 8, cabe aclarar que en los valor de pH de 4 a 7, donde solo existe un valor de potencial por la ausencia de un segundo pico los valores de  $\Delta E$  corresponden al valor absoluto del valor de potencial del primer pico, sin embargo a valores de pH por encima de 7 el valor de  $\Delta E$  muestra grandes diferencias entre el valor de pH 8 ( $\Delta E= 363 \text{ mV}$ ) con respecto al pH 9 ( $\Delta E= 191 \text{ mV}$ ) y pH 10 ( $\Delta E= 185 \text{ mV}$ ). Teniendo en cuenta lo anteriormente mencionado, el valor de pH 8 no solo presenta un valor de corriente de pico alta en el primer pico ( $-191\mu\text{A}$ ) en comparación con valores de pH por debajo de este, sino que además de esto presenta el valor de  $\Delta E$  más alto entre los valores de pH en los que se presentó un segundo pico.

Por otra parte, adicionalmente a los parámetros tenidos en cuenta para la selección del pH óptimo analizados anteriormente, se evaluó el cambio en la respuesta electroquímica del sistema C-SPE-CYP2D6 en el rango de pH 4 a 10 tras la adición de analito (MDMA y  $\alpha$ -PVP), de esta manera, se adicionó en  $0,5 \mu\text{M}$  de cada analito en experimentos individuales, resultados que se presentan en la **Gráfica 9**.

**Gráfica 9.** Influencia del pH de solución buffer fosfato en la respuesta electroquímica de C-SPE-CYP2D6 frente a  $\alpha$ -PVP 0,5 $\mu$ M (a y b) y MDMA 0,5 $\mu$ M (c y d). (a y c) VDPs (Amplitud de pulso: 200 mV, Tiempo de pulso: 0,12 s, Tiempo de paso de voltaje: 0,5 s) (b y d) relación pH-corrientes de pico catódico presentado en un rango de potencial de 0 a -1000 mV.



Los resultados presentados en la **Gráfica 9** permiten observar los valores de pH en los que se presenta mayor aumento en los valores de corriente de pico, partiendo de la idea de que en el valor de pH que se presente un mayor aumento de las corrientes de pico implicará que a dicho valor el sistema C-SPE-CYP2D6 es más sensible a cambios en la concentración del analito, teniendo en cuenta que se empleó una concentración mayor (0,5 $\mu$ M) a las empleadas en la evaluación de la respuesta del biosensor frente a los analitos (**apartado 6.5**).

Teniendo como base los parámetros analizados con anterioridad el interés se centró en los valores de pH de 7 a 10, de esta manera se observó un aumento leve en los valores de corriente de pico de -176  $\mu$ A (sin analito) (**Gráfica 7**) a -181 tras la adición de MDMA 0,5 $\mu$ M cuando se empleó solución PBS pH 7 (**Gráfica 9- a y b**), el comportamiento fue similar con el analito  $\alpha$ -PVP (**Gráfica 9- c y d**) en el cual se observa un pico con una intensidad de -178  $\mu$ A, un aumento leve frente al valor de la respuesta del biosensor en ausencia de analito. Por otro lado, a pH 8 se observó un aumento más marcado en las corrientes de pico obtenidas, pues se pasó de un valor de -191  $\mu$ A en ausencia de analito (**Gráfica 7**) a valores de -225  $\mu$ A en presencia de MDMA (**Gráfica 9-(a) y (b)**) y -224  $\mu$ A en presencia de  $\alpha$ -PVP (**Gráfica 9-**

(c) y (d)), lo mismo pudo observarse a pH 9, donde se paso de un valor de corriente de pico de  $-216 \mu\text{A}$  en ausencia de analito (**Gráfica 7**) a valores de  $-237 \mu\text{A}$  en presencia de MDMA (**Gráfica 9-(a) y (b)**) y  $-230 \mu\text{A}$  en presencia de  $\alpha$ -PVP (**Gráfica 9-(c) y (d)**). Finalmente, a pH 10 no se presentó un aumento en los valores de corriente de pico tras la adición de analitos, pues se obtuvo un valor de corriente de pico de  $-251 \mu\text{A}$  tras la adición de MDMA (**Gráfica 9-(a) y (b)**) y  $-248 \mu\text{A}$  tras las adición de  $\alpha$ -PVP (**Gráfica 9- (c) y (d)**) frente a una corriente de pico de  $-251 \mu\text{A}$  en ausencia de analito (**Gráfica 7**).

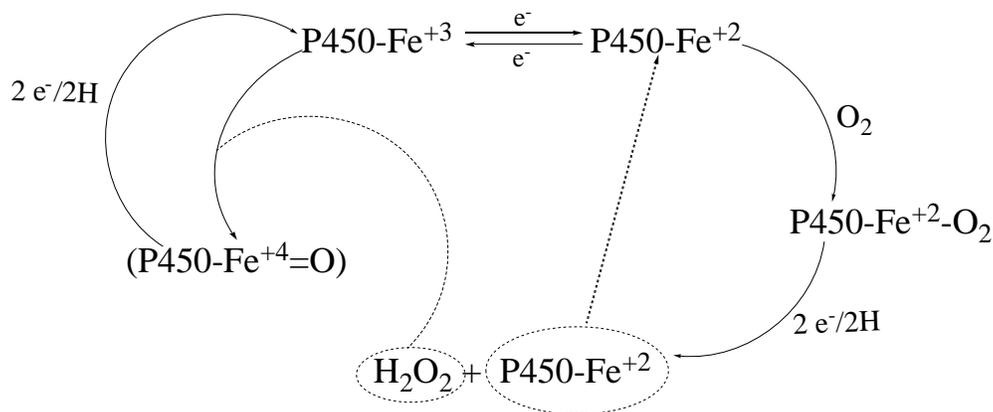
De cuerdo con lo anterior, teniendo en cuenta los tres parámetros analizados: intensidad de la corriente de pico basal del biosensor, separación de los picos voltamperométricos ( $\Delta E$ ) e intensidad de la corriente de pico en presencia de analitos, se concluyó que el pH óptimo para el electrolito de soporte utilizado en el presente trabajo corresponde pH 8, en este valor de pH la respuesta corriente-voltaje del biosensor se presenta en un rango de potencial de  $-298$  a  $-321$  mV, presentándose también una segunda señal entre  $-660$  a  $680$  mV, esta última no se relaciona con la actividad catalítica de la enzima pues, de acuerdo a los experimento presentados en esta sección, esta señal aparece como resultado del aumento del pH a valores alcalinos, sin embargo a continuación se abordará el tema con mayor detalle.

Retomando la temática del párrafo anterior, en cuanto a la asignación de las respuestas electroquímicas obtenidas se ha reportado que un pico catódico a potenciales cercanos a  $-200$  mV corresponde a la reducción de oxígeno tras la unión al grupo hemo de enzimas del citocromo P450.(103–105) Por otro lado, diferentes autores han concluido que una señal cercana a  $-400$  mV corresponde a la reducción del grupo hemo ( $\text{Fe}^{3+/2+}$ ). (103,106) Cui *et al.* reportaron en 2014 un pico de reducción alrededor de  $-480$  mV atribuido a la reacción enzimática de tramadol frente a CYP2D6 en un sistema basado en la inmovilización de CYP2D6 y citocromo P450 reductasa, sobre oxido de grafeno reducido y polietilenimina en un electrodo de carbón vítreo, en este estudio se observó un aumento del pico en relación con el aumento en la concentración de tramadol.(106) Munyai en 2018 aplicó un biosensor electroquímico basado en CYP2D6 adsorbido sobre la superficie de un electrodo de trabajo de oro al estudio del metabolismo de tamoxifeno, en sus resultados se presentaron voltamperogramas diferenciales de pulsos donde se obtuvo dos picos catódicos en los potenciales antes mencionados, el autor asigno el pico cercano a  $-200$  mV a la reducción de  $\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}_2$  y el pico cercano a  $-400$  mV a la reducción de CYP2D6.(103) En cuanto a otras isoformas del citocromo P450, Iwuoha & Smyth reportaron su experiencia empleando CYP1O1 en dispersión de bromuro de dodecil dimetilamonio sobre electrodos de carbón vítreo, estableciendo que el bioelectrodo exhibía una transferencia directa de electrones con la superficie de carbón vítreo en condiciones anaeróbicas mostrando un pico catódico a  $-380$  mV vs Ag/AgCl, dicha trasferencia de electrones fue reversible en ausencia de sustrato (alcanfor), pero tras la presencia de sustrato la respuesta era irreversible, por último, concluyeron que las reacciones de monooxigenación características del citocromo P450 en sistemas bioelectroquímicos requieren de oxígeno y que la unión de este oxígeno podría ocurrir a potenciales más bajos cuando el alcanfor se une a CYP1O1, cabe destacar que los resultados fueron obtenidos a partir de voltamperometría cíclica, de onda cuadrada y diferencial de pulsos, coincidiendo todos los resultados.(104) Recientemente Franke *et al.* emplearon un biosensor electroquímico basado en el citocromo P450 3A4 (CYP3A4) con la incorporación de un metalodendrímico de polipropilenimina de cobre (CuPPI) para la

detección de cuatro medicamentos antituberculosis: isoniazida, etambutol, pirazinamida y rifampicina, entre sus resultados reportan la presencia de dos picos de reducción relacionados directamente con la actividad enzimática de CYP3A4: a -290 y -620 mV en medio aeróbico, los cuales, según los autores, son derivados de la interacción del oxígeno con la enzima, finalmente establecieron el pico catódico de aproximadamente -290 mV como pico de interés en el estudio asumiendo que dicho pico se atribuye a la reacción de monooxigenación que ocurre dentro de la enzima.(102)

Pese a que la respuesta electroquímica del citocromo P450 a potenciales catódicos concuerda en los diferentes reportes antes citados, aún en la actualidad se presenta gran controversia en la asignación del pico que corresponde la actividad catalítica de la enzima, lo cual despierta gran interés teniendo en cuenta el papel que juega el oxígeno en la actividad enzimática del citocromo P450 y que puede llevar a la formación de respuestas electroquímicas que no corresponden a la acción catalítica de la enzima. En la **Figura 29** se muestra el mecanismo mediante el cual el oxígeno y el peróxido de hidrógeno juegan un papel importante en la activación catalítica del citocromo P450. Según dos Santos, luego de una reducción del grupo hemo del citocromo P450 de  $\text{Fe}^{+3}$  a  $\text{Fe}^{+2}$  se une  $\text{O}_2$  a este centro activo reducido formando la especie  $\text{P450-Fe}^{+2}\text{-O}_2$ , especie que luego de recibir electrones a través del transductor da paso a la regeneración de la especie  $\text{P450-Fe}^{+2}$  y a la formación de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , esta última molécula reacciona con  $\text{P450-Fe}^{+3}$  generando la especie  $\text{P450-Fe}^{+4}=\text{O}$  que posteriormente se reduce nuevamente en el electrodo a  $\text{P450-Fe}^{+3}$ .(105)

**Figura 29.** Participación del oxígeno en actividad catalítica del citocromo P450. Adaptado de (105).

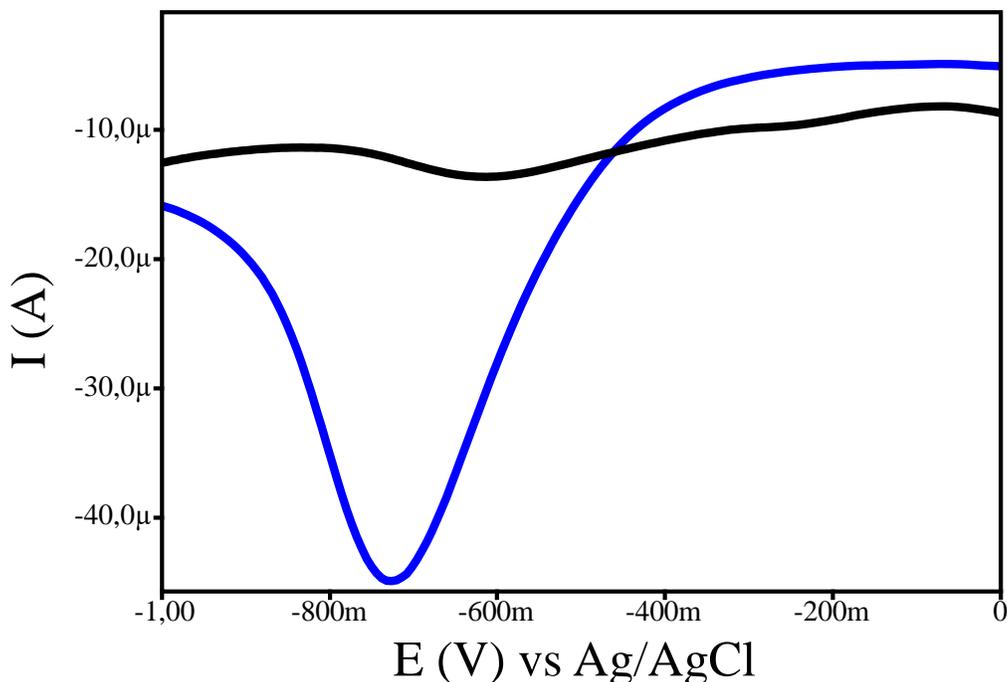


De acuerdo con lo anterior, dos Santos en su estudio ensaya biosensores electroquímicos basados en electrodos de carbón vítreo modificados con CYP1A2 inmovilizado con diferentes surfactantes y con diferentes películas sol-gel, en general reporta la presencia de un pico de reducción amplio e intenso en el rango de -350 a -400 mV el cual atribuye a la reducción  $\text{Fe}^{+3}$  a  $\text{Fe}^{+2}$  generada en presencia de oxígeno, la razón para llegar a dicha aseveración fue la naturaleza no reversible del pico y el carácter no catalítico de este, pues al variar la concentración de cafeína como sustrato empleado no se observaron cambios relacionados con la adición de sustrato, en su lugar los cambios correspondían a los cambios en la concentración oxígeno disuelto, sin embargo, se observó la incapacidad de que se volviera a la forma  $\text{Fe}^{+3}$  a partir de la formación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  como se describe en la **Figura 29**,

según el autor, tres hipótesis pueden explicar esto: la ventana de potencial explorada no fue lo suficientemente negativa para generar esta reducción, la acumulación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  degrada el grupo hemo del sitio activo del citocromo P450 y, por último, se necesita un cambio en la conformación del CYP para que ocurra la conversión de  $\text{P450-Fe}^{+2}\text{-O}_2$  en  $\text{P450-Fe}^{+2} + \text{H}_2\text{O}_2$ . Otra estrategia aplicada por el autor en mención fue el uso de citocromo P450 reductasa (CPR) junto a CYP1A2 en un sistema sol-gel sobre carbón vítreo a fin de obtener una respuesta catalítica frente a cafeína, partiendo de que el citocromo P450 reductasa en medios biológicos transfiere electrones del NADPH al citocromo P450, así pues el autor reporta la presencia de un pico catódico a  $-200 \text{ mV}$  y un pequeño pico anódico a  $-330 \text{ mV}$ , donde sí se observó una respuesta catalítica frente a el sustrato cafeína.(105)

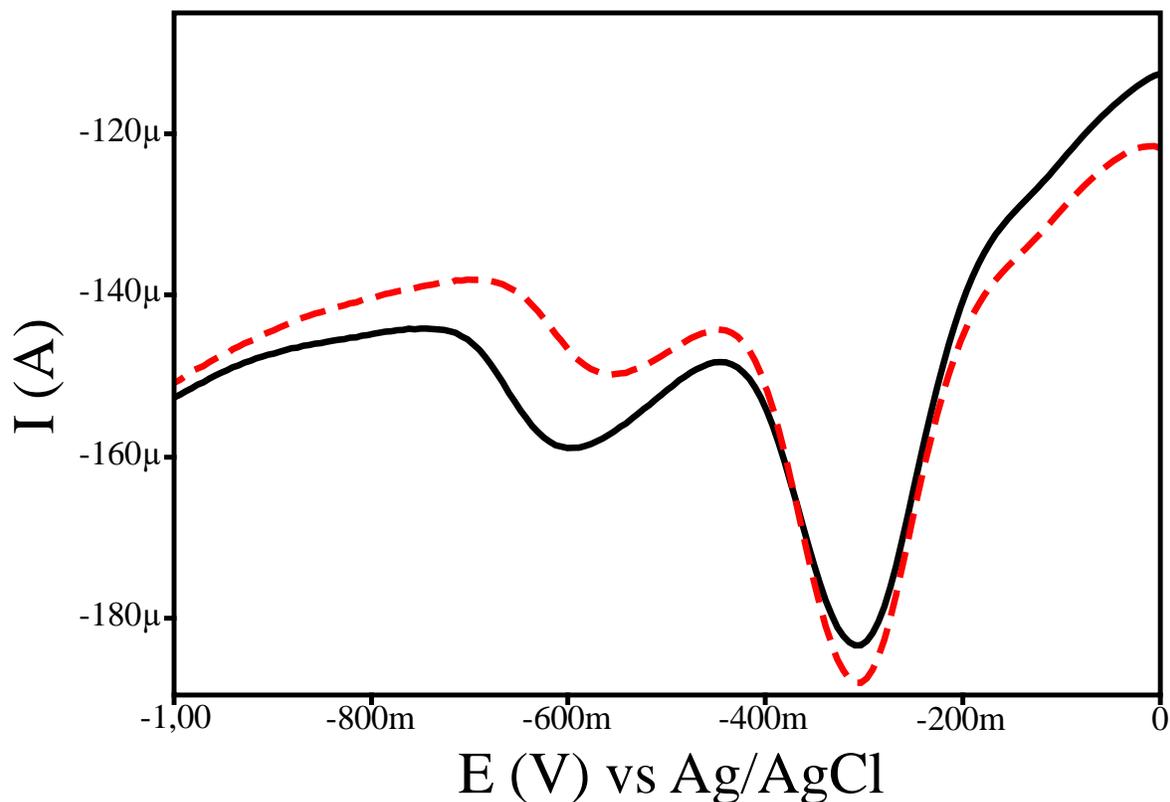
Se pudo observar que el comportamiento electroquímico del sistema C-SPE-CYP2D6 es muy similar al descrito por los diferentes autores mencionados con anterioridad, pues los picos catódicos obtenidos se presentan de manera similar, aún cuando la mayoría de estos se enfocan en sistemas basados en isoformas del citocromo P450 diferentes a la estudiada en el presente trabajo. No obstante, pese a los factores que pueden generar diferencias tanto en las respuestas electroquímicas de los biosensores basados en citocromo P450 como en el potencial de reducción del oxígeno, como el pH del electrolito de soporte (por ejemplo), los resultados obtenidos en el presente estudio no respaldan la idea de que el pico a potenciales cercanos a  $-0,2 \text{ V}$  se relacione con la reducción de oxígeno como se propone, pues se estudió la reducción de oxígeno sobre un electrodo desnudo (C-SPE) mediante voltamperometría diferencial de pulso como se muestra en la **Gráfica 10** y se observa un pico catódico a  $-726 \text{ mV}$  con una corriente de pico de  $-44,9 \mu\text{A}$  (línea azul) que corresponde a la reducción de oxígeno, posteriormente se aplicó un flujo constante de  $\text{N}_2$  durante 300s a la celda electroquímica para retirar el oxígeno presente y como resultado se observó la desaparición del pico de reducción de oxígeno (línea negra), por lo que se puede deducir que la reducción del oxígeno no relacionada con el mecanismo enzimático de CYP2D6 se da a potenciales diferentes a los cuales se presenta la respuesta electroquímica del biosensor desarrollado en el presente estudio, es decir, el pico catódico correspondiente a la reducción de oxígeno sobre un electrodo desnudo (C-SPE) no se presenta en la respuesta electroquímica del biosensor enzimático C-SPE-CYP2D6, sin embargo no se descarta un desplazamiento del pico de reducción debido a la influencia de CYP2D6 sobre la superficie del electrodo.

**Gráfica 10.** VDPs bajo condiciones optimizadas tomados a solución buffer fosfato pH 8 antes (línea azul) y después de aplicación de N<sub>2</sub> (línea negra).



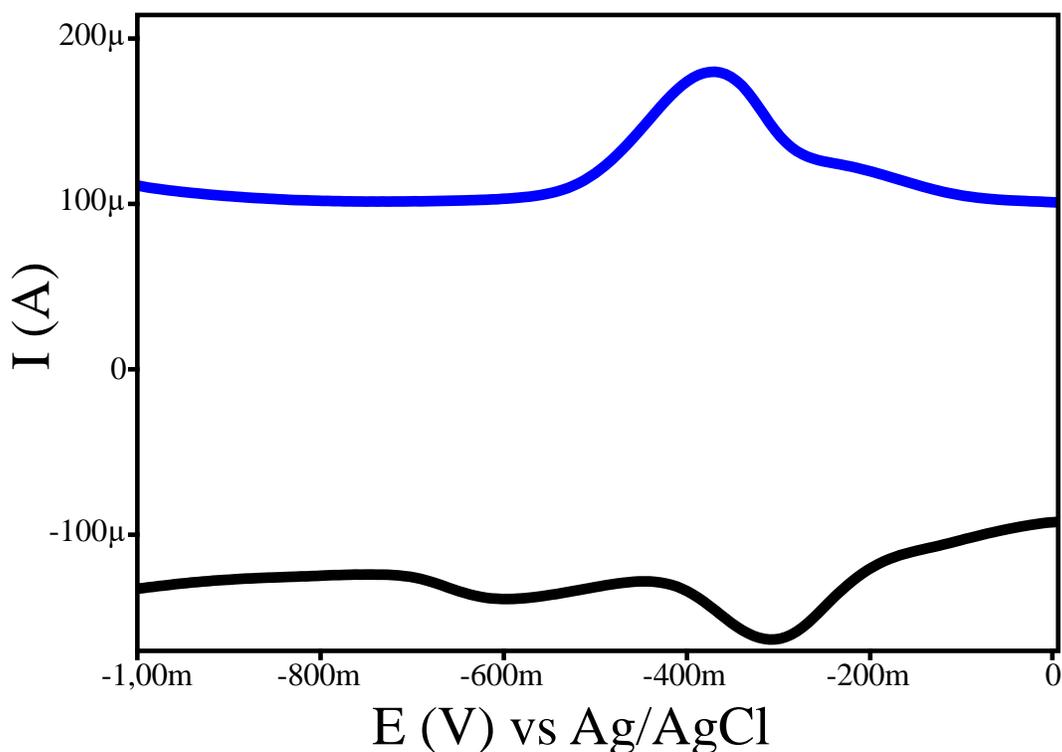
Por otro lado, se evaluó el cambio en la respuesta electroquímica del sistema C-SPE-CYP2D6 en ambientes anaerobios y aerobios (con flujo y sin flujo de N<sub>2</sub>, respectivamente), los voltamperogramas diferencial de pulso bajo condiciones optimizadas obtenidos de este experimento se presentan en la **Gráfica 11**, en esta se observa una disminución en la corriente del pico catódico generado a -309 mV tras el paso de un flujo constante de N<sub>2</sub> durante 300s, teniendo esta un valor de -188 μA en ambiente aerobio (línea discontinua de color rojo) y de -183 μA en ambiente anaerobio (línea solida de color negro). En cuanto al comportamiento electroquímico del pico generado a ~ -600 mV, este presentó un comportamiento contrario, pues al pasar de ambiente aerobio a anaerobio se presentó un aumento en la corriente de pico y además de esto se generó un desplazamiento de dicho pico, pasando de tener una corriente de pico de -130 μA y una ubicación a -559 mV en ambiente aerobio a tener una corriente de pico de -139 μA y una ubicación a -601 mV en ambiente anaerobio. Teniendo en cuenta el papel que juega el oxígeno en la actividad catalítica del citocromo P450 se sabe que este tiene la capacidad de aumentar la corriente de pico catódico del citocromo P450 (107), esto es debido a la alta afinidad que presenta el oxígeno hacia la forma reducida del grupo hemo (105), con base en esto, se descarta que el pico catódico presentado a ~ -600 mV se relacione con la actividad catalítica de CYP2D6.

**Gráfica 11.** Cambio en la respuesta electroquímica del sistema C-SPE-CYP2D6 en buffer fosfato pH 8 en ambientes con flujo (línea negra) y sin flujo (línea discontinua roja) de  $N_2$ . VDP bajo condiciones optimizadas.



La cupla  $Fe^{+3}/Fe^{+2}$  del grupo hemo del citocromo P450 representa un par redox reportado por diferentes autores (101,107–110), por tal razón se espera que la respuesta de esta cupla registre un pico anódico complementario al pico catódico en condiciones anaerobias al no presentar unión a algún sustrato o inhibidor, en la **Gráfica 12** se observa que en los voltamperogramas diferenciales de pulsos bajo condiciones anaerobias optimizadas y tomados tanto en reducción (línea color negro) como oxidación (línea color azul) se presentan los picos característicos de esta cupla, sin embargo para el pico presentado a  $\sim -600$  mV solo se presenta un pico catódico, la no reversibilidad de este pico confirma que no se relaciona con la cupla  $Fe^{+3}/Fe^{+2}$  del grupo hemo de CYP2D6, lugar donde específicamente se lleva a cabo la actividad catalítica.

**Gráfica 12.** VDPs de C-SPE-CYP2D6 en buffer fosfato pH 8 en barrido de oxidación (línea azul) y reducción (línea negra), bajo condiciones anaerobias.



De acuerdo con lo anterior, se puede plantear la idea de que el oxígeno es un cosustrato necesario en la catálisis enzimática del citocromo P450 y presenta la capacidad de inducir cambios en la respuesta basal del biosensor (en ausencia de un sustrato). Respecto a la señal que corresponde a la actividad enzimática de CYP2D6 se pudo establecer que dicho fenómeno enzimático se representa en el pico presentado en un rango de potencial de -298 mV a -321 mV, lo cual se puede confirmar en las secciones 6.2.1. y 6.5. donde se observa que los picos catódicos mencionados presentaron respuesta frente a un inhibidor como a los sustratos estudiados, lo cual no fue posible observar en los picos ubicados a potenciales cercanos a -650 mV.

Diferentes autores respaldan la idea de que un pico catódico con ubicación a potenciales entre -220 y -370 mV corresponde a la transición  $\text{Fe}^{+3} \rightarrow \text{Fe}^{+2}$  (76), por ejemplo, Iwuoha *et al.* en 2007 reportaron el estudio de la biotransformación de sertralina empleando un nanobiosensor basado en CYP2D6 y poli (ácido 8-anilino-1-naftalenosulfónico) depositados potenciodinámicamente sobre oro, en dicho estudio se puede confirmar que el pico catódico correspondiente a la transición  $\text{Fe}^{+3}/\text{Fe}^{+2}$  se da en el rango de potencial de -200 a -300 mV, además de esto, se confirmó que dicho pico correspondiera inequívocamente a la actividad catalítica de la enzima frente al sustrato mediante el estudio de la respuesta del nanobiosensor frente a un sustrato (debrisoquina) y un inhibidor (paroxetina) mediante voltamperometría diferencial de pulso, en ambos controles (sustrato e inhibidor) se observó variación en las

corrientes de pico, por parte del sustrato se reporta un aumento y en cuanto a la respuesta frente al inhibidor se reportó una disminución de la corriente de pico catódico del biosensor a valores de corriente menores a los presentados a concentración cero (estado basal del biosensor).(101)

El estudio electroquímico de biosensores basados en otras isoformas del citocromo P450 ha coincidido con los hallazgos de Iwuoha *et al.* (101) y los resultados obtenidos en el presente estudio. De esta manera, Shumyantseva *et al.* demostraron la transferencia directa de electrones entre CYP2B4, CYP1A2 y esterol 14 $\alpha$ -desmetilasa (CYP51MT), y electrodos de grafito modificados con nanopartículas de oro y bromuro de didodecil dimetil amonio (DDAB), para el estudio de la transferencia de electrones, reducción electroquímica directa y la interacción con sustratos de las isoformas estudiadas (Oxígeno, benzfetamina y lanosterol) y el inhibidor ketoconazol mediante voltamperometría cíclica, de onda cuadrada, diferencial de pulsos y amperometría. Entre los resultados reportados se pudo demostrar el aumento en la intensidad de la señal generada por las hemoproteínas estudiadas causado por el oxígeno, además, se obtuvo un pico de reducción en -437 mV para CYP1A2, -393 mV para CYP2B4 frente a Ag/AgCl mediante voltamperometría cíclica, adicionalmente, para CYP1A2 se obtuvo mediante voltamperometría de onda cuadrada un potencial redox a -328 mV (vs Ag/AgCl) y mediante voltamperometría diferencial de pulsos se obtuvo a -370 mV (vs Ag/AgCl), para CYP2B4 el potencial redox de la cupla Fe<sup>+3</sup>/Fe<sup>+2</sup> fue de -327 mV (vs Ag/AgCl) mediante voltamperometría de onda cuadrada y de -316 mV (vs Ag/AgCl) mediante voltamperometría diferencial de pulsos, finalmente, mediante voltamperometría cíclica se reportó que el potencial redox para la transición Fe<sup>+3</sup>/Fe<sup>+2</sup> en esterol 14 $\alpha$ -desmetilasa (CYP51MT) es -273 mV (vs Ag/AgCl), lo que en todos los casos correspondió con los picos característicos de las hemoproteínas, según los autores.(107)

El estudio de un biosensor electroquímico basado en CYP3A4 inmovilizada sobre electrodos serigrafados de grafito nanoestructurados con nanopartículas de oro y estabilizados con el tensoactivo sintético bromuro de didodecildimetilamonio para el estudio del metabolismo de diclofenaco fue reportado por Makhova *et al.* en 2011(108), en este estudio se mostró la respuesta de CYP3A4 en forma de pico catódico en aproximadamente -270 mV (vs Ag/AgCl) como resultado de la transición Fe<sup>+3</sup>/Fe<sup>+2</sup> del grupo hemo de la isoforma en mención, dicha respuesta electroquímica mostro ser sensible a cambios en la concentración de sustrato (diclofenaco) evidenciándose en el aumento de la corriente de pico, sin embargo, contrario a los resultados obtenidos en el presente estudio y los reportados por otros autores como Iwuoha *et al.* (101) Makhova *et al.* no obtuvieron una disminución en la corriente de pico de la señal electroquímica de CYP3A4 cuando esta se puso en contacto con un inhibidor.(108)

De acuerdo con lo anterior, se puede deducir que esta transferencia Fe<sup>+3</sup>/Fe<sup>+2</sup> de la función hemo del citocromo P450 tiene un comportamiento característico que no solo se limita al citocromo P450 sino probablemente a las hemo proteínas en general, pese a ligeros cambios en los potenciales a los que se presenta esta respuesta que se debe a diferencias estructurales que existe entre estas.(107) Vale la pena citar el estudio del comportamiento electroquímico de mioglobina, hemoglobina y peroxidasa llevado a cabo por Huang *et al.* en 2002 empleando sistemas bioelectroquímicos basados en la hemoproteína inmovilizada con una película de

quitosano sobre la superficie de un electrodo de grafito, presentándose para todas las especies estudiadas picos catódicos, cuasireversibles y bien definidos a aproximadamente -330 mV frente a un electrodo de calomel saturado mediante voltamperometría cíclica, dichos picos se asignaron a la transición  $\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}}$ .(109) deGroot *et al.* en 2005 obtienen un par redox para la mioglobina a -210 mV que asignan a la transición  $\text{Fe}^{\text{III}}/\text{Fe}^{\text{II}}$  y otro a -1120 mV que asigna a la transición  $\text{Fe}^{\text{II}}/\text{Fe}^{\text{I}}$  en un sistema bioelectroquímico basado en mioglobina incorporada en películas de bromuro de didodecil dimetilamonio (DDAB) sobre grafito pirolítico.(110)

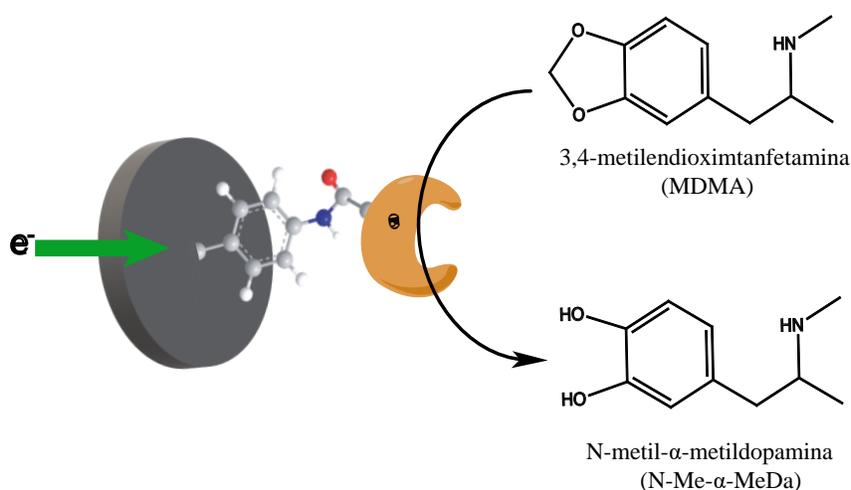
La respuesta electroquímica de las diferentes isoenzimas del citocromo P450 y otras hemoproteínas revisadas en el presente apartado permite confirmar que concuerda con la respuesta electroquímica obtenida en el presente estudio, siendo característico el pico catódico en una ventana de potencial negativo de -220 a -370 mV para el citocromo P450 (76), sin embargo se debe tener en cuenta el pH del electrolito de soporte como variable de gran influencia, pues se observa que el pH de la solución buffer fosfato empleado como electrolito de soporte genera un desplazamiento de los potenciales a los que los picos catódicos se generan hacia potenciales más catódicos, lo cual indica la alta dependencia al pH que puede llegar a tener la respuesta electroquímica y las diferencias que puede generar este valor de pH en los valores de potencial del pico obtenido con respecto a lo reportado en la literatura científica, pues en la mayoría de los estudios citados se empleó buffer fosfato pH 7,4 – 7,6 mientras que en el presente estudio se empleó buffer fosfato a pH 8. Finalmente, es posible que la acción catalítica de CYP2D6 sobre el sustrato se vea mejorada al usar solución buffer fosfato a pH 8 por una mejora en la afinidad enzima-sustrato, pues según ensayos *in vitro* se evidenció que a pH 8 la afinidad de CYP2D6 frente a sustratos como bufuralol y dextrometorfano aumentaba considerablemente, sin embargo, dicha afinidad puede variar de un sustrato a otro, lo significa que la afinidad por otros sustratos puede ser mayor a otros valores de pH (111). En relación con lo anterior, en el presente apartado se pudo comprobar la influencia que tiene el pH del electrolito de soporte, se observó que en el valor de pH de 8 se presentó un mayor aumento de la intensidad del pico catódico en presencia de sustrato con respecto al pico del blanco (ausencia de sustratos), a diferencia de otros valores de pH explorados, la intensidad del pico está directamente relacionada con la sensibilidad del biosensor frente al analito, por tanto, en el presente estudio se evidenció que a pH 8 el biosensor fue mas sensible. Además del pH empleado, se deben considerar variables que pueden generar diferencias en las señales obtenidas como la isoforma del citocromo P450 empleada, el sistema utilizado para inmovilizar la enzima a la superficie del electrodo, el material del electrodo, el tipo de sustrato y su concentración.

## **6.5. Respuesta electroquímica del biosensor enzimático frente a $\alpha$ -PVP y MDMA**

CYP2D6 es responsable del metabolismo de aproximadamente 20 a 30% de productos farmacéuticos comercializados, pese a que representa solo un 1 a 2% del citocromo P450 hepático total. Entre los fármacos metabolizados por CYP2D6 se encuentran los antidepresivos tricíclicos e inhibidores selectivos de recaptación de serotonina, antiarrítmicos, opioides, antieméticos, antipsicóticos y estimulantes de tipo anfetamina (ETA).(112,113) La degradación metabólica de MDMA es generada principalmente en el hígado por la enzima CYP2D6, de aproximadamente el 75% de aclaramiento plasmático de

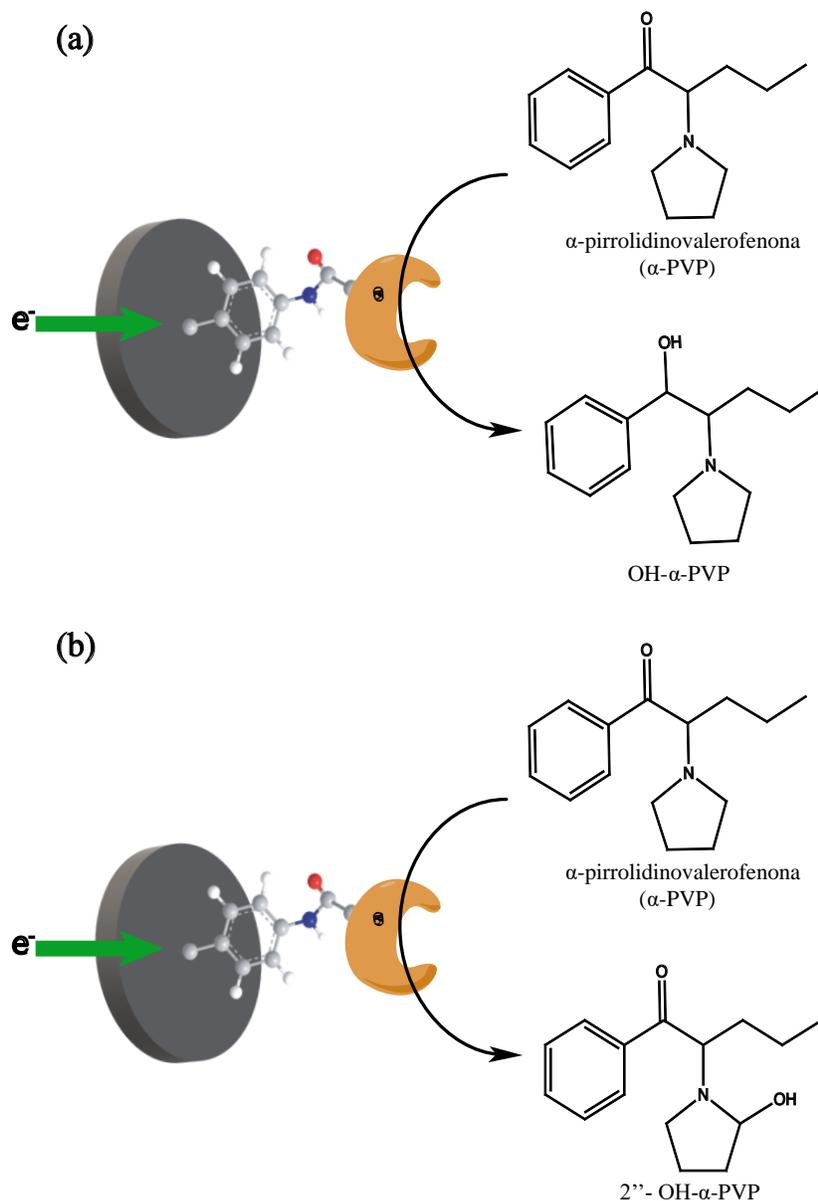
MDMA un 30% está regulado por CYP2D6, en este sentido, CYP2D6 regula la *O*-desmetilación de MDMA para formar el metabolito 3,4-dihidroxi metanfetamina, también conocido como *N*-metil- $\alpha$ -metildopamina, además participa en la *O*-desmetilación de MDA, un metabolito generado a partir de la *N*-desmetilación de MDMA tras la participación de isoenzimas como CYP1A2 (ver apartado 1.2.2.1.3.). (47,113–115) De acuerdo con lo anterior, y teniendo en cuenta que en el sistema C-SPE-CYP2D6 no hay presencia de otras isoformas ya que se empleó CYP2D6 recombinante aislada y purificada, en la **Figura 30** se presenta el proceso de *O*-desmetilación de MDMA en la superficie del biosensor electroquímico C-SPE-CYP2D6, proponiendo a *N*-metil- $\alpha$ -metildopamina como único producto.

**Figura 30.** *O*-desmetilación de MDMA por vía electroquímica como resultado de la interacción con C-SPE-CYP2D6. Fuente: autor.



La información actual acerca de la toxicología de las catinonas sintéticas es limitada y con un amplio campo por explorar, esto se debe en parte a la gran variedad estructural que caracteriza al grupo de las catinonas sintéticas.(7) En la **Figura 31** se presentan los dos posibles productos que podrían resultar de la interacción del biosensor electroquímico C-SPE-CYP2D6 con el analito  $\alpha$ -PVP, tomando como punto de partida tanto resultados de estudios basados en la detección de metabolitos resultantes de la biotransformación de la catinona sintética en mención en muestras de orina de consumidores (116), como estudios *in vitro* donde se reporta tanto los metabolitos resultantes como las isoformas del citocromo P450 que participan en la generación de dichos metabolitos.(117) De esta manera se sabe que CYP2D6 es la única isoenzima que participa en la formación de los metabolitos OH- $\alpha$ -PVP y 2''- OH- $\alpha$ -PVP (117) y que estos dos metabolitos fueron los principalmente encontrados en orina de consumidores de  $\alpha$ -PVP, siendo mas abundante OH- $\alpha$ -PVP.(116,118)

**Figura 31.** Posibles productos resultantes de la interacción del biosensor electroquímico C-SPE-CYP2D6 con  $\alpha$ -PVP. Fuente: autor.

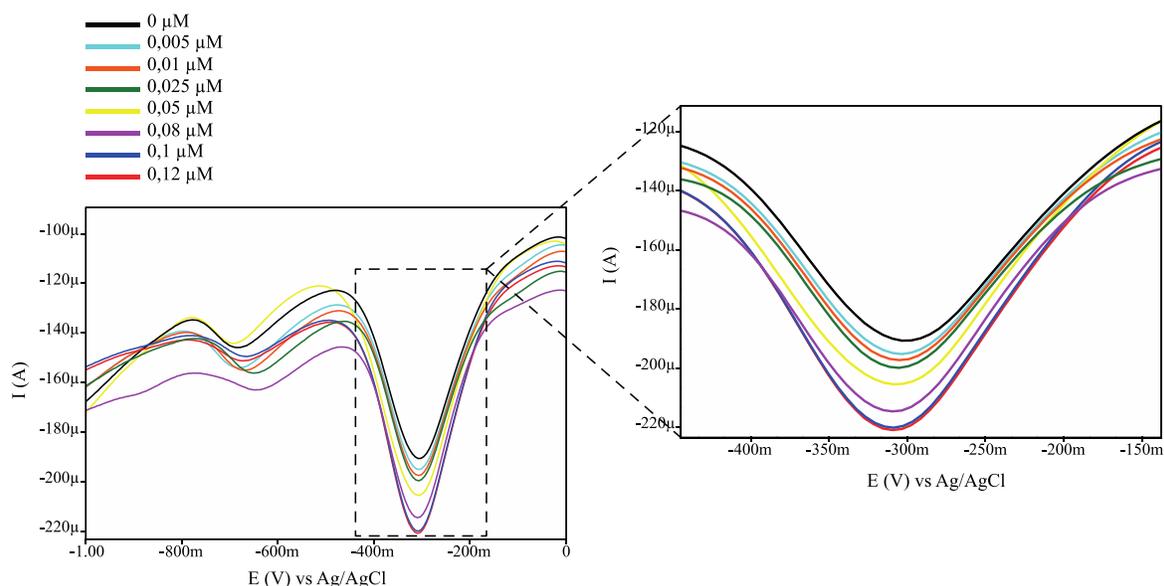


Se registraron los cambios en la respuesta electroquímica generados por los analitos de interés en el presente estudio:  $\alpha$ -PVP y MDMA, frente al sistema C-SPE-CYP2D6, específicamente en el pico electroquímico que corresponde a la actividad enzimática de CYP2D6, dicho pico se presentó dentro del rango de potencial obtenido en apartados anteriores y según el rango de potencial reportado en la literatura para el citocromo P450 (-220 a -370 mV) (76), así pues, la respuesta electroquímica de  $\alpha$ -PVP se presentó a -298 y la de MDMA a -321 mV, mediante voltamperometría diferencial de pulsos (VDP) bajo condiciones optimizadas, como se determinó con anterioridad en los **apartados 6.3. y 6.4.** La respuesta electroquímica de los analitos por separado fue similar entre ellas, en ambas se

observa que existe una relación directamente proporcional entre la concentración del analito y el cambio en la corriente de pico (**Gráficas 13 y 14**), sin embargo, la diferencia radica en que el pico generado para MDMA se presenta a potenciales más catódicos que el generado para  $\alpha$ -PVP, además de esto, las corrientes de pico de  $\alpha$ -PVP son menos intensas que las obtenidas para MDMA, estas dos diferencias podrían permitir discriminar una especie de otra. Adicionalmente, probablemente debido a los valores más altos obtenidos en las corrientes de pico de MDMA fue posible explorar concentraciones más bajas ( $0,005 \mu\text{M}$ ) que las exploradas con  $\alpha$ -PVP ( $0,01 \mu\text{M}$ ), pues a concentraciones por debajo de  $0,01 \mu\text{M}$  la respuesta electroquímica de  $\alpha$ -PVP no mostró cambio notable.

En la **Gráfica 13** se presentan los VDPs obtenidos a diferentes concentraciones de MDMA, se observa claramente la relación directamente proporcional que existe entre la concentración de MDMA en la celda electroquímica y los valores de corriente de pico obtenidos. Por otro lado, el análisis de los picos corriente-voltaje obtenidos permite confirmar que el pico ubicado a  $\sim -650 \text{ mV}$  no tiene relación con la actividad catalítica de CYP2D6, pues no existe una tendencia a aumentar el valor de las corrientes de pico con respecto a un aumento de la concentración del analito, en su lugar se observa un comportamiento no predecible. En síntesis, el sistema C-SPE-CYP2D6, mostró una respuesta frente a cambios de concentración del sustrato, lo cual sugiere que existe realmente actividad catalítica como resultado de la relación enzima-sustrato, siendo esta a su vez posible gracias a que efectivamente se está generando un flujo de electrones desde la superficie de carbono del electrodo de trabajo hacia la enzima a través del enlace amida.

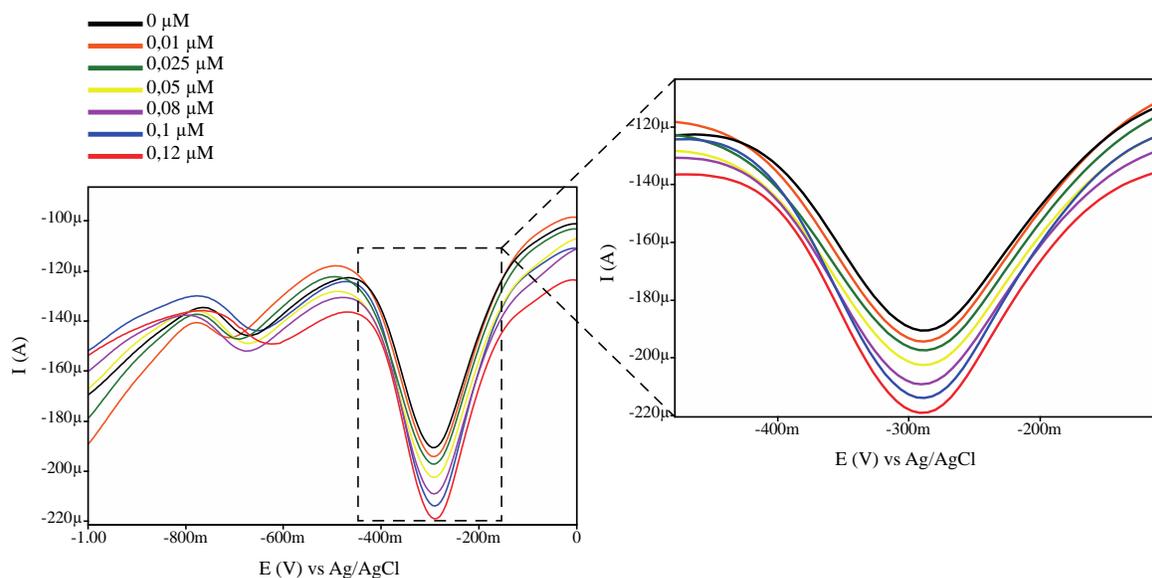
**Gráfica 13.** VDPs de C-SPE-CYP2D6 frente a diferentes concentraciones de MDMA (Amplitud de pulso:  $200 \text{ mV}$ , Tiempo de pulso:  $0,12 \text{ s}$ , Tiempo de paso de voltaje:  $0,5 \text{ s}$ ).



En la **Gráfica 14** se presentan los VDPs obtenidos para el analito  $\alpha$ -PVP, en estos se puede observar una tendencia similar a la presentada con MDMA (**Gráfica 13**), lo cual confirma la respuesta del biosensor electroquímico frente a sustratos de CYP2D6, sin embargo, como ya se ha mencionado, los picos catódicos de los diferentes voltamperogramas presentaron

valores de corriente menores a los obtenidos con MDMA en los mismos rangos de concentración, además de presentarse dichos picos a potenciales menos catódicos (-298 mV), probablemente esta diferencia en la respuesta electroquímica se debe a una mayor tasa de actividad catalítica de CYP2D6 frente a MDMA con respecto a  $\alpha$ -PVP, tal como sucede con la tasa de biotransformación mediada por CYP2D6 100 veces mayor de MDMA en comparación con la metanfetamina (113,119), pese a esto, es evidente que existe una relación entre la concentración y la corriente de pico catódico en el pico correspondiente a la actividad catalítica de CYP2D6. En cuanto al pico generado a  $\sim -650$ mV, se observa el mismo comportamiento de experiencias pasadas, donde no se observa relación alguna entre el pico de corriente y la concentración de analito, lo cual refuerza la hipótesis de que este pico no tiene relación alguna con la actividad catalítica de CYP2D6.

**Gráfica 14.** VDPs de C-SPE-CYP2D6 frente a diferentes concentraciones de  $\alpha$ -PVP (Amplitud de pulso: 200 mV, Tiempo de pulso: 0,12 s, Tiempo de paso de voltaje: 0,5 s).



## 6.6. Capacidad de detección y cuantificación del biosensor enzimático frente a $\alpha$ -PVP y MDMA

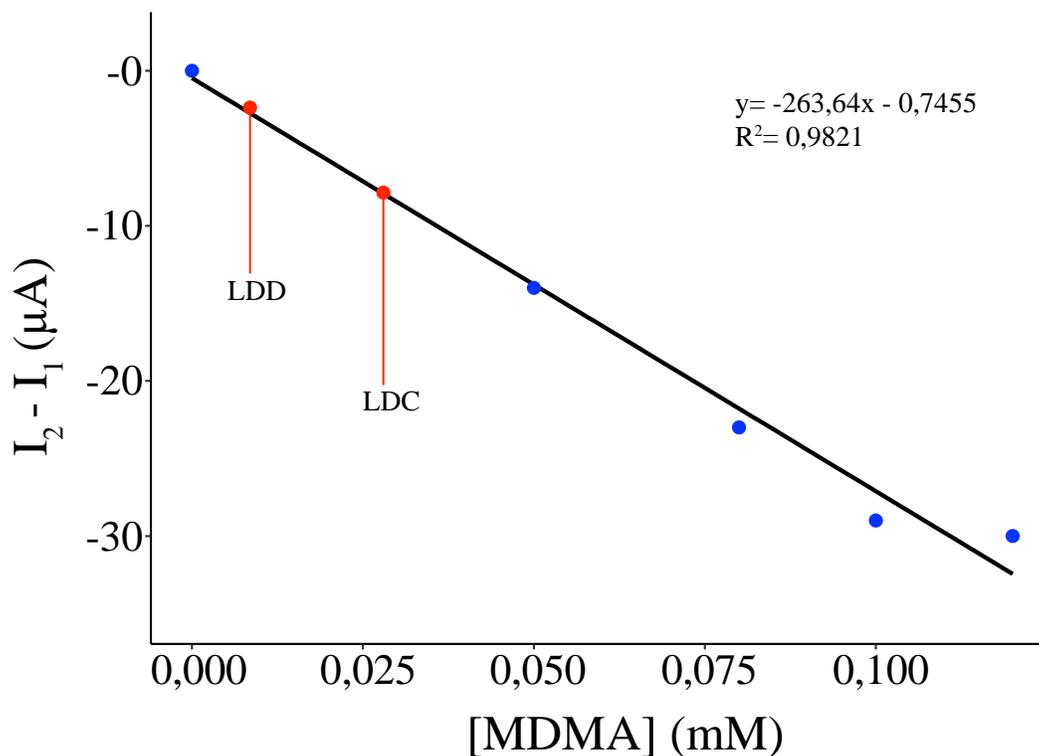
### • MDMA

Las corrientes de pico obtenidas con cada concentración evaluada se registraron y se ajustaron a un modelo lineal a partir de una regresión simple, de esta manera se construyó la curva de calibración que se presenta en la **Gráfica 15**. Se evaluó un rango de concentración de 0,005 a 0,125  $\mu$ M, obteniendo corrientes de pico que fueron desde -197  $\mu$ A para una concentración de 0,005  $\mu$ M de MDMA hasta -221  $\mu$ A para una concentración 0,125  $\mu$ M de MDMA, que fue la concentración máxima que se incluyó en la regresión pues a valores por encima de este (0,5 y 1  $\mu$ M) se observó pérdida de la tendencia lineal debido a una disminución leve de las corrientes de pico con respecto a la concentración 0,125  $\mu$ M, lo cual se podría relacionar con un efecto inhibitorio generado por el mismo sustrato cuando este

está a altas concentraciones, este fenómeno ya ha sido reportado por Iwuoha *et al.* en su estudio de la respuesta electroquímica de sertralina frente a un biosensor basado en CYP2D6.(101) Cabe mencionar que los valores de corriente de pico reportados son el promedio de tres medidas (n=3) para las diferentes concentraciones de MDMA, en cuanto al blanco, el valor promedio registrado de  $-191 \mu\text{A}$  corresponde al promedio de 10 medidas (n=10).

La curva de calibración se construyó a partir de la relación concentración ( $\mu\text{M}$ ), que corresponde a la variable independiente, y  $I_2 - I_1$  ( $\mu\text{A}$ ) que corresponde a la variable dependiente y consiste en la diferencia de potencial entre la corriente de pico a una concentración dada ( $I_2$ ) y el valor de corriente de pico del blanco ( $I_1$ ). En la **Gráfica 15** se observa que los datos incluidos en el modelo presentan una relación lineal, su coeficiente de determinación ( $R^2$ ) tuvo un valor de 0,9821 lo cual sugiere que los datos se ajustan a un modelo lineal, es decir, 98,2 % de la variabilidad en  $I_2 - I_1$  (variable dependiente) puede ser estimado por la variable concentración (variable independiente), lo que demuestra la capacidad del modelo para predecir resultados a diferentes concentraciones de MDMA en el rango explorado sin perder el ajuste a este.

**Gráfica 15.**  $I_2 - I_1$  ( $\mu\text{A}$ ) vs Concentración de MDMA ( $\mu\text{M}$ ).



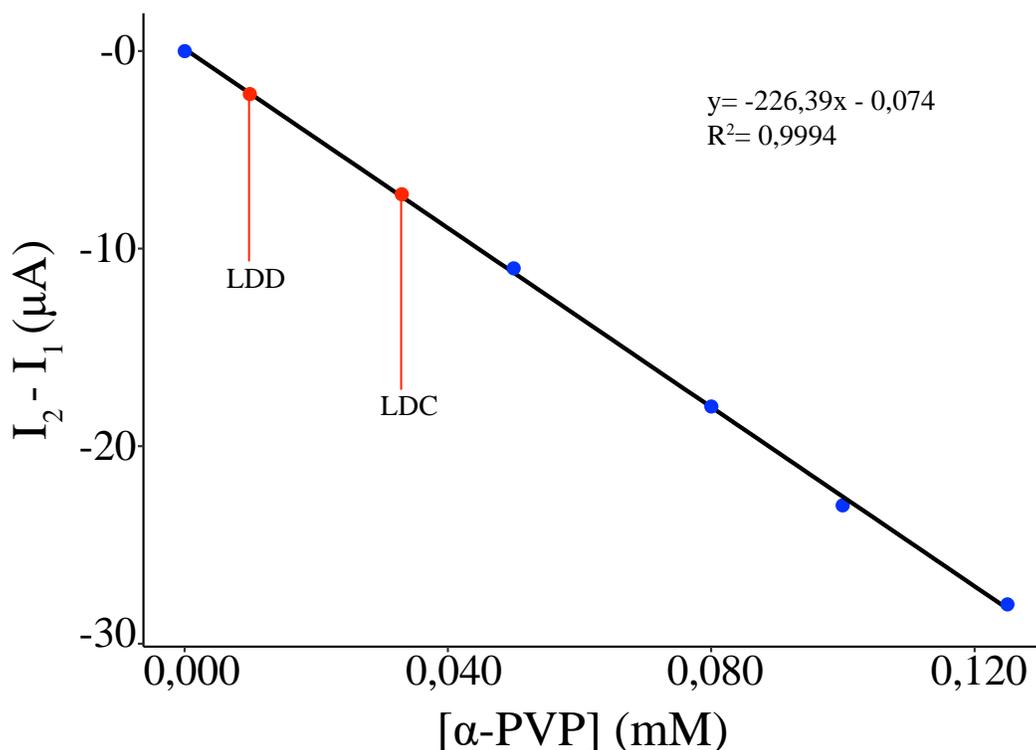
Para el cálculo de los límites de detección (LDD) y cuantificación (LDC) se tuvo en cuenta el valor de desviación estándar de la corriente de pico del blanco de 0,75 para n=10. El límite de detección (LDD) obtenido fue de  $0,0085 \mu\text{M}$  ( $1,64 \text{ ng/mL}$ ) y el límite de cuantificación

(LDC) fue de 0,028  $\mu\text{M}$  (5,41 ng/mL) para el analito MDMA frente a C-SPE-CYP2D6 bajo las condiciones establecidas en el presente estudio.

- $\alpha$ -PVP

Se evaluó la respuesta voltamperométrica del biosensor C-SPE-CYP2D6 frente a cambios de concentración de  $\alpha$ -PVP en un rango de 0,01 a 0,125  $\mu\text{M}$ , como variable de respuesta se obtuvo picos de corriente catódica con tendencia creciente en un rango de -194  $\mu\text{A}$  para la concentración mas baja evaluada (0,01  $\mu\text{M}$ ) a -219  $\mu\text{A}$  para una concentración de 0,125  $\mu\text{M}$ . Los datos de corrientes catódicas de los picos registrados corresponden a un promedio de tres medidas (n=3), las cuales tienen como referencia el pico registrado para el blanco (-191  $\mu\text{A}$ ), valor establecido para los dos analitos y que corresponde al promedio de 10 medidas (n=10).

**Gráfica 16.**  $I_2 - I_1$  ( $\mu\text{A}$ ) vs Concentración de  $\alpha$ -PVP ( $\mu\text{M}$ ).



De acuerdo con lo anterior, se construyó una curva de calibración para ajustar los datos a un modelo lineal mediante regresión simple, donde se relacionaron los valores de concentración de  $\alpha$ -PVP ( $\mu\text{M}$ ) como variable independiente y como variable dependiente se tomó la variable  $I_2 - I_1$  ( $\mu\text{A}$ ) que consiste en la diferencia entre la corriente de pico a una concentración determinada ( $I_2$ ) y la corriente de pico del blanco ( $I_1$ ). En la **Gráfica 16** se presenta la curva de calibración que relaciona las variables antes mencionadas, en esta se puede observar una tendencia lineal con un ajuste aceptable de los datos al modelo ( $R^2=0,9994$ ). El límite de detección (LDD) obtenido fue de 0,0099  $\mu\text{M}$  (2,2 ng/mL) y el límite de cuantificación fue

de 0,033  $\mu\text{M}$  (7,6 ng/mL), teniendo en cuenta una desviación estándar de la corriente de pico del blanco de 0,75 (n=10).

En la literatura científica reciente aún no se cuenta con la cantidad suficiente de estudios que permitan comparar los resultados obtenidos tanto en plataformas no modificadas, como en plataformas modificadas, especialmente en biosensores enzimáticos, sin embargo, algunos autores como Dragan *et al.* han abordado estudios en los que se explora la respuesta electroquímica de diferentes drogas de abuso (cocaína, 3,4-metilendioximetamfetamina (MDMA), 3-metilmecatinona (MMC) y  $\alpha$ -pirrolidinovalerofenona ( $\alpha$ -PVP)), además de estudiar el impacto de adulterantes (cafeína, acetaminofén, lactosa y benzocaína) en mezclas binarias, siendo estos estudios llevados a cabo tanto en electrodos de carbón vítreo no modificado y modificado, reportando así las grandes ventajas que tienen las plataformas modificadas con grafeno y nanotubos de carbono multipared en comparación con el uso del electrodo desnudo, finalmente los autores concluyen que la presencia de adulterantes dificulta la detección cuantitativa y destacan la necesidad de más estudios que aborden matrices con mezclas terciarias y cuaternarias que permitan la detección de drogas ilícitas en muestras de calle mediante el uso de dispositivos portátiles.(98) De acuerdo con lo anterior, queda claro que la modificación de la superficie del electrodo con materiales como grafeno y nanotubos de carbono multipared son alternativas novedosas y atractivas para mejorar las características analíticas de las plataformas electroquímicas, pese a que los autores anteriormente mencionados no reportaron límites de detección y cuantificación que permitan comparar los resultados con el biosensor electroquímico desarrollado en el presente estudio, sería interesante abordar estudios futuros donde la plataforma C-SPE-CYP2D6 pudiese modificarse con grafeno o nanotubos de carbono.

Recientemente se han reportado diferentes estudios donde se aborda la detección electroquímica de MDMA, en su gran mayoría se basan en el uso de electrodos de trabajo de diferentes materiales sin modificaciones, esta base actualizada de resultados permite constatar que efectivamente existe una mejora en los límites de detección y cuantificación alcanzados mediante el uso de la plataforma C-SPE-CYP2D6 en comparación con plataformas sin modificación. Con el fin de mencionar algunos de estos estudios, se destaca el uso de electrodos serigrafiados de grafito para la detección simultánea de 3,4-Metilendioximetamfetamina (MDMA) y para-metoxianfetamina (PMA), alcanzando límites de detección para la matriz binaria MDMA/PMA de 0,25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ /0,14  $\mu\text{g mL}^{-1}$  respectivamente, y 0,04  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para MDMA y 0,03  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para PMA en matrices aisladas.(120) Katayama *et al.* obtuvieron límites de detección de 0,33  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (voltamperometría cíclica) y 0,36  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (voltamperometría de onda cuadrada) en la determinación electroquímica de MDMA mediante el uso de electrodo de trabajo de pasta de carbono (121), por otro lado, Teófilo *et al.* emplearon electrodo de trabajo de diamante dopado con boro para la determinación de MDMA obteniendo mediante voltamperometría diferencial de pulsos un límite de detección de 0,3  $\mu\text{mol mL}^{-1}$ .(122) El uso de electrodos serigrafiados de carbono en la detección electroquímica de MDMA ha sido abordado por Alves *et al.* obteniendo un límite de detección de 1,83  $\mu\text{mol L}^{-1}$  y un límite de cuantificación de 6,11  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .(123)

Los artículos basados en el estudio electroquímico de catinonas sintéticas son limitados (7), sin embargo, en los últimos años ha sido notorio el aumento de estudios reportados con este

enfoque, pese a esta favorable tendencia creciente, no se cuenta con la suficiente base bibliográfica correspondiente a biosensores enzimáticos con aplicación a la detección de catinonas sintéticas, por tanto los resultados obtenidos tienen como punto de referencia los estudios obtenidos con plataformas simples o modificadas aplicadas a la detección de diferentes moléculas de la familia de las catinonas sintéticas. Es de destacar en el presente estudio, al igual que con los resultados obtenidos con MDMA, que los resultados obtenidos muestran una mejoría importante en cuanto a límites de detección en comparación con reportes donde se emplean electrodos no modificados, vale la pena hacer mención de algunos estudios como el desarrollado por Smith *et al.* en 2014, donde obtuvo límites de detección de  $11,80 \mu\text{g mL}^{-1}$  y  $11,60 \mu\text{g mL}^{-1}$  para ( $\pm$ )-4-metilmetcatinona (4-MMC) y ( $\pm$ )-4-metil-N-etilcatinona (4-MEC) empleando electrodos serigrafados de grafito.(124) Por otro lado, Scheel *et al.* exploró la detección de etilona usando electrodo de diamante dopado con boro obteniendo límites de detección y cuantificación de  $3,7 \mu\text{M}$  y  $12,3 \mu\text{M}$ , respectivamente, destacándose que en su estudio se evaluó la interferencia de diferentes adulterantes, entre esos MDMA, que no generó interferencia en la señal de etilona. Recientemente Elbardisy *et al.* obtuvieron límites de detección de  $6,34$  y  $3,87 \mu\text{g mL}^{-1}$  en la detección electroquímica de nor-mefedrona (4-metilcatinona, 4-MC) y dihidromefedrona (4-metilefedrina, 4-MMC-R), respectivamente, usando electrodos serigrafados de grafito desnudo, las dos especies químicas corresponden a metabolitos de mefedrona encontrados en orina humana.(125) Por último, Lima *et al.* empleó electrodos serigrafados de grafito para la determinación de 3,4-metilendioxiptovalerona (MDPV), catinona sintética estructuralmente similar a  $\alpha$ -PVP pero con un grupo metilendioxi adicional en el anillo bencénico, los autores reportan un límite de detección de  $0,5 \mu\text{M}$ .(126)

## 6.7. Análisis de interferentes

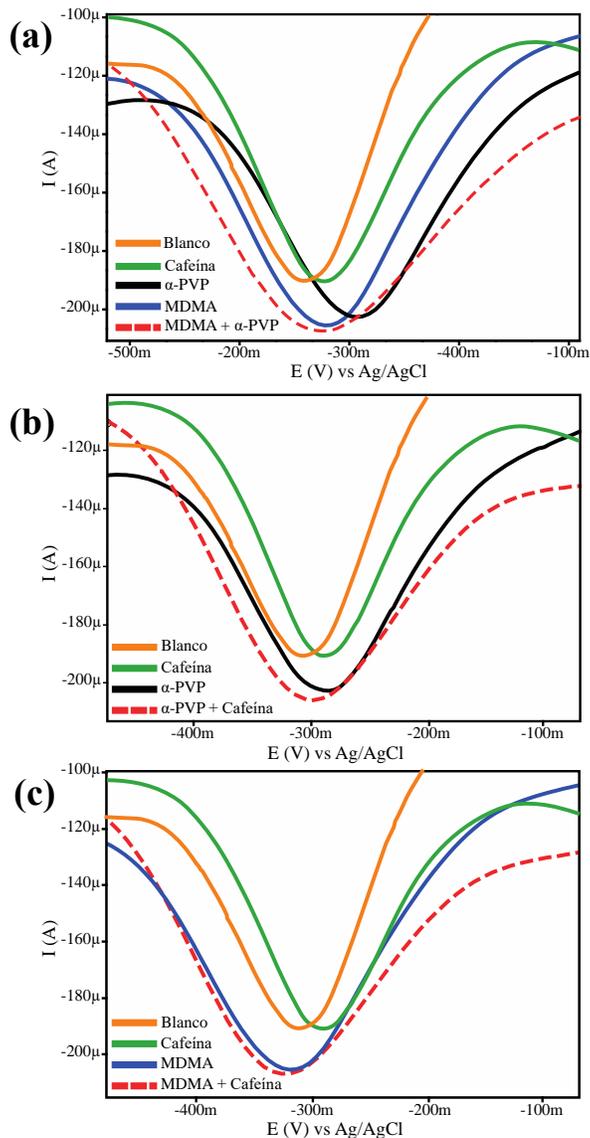
Se analizó la interferencia que podría generar la presencia de los dos analitos en una misma matriz de análisis (matriz binaria), teniendo en cuenta que este tipo de matrices mixtas son muy comunes, además, se exploró también los cambios generados por la cafeína en la respuesta electroquímica de los analitos de interés, pues la cafeína es un adulterante comúnmente encontrado en la mayoría de las sustancias psicoactivas con efecto estimulante del sistema nervioso central. En la **Gráfica 17** se presentan los VDPs de los analitos MDMA y  $\alpha$ -PVP en una matriz en la que coexisten ambos analitos (**Gráfica 17-(a)**), donde se observa que el pico catódico de MDMA (línea azul) se superpone al pico catódico de  $\alpha$ -PVP (línea negra), observándose a la vez un ensanchamiento del pico correspondiente a la matriz mixta (línea discontinua de color rojo) en comparación con los picos de los analitos por separado, además de que el pico generado por la matriz mixta no tuvo diferencias notables con respecto al pico catódico de MDMA (línea azul).

En la **Gráfica 17-(b)** se observan cambios notables en el pico catódico de la matriz mixta que contenía  $\alpha$ -PVP y cafeína (línea discontinua de color rojo) con respecto al pico obtenido con  $\alpha$ -PVP (línea negra), probablemente debido a que la concentración del interferente (cafeína) es notablemente mayor que la de  $\alpha$ -PVP y esto podría generar efecto matriz, pues en la respuesta del biosensor frente a cafeína en una matriz aislada (**línea verde, Gráfica 17-(b)**) solo se observa un desplazamiento a potenciales más negativos con respecto a la señal del blanco pero no se observa una respuesta en termino de aumento de potencial de pico con

---

respecto al blanco (línea naranja). La **Gráfica 17-(c)** corresponde a la matriz mixta compuesta por MDMA y cafeína (línea discontinua de color rojo), se puede observar que no se observan cambios notables en la intensidad del pico catódico con respecto al pico catódico de MDMA (línea azul). En ambos casos (**Gráfica 17-(b) y (c)**) se presentó un ligero desplazamiento del pico catódico en términos de potencial, pues en la matriz  $\alpha$ -PVP + cafeína el pico catódico se generó a -302 mV cuando la respuesta electroquímica de  $\alpha$ -PVP en matriz aislada se generó a -298 mV, en cuanto a la matriz MDMA + cafeína, esta presentó una respuesta electroquímica a -322 mV mientras que la respuesta de MDMA se presentó a -321 mV, estos desplazamientos de potenciales de pico fueron muy pequeños y se enmarcan dentro de la variabilidad que pueden tener este tipo de biosensores, pues diferentes factores como la variabilidad que puede existir entre un biosensor y otro, la orientación de los sitios activos de la enzima inmovilizada y la conservación de esta pueden generar ligeros cambios, es por esta razón que en la literatura científica reciente se proponen rangos de potencial en los que se presenta la respuesta electroquímica de biosensores basados en hemoenzimas, sin precisar valores exactos.(76)

**Gráfica 17.** VDPs de matrices binarias: (a) MDMA 0,05  $\mu$ M +  $\alpha$ -PVP 0,05  $\mu$ M; (b) MDMA 0,05  $\mu$ M + Cafeína 5mM; (c)  $\alpha$ -PVP 0,05  $\mu$ M + Cafeína 5mM.



En términos de error relativo (**Tabla 5**) se destaca que dicho valor no excedió el 5% en las matrices evaluadas (valores reportados a partir de resultados obtenidos por triplicado). En la matriz  $\alpha$ -PVP + MDMA se presenta una superposición del pico de MDMA sobre el de  $\alpha$ -PVP, lo cual era de esperarse teniendo en cuenta que, tal como se pudo establecer en el apartado anterior, la señal de MDMA presenta valores más altos de corrientes de pico catódico (  $-205 \mu$ A) que la de  $\alpha$ -PVP ( $-202 \mu$ A), cuando estas dos especies están a igual concentración (0,05  $\mu$ M para el caso del presente experimento), además de esto, teniendo en cuenta que el pico catódico generado para ambas especies se presentan a potenciales diferentes ( $-298$  mV para  $\alpha$ -PVP y  $-321$  mV para MDMA), se observa que en la matriz  $\alpha$ -PVP + MDMA la respuesta electroquímica se desplaza a potenciales más cercanos a los característicos de la respuesta electroquímica de MDMA que a la de  $\alpha$ -PVP, razón por la

cual dicha matriz no favorece la detección de  $\alpha$ -PVP. Respecto a lo anterior, una de las estrategias que podrían eliminar esta superposición de picos catódicos y por ende reducir el error relativo sería la aplicación de una etapa de pretratamiento de la muestra basada en una separación cromatográfica, en la cual se coincide con la propuesta de Smith *et al.* y Elbardisy *et al.* de la utilización de cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a un detector amperométrico (HPLC-AD) como estrategia para superar las interferencias presentadas en sus respectivos estudios (124,125): Smith *et al.* reportaron en su estudio que la detección electroanalítica de metcatinona, mefedrona y metilecatinona empleando electrodos serigrafados de grafito fue posible, pero se presentó falta de selectividad en el análisis de una mezcla de estas tres especies químicas.(124) Elbardisy *et al.* por su parte emplearon electrodos serigrafados de grafito sin modificaciones para la detección de mefedrona y sus metabolitos nor-mefedrona y dihidromefedrona en orina, sin embargo al pH 3 establecido por los autores como óptimo se presentó superposición de las señales electroquímicas dihidromefedrona y el adulterante paracetamol  $\beta$ -D-glucurónido.(125) Otra alternativa novedosa es la aplicación de un sistema multielectrodo, en este caso un sistema multisensor donde posteriormente a una fase de separación de componentes de la matriz se pueda realizar una detección simultánea de los diferentes componentes.(127,128)

**Tabla 5.** Error relativo en la respuesta electroquímica de analitos en matrices binarias.

Matriz de análisis	Analito de interés	Error relativo (%)
$\alpha$ -PVP + MDMA	MDMA	1,46
$\alpha$ -PVP + MDMA	$\alpha$ -PVP	2,97
$\alpha$ -PVP + Cafeína	$\alpha$ -PVP	3,46
MDMA + Cafeína	MDMA	0,97

Respecto a las matrices en las que se incluyó cafeína como agente interferente, se observa que la presencia de esta no representa cambios notables en la respuesta del analito solo en la matriz MDMA + cafeína. En la matriz  $\alpha$ -PVP + Cafeína se hace imposible la detección de  $\alpha$ -PVP, pese a que en la medida de la respuesta del biosensor frente a cafeína en una matriz aislada (**líneas verde, gráfica 17**) no se observa una respuesta de esta con respecto a la señal del blanco. En estudios como el reportado por Scheel *et al.* se presentó superposición de señales de etilona y cafeína en muestras incautadas, la interferencia generada por la cafeína fue corregida mediante un proceso previo de extracción en fase sólida con octadecil sílice.(129) En el presente estudio se ha atribuido la nula respuesta del biosensor frente a cafeína a la nula afinidad de esta molécula con la isoforma CYP2D6 del citocromo P450 que funciona como componente biológico de reconocimiento en el sistema C-SPE-CYP2D6, pues es sabido que la isoforma CYP1A2 es la principalmente implicada en el metabolismo de fase 1 de la cafeína y relacionada con la formación de paraxantina, metabolito principal resultante, siendo un elemento de alta afinidad y teniendo también participación como elementos de baja afinidad de otras isoformas como la 2E1.(130–132) De acuerdo con lo anterior, la cafeína no es un sustrato de la isoforma 2D6, por tal razón no se presenta una respuesta relacionada con esta. Pese a lo anterior, la cafeína parece generar cambios en la respuesta de los analitos  $\alpha$ -PVP y MDMA frente al biosensor electroquímico estudiado.

## 7. Conclusiones, Impacto, recomendaciones y limitaciones

### Conclusiones

La modificación de electrodos serigrafiados de carbono con la isoenzima CYP2D6 mediante unión covalente por electrografting mostró ser eficiente, pues mostro que tras la modificación del electrodo se presenta una transferencia de electrones hacia la biomolécula inmovilizada, lo cual se pudo constatar en la respuesta del biosensor frente a analitos e inhibidor. La caracterización electroquímica de C-SPE-CYP2D6 mediante cupla ferro/ferricianuro de potasio permitió evidenciar la modificación de la superficie del electrodo con CYP2D6, a la vez que la caracterización con el inhibidor quinidina permitió confirmar que el biosensor desarrollado presentó una respuesta ante la presencia del inhibidor, confirmando así que efectivamente hubo presencia del elemento biológico de reconocimiento inmovilizado covalentemente sobre la superficie del electrodo y que este generaba una respuesta relacionada con su actividad catalítica.

Los dos picos catódicos generados en la respuesta voltamperométrica de C-SPE-CYP2D6 frente a los analitos mostraron ser característicos del citocromo P450, tal como diferentes autores lo reportan, sin embargo, los experimentos llevados a cabo en el presente estudio permitieron confirmar que solo el pico generado en un rango de potencial aproximado de -290 a -321 mV corresponde a la cupla  $Fe^{+3}/Fe^{+2}$ , pico sobre el cual se presenta la actividad catalítica de la isoenzima CYP2D6.

La respuesta del biosensor frente a los analitos mostró estar relacionada con un fenómeno catalítico, pues se observó un aumento directamente proporcional de las corrientes de pico con respecto al aumento en la concentración de los analitos, dicha respuesta mostró tener una tendencia lineal, lo cual permite que el sistema sea altamente aplicable a la detección electroquímica de los analitos estudiados.

La aplicabilidad de la detección de los analitos estudiados en matrices binarias no fue viable, pues pese a que los valores de porcentaje de error relativo con respecto a la matriz binaria fueron bajos, la señal voltamperométrica de los analitos  $\alpha$ -PVP y MDMA son muy similares, lo cual da lugar a la superposición de señales y la imposibilidad diferenciar ambas especies en una misma matriz, por tal razón se propone como posible solución la aplicación de una fase de pretratamiento en la que se puedan separar los componentes de la matriz para luego abordar la detección y cuantificación por separado. Finalmente, la cafeína como agente de corte no mostró tener una influencia sobre la respuesta electroquímica de MDMA, aún cuando la concentración de esta fue mucho mayor a la del analito, lo cual confirma la selectividad del biosensor desarrollado por sus sustratos.

El estudio llevado a cabo representa el primero de su tipo tanto en Colombia como a nivel global con aplicación a la detección de  $\alpha$ -PVP, MDMA y la matriz binaria  $\alpha$ -PVP + MDMA, lo cual representa una novedad y un aporte de gran relevancia en el análisis electroquímico de sustancias psicoactivas, pues los resultados obtenidos demuestran una mejora importante en los límites de detección y cuantificación obtenidos con el biosensor C-SPE-CYP2D6 con

---

respecto a los reportados en la literatura científica con sistemas que no integran un sistema biológico de reconocimiento.

## **Impacto**

El biosensor desarrollado en la presente tesis representa el primer intento de abordar la detección de catinonas sintéticas y anfetaminas ( $\alpha$ -PVP y MDMA) mediante un biosensor basado en el citocromo P450. Como resultado del presente estudio se sabe que el biosensor en matrices aisladas permite explorar valores bajos de concentración (del rango de ng/mL) debido a los bajos valores de límites de detección y cuantificación obtenidos, por tanto, representa una alternativa novedosa, rápida y económica con potencial aplicación al análisis de sustancias controladas, especialmente en el campo forense donde se trabaja con cantidades limitadas de muestra, pues en el análisis electroquímico a través de biosensores enzimáticos y adicionalmente con el uso de electrodos serigrafados las cantidades de muestra empleadas son bajas (5 a 20  $\mu$ L).(55) Por otro lado, la aplicación de este tipo de biosensores abre la puerta no solo a la detección de otro tipo de analitos, sino también al uso de otras isoenzimas, permitiendo expandir la aplicabilidad de este tipo de sistemas no solo a detección de analitos sino al estudio *in vitro* del metabolismo de diferentes sustancias, pues en términos generales este sistema se basa en la inducción por vía electroquímica de la actividad catalítica que el citocromo P450 experimenta en el organismo.

De acuerdo con lo anterior, no cabe duda de que los resultados obtenidos en el presente estudio representan un avance significativo en la detección de sustancias controladas, a la vez que responde a la tendencia actual de miniaturización de las plataformas de detección, por lo cual constituye una poderosa herramienta de análisis, con gran impacto especialmente en el campo del electroanálisis de sustancias psicoactivas, campo que ha mostrado crecimiento en los últimos años en términos de reportes en la literatura.(7)

Finalmente, el presente trabajo representa el primer estudio de este tipo a nivel mundial, pues según lo consultado en la literatura científica reportada hasta el momento, el uso de un biosensor basado en la isoenzima 2D6 del citocromo P450 como elemento de biorreconocimiento para la detección de  $\alpha$ -PVP y MDMA, y además el abordaje de matrices binarias de los analitos mencionados no ha sido abordado. Además de ser el primer estudio de este tipo en Colombia, el presente estudio es el resultado del trabajo conjunto entre el Grupo de Investigación en Sustancias Psicoactivas del programa de Maestría en Toxicología de la Universidad Nacional de Colombia y el semillero de investigación en electroquímica de sistemas biológicos, moléculas orgánicas pequeñas y polímeros, adscrito al Grupo de Investigación en Productos Naturales Amazónicos de la Universidad de la Amazonia, lo cual constituye una interacción entre grupos de investigación para resolver una problemática global, pero estrechamente ligada a la realidad nacional.

## **Recomendaciones**

Es el primer estudio donde se aplica la electroquímica a la detección de drogas de abuso en la maestría en toxicología, como también es el primer acercamiento a la aplicación de biosensores electroquímicos para este fin, por lo cual se sugiere abordar a futuro el proceso

de validación y continuar con otros estudios de este tipo, abordando el estudio tanto de biosensores electroquímicos basados en otras isoformas del citocromo P450, como plataformas basadas en otros elementos de reconocimiento como anticuerpos, aptámeros, células, etc. Además, se recomienda ampliar el enfoque del presente estudio a otras drogas de abuso, especialmente a las drogas sintéticas, debido a los retos a los que la sociedad actual se enfrenta en términos de la detección de estas.

Se recomienda la caracterización del biosensor electroquímico mediante técnicas de espectroscopia y microscopia que permitan confirmar la modificación del electrodo con mayor detalle.

Abordar la aplicación de nanomateriales para el mejoramiento del desempeño del biosensor desarrollado, como por ejemplo, nanopartículas de oro, nanotubos de carbono, entre otros.

Realizar estudios posteriores donde se apliquen técnicas acopladas como cromatografía líquida acoplada a un detector voltamperométrico o estudios de implementación de una fase previa de separación de componentes de una matriz, ya sea binaria o de mayor complejidad, con el fin de reducir o eliminar la influencia de otras sustancias en la respuesta electroquímica de analitos de interés.

## **Limitaciones**

La emergencia sanitaria causada por la pandemia de COVID-19 generó una limitación de tiempo y disposición de espacios durante la fase experimental debido a que estuvo restringida la entrada a los laboratorios, por otra parte, esta misma situación generó demoras en la adquisición de materiales necesarios para dar inicio a la fase experimental. Adicionalmente, el acceso a servicios prestados por laboratorios externos no fue posible, por tanto no se pudo caracterizar microscópicamente y espectroscópicamente el biosensor desarrollado, finalmente, el estudio de la respuesta electroquímica del biosensor enzimático en condiciones saturadas de O<sub>2</sub> fue imposible debido a que en ese mismo momento se presentó un desabastecimiento a nivel global de este gas debido a la alta demanda para uso médico en el marco de la pandemia.

---

## **8. Fuente de financiación**

La presente tesis de maestría está vinculada al proyecto “DETERMINACIÓN DE CATINONAS SINTÉTICAS EN MATERIAL INCAUTADO EN COLOMBIA MEDIANTE UN BIOSENSOR ELECTROQUÍMICO BASADO EN LA ENZIMA CYP2D6” con código Hermes 48279, y recibió financiación en el marco de la convocatoria de apoyo a proyectos de investigación y creación artística de la sede Bogotá de la Universidad Nacional de Colombia (2019), llevada a cabo por la vicerrectoría de investigaciones de la sede Bogotá de la Universidad Nacional de Colombia.

## Bibliografía

1. UNODC. INFORME MUNDIAL SOBRE LAS DROGAS 2020 - RESUMEN EJECUTIVO. 2020. p. 1–14.
2. Mendoza-Valencia CY, Mariño Gaviria DJ, Patiño Reyes N, Lopez-Vallejo F, Sarmiento Gutiérrez ÁE, Trespalacios Rodríguez D. Mix of new substances psychoactive, NPS, found in blotters sold in two Colombian cities. *Forensic Sci Int.* 2019;304.
3. Feng L, Battulga A, Han E, Chung H. New psychoactive substances of natural origin : A brief review. *J food drug Anal.* 2017;25:461–71.
4. Cruz SL, Teresa M, García R. Las nuevas drogas : origen , mecanismos de acción y efectos . Una revisión de la literatura. *Rev int investig adicciones.* 2015;52(55):68–76.
5. João M, Paula V, Pinho G De. Khat and synthetic cathinones : a review. *Arch Toxicol.* 2014;88:15–45.
6. Coppola M, Mondola R. Synthetic cathinones : Chemistry , pharmacology and toxicology of a new class of designer drugs of abuse marketed as “ bath salts ” or “ plant food .” *Toxicol Lett.* 2012;211(2):144–9.
7. Lugo-Vargas A, Chaves-Silva D, Quevedo-Buitrago W, Martínez-Suárez J. Catinonas sintéticas: una revisión del panorama actual y las estrategias de detección analítica. *Rev toxicol.* 2020;37:31–40.
8. Felice LJ De, Glennon RA, Negus SS. Synthetic cathinones : Chemical phylogeny , physiology , and neuropharmacology. *Life Sci.* 2014;97(1):20–6.
9. Espert R, Pérez J, Gadea M, Oltra-Cucharella J AM. Drogas emergentes: catinonas sintéticas (“sales de baño”). *Rev Esp Droq.* 2015;40(2):56–71.
10. Graddy R, Buresh ME, Rastegar DA. New and Emerging Illicit Psychoactive Substances. *Med Clin North Am.* 2018;102(4):697–714.
11. Valento M, Lebin J. Emerging Drugs of Abuse: Synthetic Cannabinoids, Phenylethylamines (2C Drugs), and Synthetic Cathinones. *Clin Pediatr Emerg Med.* 2017;18(3):203–11.
12. Prosser JM, Nelson LS. The Toxicology of Bath Salts: A Review of Synthetic Cathinones. *J Med Toxicol.* 2012;8(1):33–42.
13. Riley AL, Nelson KH, To P, López-arnau R, Xu P, Wang D, et al. Abuse potential and toxicity of the synthetic cathinones ( i . e . , “ Bath salts ”). *Neurosci Biobehav Rev.* 2018;(July):1–24.
14. ODC. Sistema de alertas tempranas: Aparición de nuevas sustancias psicoactivas en Colombia. Enero de 2017. 2017. Available from: [http://www.odc.gov.co/Portals/1/publicaciones/pdf/consumo/sat/sat12302017\\_boletin\\_sat\\_enero\\_2017.pdf](http://www.odc.gov.co/Portals/1/publicaciones/pdf/consumo/sat/sat12302017_boletin_sat_enero_2017.pdf)
15. Banks ML, Worst TJ, Rusyniak DE, Sprague JE. Synthetic cathinones (“Bath Salts”). *J Emerg Med.* 2014;46(5):632–42.
16. Ferreira C, Vaz AR, Florindo PR, Lopes Á, Brites D, Quintas A. Development of a high throughput methodology to screen cathinones’ toxicological impact. *Forensic Sci Int.* 2019;298:1–9.
17. Tremeau-Cayel L, Carnes S, Schanfield MS, Lurie IS. A comparison of single quadrupole mass detection and diode array ultraviolet detection interfaced to ultra-high performance supercritical chromatography for the quantitative analysis of

- synthetic cathinones. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*. 2018;1091(January):96–100.
18. Nóbrega L, Dinis-Oliveira RJ. The synthetic cathinone  $\alpha$ -pyrrolidinovalerophenone ( $\alpha$ -PVP): pharmacokinetic and pharmacodynamic clinical and forensic aspects. *Drug Metab Rev*. 2018;50(2):125–39.
  19. Simmler LD, Buser TA, Donzelli M, Schramm Y, Dieu LH, Huwyler J, et al. Pharmacological characterization of designer cathinones in vitro. *Br J Pharmacol*. 2013;168(2):458–70.
  20. Rickli A, Hoener MC, Liechti ME. Monoamine transporter and receptor interaction profiles of novel psychoactive substances: Para-halogenated amphetamines and pyrovalerone cathinones. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2015;25(3):365–76.
  21. Dargan PI, Sedefov R, Gallegos A, Wood DM. The pharmacology and toxicology of the synthetic cathinone mephedrone (4-methylmethcathinone). *Drug Test Anal*. 2011;3(7–8):454–63.
  22. Martínez Clemente J, López-Arnau R, Carbó M, Pubill D, Camarasa J, Escubedo E. Mephedrone pharmacokinetics after intravenous and oral administration in rats: relation to pharmacodynamics. *Psychopharmacology (Berl)*. 2013;229(2):295–306.
  23. Ellefsen KN, Concheiro M, Huestis MA. Synthetic cathinone pharmacokinetics, analytical methods, and toxicological findings from human performance and postmortem cases. *Drug Metab Rev*. 2016;48(2):237–65.
  24. Papaseit E, Pérez-Mañá C, Mateus JA, Pujadas M, Fonseca F, Torrens M, et al. Human pharmacology of mephedrone in comparison with MDMA. *Neuropsychopharmacology*. 2016;41(11):2704–13.
  25. Vignali C, Moretti M, Groppi A, Osculati AMM, Tajana L, Morini L. Distribution of the synthetic cathinone  $\alpha$ -pyrrolidinohexiophenone in biological specimens. *J Anal Toxicol*. 2019;43(1):E1–6.
  26. López-arnau R, Martínez-clemente J, Pubill D, Escubedo E, Camarasa J. Comparative neuropharmacology of three psychostimulant cathinone derivatives: butylone, mephedrone and methylone. *Br J Pharmacol*. 2012;167:407–20.
  27. Meyer MR, Maurer HH. Metabolism of Designer Drugs of Abuse: An Updated Review. *Curr Drug Metab*. 2010;11:468–82.
  28. Silva EA, Martínez JA. Antecedentes del estudio metabólico de MDPV y metilona. Propuesta de un modelo de biotransformación a través de hongos del género *Cunninghamella*. *Rev Colomb Ciencias químico-farmacéuticas*. 2016;45(3):484–502.
  29. Manier SK, Richter LHJ, Schäper J, Maurer HH, Meyer MR. Different in vitro and in vivo tools for elucidating the human metabolism of alpha-cathinone-derived drugs of abuse. Vol. 10, *Drug Testing and Analysis*. 2018. 1119–1130 p.
  30. Pedersen AJ, Petersen TH, Linnet K. In vitro metabolism and pharmacokinetic studies on methylone. *Drug Metab Dispos*. 2013;41(6):1247–55.
  31. Calinski DM, Kisor DF, Sprague JE. A review of the influence of functional group modifications to the core scaffold of synthetic cathinones on drug pharmacokinetics. *Psychopharmacology (Berl)*. 2019;236(3):881–90.
  32. Olesti E, Farré M, Carbó M, Papaseit E, Perez-Mañá C, Torrens M, et al. Dose-Response Pharmacological Study of Mephedrone and Its Metabolites: Pharmacokinetics, Serotonergic Effects, and Impact of CYP2D6 Genetic Variation. *Clin Pharmacol Ther*. 2019;106(3).
  33. Tyrkko E, Andersson M, Kronstrand R. The toxicology of new psychoactive

- substances: Synthetic cathinones and phenylethylamines. *Ther Drug Monit.* 2016;38(2):190–216.
34. Meyer MR, Wilhelm J, Peters FT, Maurer HH. Beta-keto amphetamines : studies on the metabolism of the designer drug mephedrone and toxicological detection of mephedrone , butylone , and methylone in urine using gas chromatography – mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2010;397:1225–33.
  35. Strano-rossi S, Cadwallader AB, Torre X De, Botre F. Toxicological determination and in vitro metabolism of the designer drug methylenedioxypropylone ( MPDV ) by gas chromatography / mass spectrometry and liquid chromatography / quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2010;24:2706–14.
  36. Namera A, Konuma K, Kawamura M, Saito T, Nakamoto A, Yahata M, et al. Time-course profile of urinary excretion of intravenously administered  $\alpha$ -pyrrolidinovalerophenone and  $\alpha$ -pyrrolidinobutylphenone in a human. *Forensic Toxicol.* 2013;32(1):68–74.
  37. German CL, Fleckenstein AE, Hanson GR. Bath salts and synthetic cathinones: An emerging designer drug phenomenon. *Life Sci.* 2014;97(1):2–8.
  38. Carvalho M, Carmo H, Costa VM, Capela JP, Pontes H, Remião F, et al. Toxicity of amphetamines: An update. *Arch Toxicol.* 2012;86(8):1167–231.
  39. Cunha-Oliveira T, Rego AC, Carvalho FA, Oliveira CR. Medical Toxicology of Drugs of Abuse. In: Principles of Addiction. 2013. p. 159–75.
  40. Rasmussen N. Amphetamine-type stimulants: The early history of their medical and non-medical uses. 1st ed. Vol. 120, *International Review of Neurobiology*. Elsevier Inc.; 2015. 9–25 p.
  41. Chen KK, Schmidt CF. The action of ephedrine, an alkaloid from Ma Huang. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1924;21(6):351–4.
  42. Chen KK, Schmidt CF. The action and clinical use of ephedrine: an alkaloid isolated from the chinese drug Ma Huang. *JAMA.* 1926;87(11):836–42.
  43. Edeleano L. Ueber einige Derivate der Phenylmethacrylsäure und der Phenylisobuttersäure. *Berichte der Dtsch Chem Gesellschaft.* 1887;20(1):616–22.
  44. Strohl MP. Bradley ' s Benzedrine Studies on Children with Behavioral Disorders. *Yale J Biol Med.* 2011;84:27–33.
  45. Heal DJ, Smith SL, Gosden J, Nutt DJ. Amphetamine , past and present – a pharmacological and clinical perspective. *J Psychopharmacol.* 2013; 27(6):479-96.
  46. Roberts C, Andrés. Contribution to the study of the mechanisms of action and neuropsychopharmacological effects of MDMA and new  $\beta$ -ketoamphetamines. Universitat de Barcelona; 2016.
  47. De La Torre R, Farré M, Roset PN, Pizarro N, Abanades S, Segura M, et al. Human Pharmacology of MDMA: Pharmacokinetics, Metabolism, and Disposition. *Ther Drug Monit.* 2004;26(2):137–44.
  48. Young R, Glennon RA. MDMA (N-methyl-3,4-methylenedioxyamphetamine) and its stereoisomers: Similarities and differences in behavioral effects in an automated activity apparatus in mice. *Pharmacol Biochem Behav.* 2008;88(3):318–31.
  49. Jamali B, Torkamanian M, Badri N, Sheikholeslami B, Ardakani YH, Rouini MR. Assays for MDMA and Its Metabolites. *Neuropathol Drug Addict Subst Misuse.* 2016;2(November 2018):503–12.
  50. UNODC. World Drug Report 2019: Stimulants. 2019. Available from: [https://wdr.unodc.org/wdr2019/prelaunch/WDR19\\_Booklet\\_4\\_STIMULANTS.pdf](https://wdr.unodc.org/wdr2019/prelaunch/WDR19_Booklet_4_STIMULANTS.pdf)

51. UNODC. DRUG MARKET TRENDS: COCAINE AMPHETAMINE- TYPE STIMULANTS. 2021.
52. ODC. Sistema de alertas tempranas: Aparición de nuevas sustancias psicoactivas en Colombia. Septiembre de 2017. [Internet]. 2017. Available from: [http://www.odc.gov.co/Portals/1/publicaciones/pdf/consumo/sat/sat092017\\_boletin\\_nuevas\\_sustancias\\_septiembre\\_2017.pdf](http://www.odc.gov.co/Portals/1/publicaciones/pdf/consumo/sat/sat092017_boletin_nuevas_sustancias_septiembre_2017.pdf)
53. ODC. Alerta informativa: comercialización de catinonas sintéticas como éxtasis bajo la presentación de polvo y cristales (Molly y MD). 2020.
54. Chau F, Leung AK. Application of Wavelet Transform in Electrochemical Studies. In: Walczak B, editor. *Wavelets in Chemistry. Elsevier Science B.V.*; 2000. p. 225–39.
55. Wang J. ANALYTICAL ELECTROCHEMISTRY. 3rd. ed. Hoboken, New Jersey: John Woley & Sons, Inc.; 2006. 1–3 p.
56. Patel B. Electrochemistry for bioanalysis. 1st Editio. Nueva Delhi, India: Gayathri S; 2021.
57. Dawkins RC, Wen D, Hart JN, Vepsäläinen M. A screen-printed Ag/AgCl reference electrode with long-term stability for electroanalytical applications. *Electrochim Acta*. 2021;393:139-43.
58. Li M, Li YT, Li DW, Long YT. Recent developments and applications of screen-printed electrodes in environmental assays-A review. *Anal Chim Acta*. 2012;734:31–44.
59. García-Miranda Ferrari A, Rowley-Neale SJ, Banks CE. Screen-printed electrodes: Transitioning the laboratory in-to-the field. *Talanta Open*. 2021;3(February):100032.
60. Sher M, Faheem A, Asghar W, Cinti S. Nano-engineered screen-printed electrodes: A dynamic tool for detection of viruses. *TrAC - Trends Anal Chem*. 2021;143:116374.
61. Simões FR, Xavier MG. Chapter 6 - Electrochemical Sensors. In: Micro and Nano Technologies. Elsevier Inc.; 2017. p. 155–78.
62. Rezaei B, Irannejad N. Electrochemical detection techniques in biosensor applications. *Electrochemical Biosensors*. Elsevier Inc.; 2019. 11–43 p.
63. Compton RG, Banks CE. Understanding Voltammetry. 3rd. Ed. United Kingdom: World Scientific Europe Ltd.; 2018. 1–11 p.
64. Elgrishi N, Rountree KJ, McCarthy BD, Rountree ES, Eisenhart TT, Dempsey JL. A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry. *J Chem Educ*. 2017;acs.jchemed.7b00361.
65. Martínez Suárez JF. COMPORTAMIENTO ELECTROQUÍMICO DE COLORANTES ANTRAQUINÓNICOS, AZUL DE METILENO, Y COMPUESTOS AFINES EN SOLUCIÓN DE SOLVENTES NO-ACUOSOS. Universidad Nacional de La Plata; 2017.
66. Müller M, Agarwal N, Kim J. A cytochrome P450 3A4 biosensor based on generation 4.0 PAMAM dendrimers for the detection of caffeine. *Biosensors*. 2016;6(44).
67. Shumyantseva V V., Kuzikov A V., Masamrekh RA, Bulko T V., Archakov AI. From electrochemistry to enzyme kinetics of cytochrome P450. *Biosens Bioelectron*. 2018;121(August):192–204.
68. Yates ND, Fascione MA, Parkin A. Methodologies for “wiring” redox proteins/enzymes to electrode surfaces. *Chem A Eur J*. 2018;24(47):12164–82.
69. Arribas LA. Development of electrochemical devices for the determination of drugs of abuse. Universidad de Burgos; 2014.
70. Gilardi G. Cytochromes P450 Redox Activity. *Encyclopedia of Interfacial Chemistry*.

- Elsevier; 2018. 90–109 p.
71. González-Rodríguez JC, Guerra-Rodeiro D. El sistema citocromo P450 y el metabolismo de xenobióticos. *Rev Cuba Farm.* 2014;48(2):495–507.
  72. Esteves F, Rueff J, Kranendonk M. The Central Role of Cytochrome P450 in Xenobiotic Metabolism—A Brief Review on a Fascinating Enzyme Family. *J Xenobiotics.* 2021;11(3):94–114.
  73. Nebert DW, Adesnik M, Coon MJ, Estabrook RW, Gonzalez FJ, Guengerich FP, et al. The P450 Gene Superfamily: Recommended Nomenclature. *DNA.* 1987;6(1):1–11.
  74. Ensafi AA. An introduction to sensors and biosensors. In: *Electrochemical Biosensors.* Elsevier Inc.; 2019. p. 1–10.
  75. Thevenot D, Toth K, Durst R, Wilson G, Thevenot D, Toth K, et al. Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification. *Biosens Bioelectron.* 2001;16(1–2):121–31.
  76. Zuccarello L, Barbosa C, Todorovic S, Silveira CM. Electrocatalysis by Heme Enzymes — Applications in Biosensing. *Catalysts.* 2021; 218 (11).
  77. Navaee A, Salimi A. Chapter 7 - Enzyme-based electrochemical biosensors. *Electrochemical Biosensors.* Elsevier Inc.; 2019. 167–211 p.
  78. Mueller DM, Rentsch KM. Generation of metabolites by an automated online metabolism method using human liver microsomes with subsequent identification by LC-MS(n), and metabolism of 11 cathinones. *Anal Bioanal Chem.* 2012;402(6):2141–51.
  79. Clark LC, Lyons C. Electrode Systems for Continuous Monitoring in Cardiovascular Surgery. *Ann N Y Acad Sci.* 1962;102(1):29–45.
  80. Yáñez-Sedeño P, Campuzano S, Pingarrón JM. Integrated affinity biosensing platforms on screen-printed electrodes electrografted with diazonium salts. *Sensors (Switzerland).* 2018;18(2).
  81. Bélanger D, Pinson J. Electrografting: A powerful method for surface modification. *Chem Soc Rev.* 2011;40(7):3995–4048.
  82. Lebon F. Nano-composants à base de films minces organiques électrogressés : Fabrication , caractérisation , étude du transport électronique et intégration Organic electrografted thin films based. l'Université Paris-Saclay. 2019.
  83. Hetemi D, Noël V, Pinson J. Grafting of Diazonium Salts on Surfaces : Application to Biosensors. *Biosensors.* 2020;10(4).
  84. Tehrani Z, Abbasi HY, Devadoss A, Evans JE, Guy OJ. Assessing surface coverage of aminophenyl bonding sites on diazotised glassy carbon electrodes for optimised electrochemical biosensor performance. *Nanomaterials.* 2021;11(2):1–14.
  85. Gui AL, Liu G, Chockalingam M, le Saux G, Luais E, Harper JB, et al. A comparative study of electrochemical reduction of 4-nitrophenyl covalently grafted on gold and carbon. *Electroanalysis.* 2010;22(16):1824–30.
  86. Bart J, Tiggelaar R, Yang M, Schlautmann S, Zuilhof H, Gardeniers H. Room-temperature intermediate layer bonding for microfluidic devices. *Lab Chip.* 2009;9(24):3481–8.
  87. Silva WP, Rocha RG, Arantes LC, Lima CD, Melo LMA, Munoz RAA, et al. Development of a simple and rapid screening method for the detection of 1-(3-chlorophenyl)piperazine in forensic samples. *Talanta.* 2021;233(June):122597.
  88. Oiye ÉN, Figueiredo NB de, Andrade JF de, Tristão HM, Oliveira MF de. Voltammetric determination of cocaine in confiscated samples using a cobalt

- hexacyanoferrate film-modified electrode. *Forensic Sci Int.* 2009;192(1–3):94–7.
89. Oiyé ÉN, Midori Toia Katayama J, Fernanda Muzetti Ribeiro M, de Oliveira MF. Electrochemical analysis of 25H-NBOMe by Square Wave Voltammetry. *Forensic Chem.* 2017;5:86–90.
  90. Asturias-Arribas L, Asunción Alonso-Lomillo M, Domínguez-Renedo O, Julia Arcos-Martínez M. Cytochrome P450 2D6 based electrochemical sensor for the determination of codeine. *Talanta.* 2014;129:315–9.
  91. Asturias-arribas L, Alonso-lomillo MA, Domínguez-renedo O, Arcos-martínez MJ. CYP450 biosensors based on screen-printed carbon electrodes for the determination of cocaine. *Anal Chim Acta.* 2011;685(1):15–20.
  92. Alonso-Lomillo MA, Yardimci C, Domínguez-Renedo O, Arcos-Martínez MJ. CYP450 2B4 covalently attached to carbon and gold screen printed electrodes by diazonium salt and thiols monolayers. *Anal Chim Acta.* 2009;633(1):51–6.
  93. Delamar M, Hitmi R, Pinson J, Savéant J. Covalent Modification of Carbon Surfaces by Grafting of Functionalized Aryl Radicals Produced from Electrochemical Reduction of Diazonium Salts. *J Am Chem Soc.* 1992;114(14):5883–4.
  94. Downard AJ. Electrochemically assisted covalent modification of carbon electrodes. *Electroanalysis.* 2000;12(14):1085–96.
  95. Doppelt P, Hallais G, Pinson J, Podvorica F, Verneyre S. Surface modification of conducting substrates. Existence of azo bonds in the structure of organic layers obtained from diazonium salts. *Chem Mater.* 2007;19(18):4570–5.
  96. Lacroix JC, Trippe-Allard G, Ghilane J, Martin P. Electrografting of conductive oligomers and polymers using diazonium electroreduction. *Adv Nat Sci Nanosci Nanotechnol.* 2014;5(1).
  97. Phal S, Shimizu K, Mwanza D, Mashazi P, Shchukarev A, Tesfalidet S. Electrografting of 4-carboxybenzenediazonium on glassy carbon electrode: The effect of concentration on the formation of mono and multilayers. *Molecules.* 2020;25(19):1–12.
  98. Dragan AM, Truta FM, Tertis M, Florea A, Schram J, Cernat A, et al. Electrochemical Fingerprints of Illicit Drugs on Graphene and Multi-Walled Carbon Nanotubes. *Front Chem.* 2021;9(March):1–10.
  99. McLaughlin LA, Paine MJI, Kemp CA, Maréchal JD, Flanagan JU, Ward CJ, et al. Why is quinidine an inhibitor of cytochrome P450 2D6? The role of key active-site residues in quinidine binding. *J Biol Chem.* 2005;280(46):38617–24.
  100. Berka K, Anzenbacherová E, Hendrychová T, Lange R, Mašek V, Anzenbacher P, et al. Binding of quinidine radically increases the stability and decreases the flexibility of the cytochrome P450 2D6 active site. *J Inorg Biochem.* 2012;110:46–50.
  101. Iwuoha E, Ngece R, Klink M, Baker P. Amperometric responses of CYP2D6 drug metabolism nanobiosensor for sertraline: A selective serotonin reuptake inhibitor. *IET Nanobiotechnology.* 2007;1(4):62–7.
  102. Franke C, Ajayi RF, Uhuo O, Januarie K, Iwuoha E. Metallodendrimer-sensitised Cytochrome P450 3A4 Electrochemical Biosensor for TB Drugs. *Electroanalysis.* 2020;32(12):3075–85.
  103. Munyai Vukosi E. Recombinant expression of cytochrome P450-2D6 and its application in tamoxifen metabolism. UNIVERSITY OF WESTERN CAPE; 2018.
  104. Iwuoha EI, Smyth MR. Reactivities of organic phase biosensors: 6. Square-wave and differential pulse studies of genetically engineered cytochrome P450cam (CYP101)

- bioelectrodes in selected solvents. *Biosens Bioelectron.* 2002;18(2–3):237–44.
105. dos Santos PR. Development of oxidoreductase based electrochemical biosensors. Universidade Nova de Lisboa; 2013.
  106. Cui D, Mi L, Xu X, Lu J, Qian J, Liu S. Nanocomposites of graphene and cytochrome P450 2D6 isozyme for electrochemical-driven tramadol metabolism. *Langmuir.* 2014;30(39):11833–40.
  107. Shumyantseva V V., Bulko T V., Rudakov YO, Kuznetsova GP, Samenkova NF, Lisitsa A V., et al. Nanoelectrochemistry of cytochrome P450s: Direct electron transfer and electrocatalysis. *Biomeditsinskaya Khimiya.* 2006;52(5):458–68.
  108. Makhova AA, Shumyantseva V V., Shich E V., Bulko T V., Kukes VG, Sizova OS, et al. Electroanalysis of Cytochrome P450 3A4 Catalytic Properties with Nanostructured Electrodes: The Influence of Vitamin B Group on Diclofenac Metabolism. *Bionanoscience.* 2011;1(1–2):46–52.
  109. Huang H, Hu N, Zeng Y, Zhou G. Electrochemistry and electrocatalysis with heme proteins in chitosan biopolymer films. *Anal Biochem.* 2002;308(1):141–51.
  110. De Groot MT, Merckx M, Koper MTM. Heme release in myoglobin-DDAB films and its role in electrochemical NO reduction. *J Am Chem Soc.* 2005;127(46):16224–32.
  111. Rougée LRA, Mohutsky MA, Bedwell DW, Ruterbories KJ, Hall SD. The impact of the hepatocyte-to-plasma pH gradient on the prediction of hepatic clearance and drug-drug interactions for CYP2C9 and CYP3A4 substrates. *Drug Metab Dispos.* 2017;45(9):1008–18.
  112. Ingelman-Sundberg M. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): Clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *Pharmacogenomics J.* 2005;5(1):6–13.
  113. de la Torre R, Yubero-Lahoz S, Pardo-Lozano R, Farré M. MDMA, methamphetamine, and CYP2D6 pharmacogenetics: What is clinically relevant? *Front Genet.* 2012;3(NOV):1–8.
  114. Banks ML, Sprague JE, Kisor DF, Czoty PW, Nichols DE, Nader MA. Ambient temperature effects on 3,4-methylenedioxyamphetamine-induced thermoregulation and pharmacokinetics in male monkeys. *Drug Metab Dispos.* 2007;35(10):1840–5.
  115. Baumann MH, Zolkowska D, Kim I, Scheidweiler KB, Rothman RB, Huestis MA. Effects of dose and route of administration on pharmacokinetics of ( $\pm$ )-3,4-methylenedioxyamphetamine in the rat. *Drug Metab Dispos.* 2009;37(11):2163–70.
  116. Shima N, Katagi M, Kamata H, Matsuta S, Sasaki K, Kamata T, et al. Metabolism of the newly encountered designer drug  $\alpha$ -pyrrolidinovalerophenone in humans: Identification and quantitation of urinary metabolites. *Forensic Toxicol.* 2014;32(1):59–67.
  117. Negreira N, Erratico C, Kosjek T, van Nuijs ALN, Heath E, Neels H, et al. In vitro Phase I and Phase II metabolism of  $\alpha$ -pyrrolidinovalerophenone ( $\alpha$ -PVP), methylenedioxypropylvalerone (MDPV) and methedrone by human liver microsomes and human liver cytosol. *Anal Bioanal Chem.* 2015;407(19).
  118. Katselou M, Papoutsis I, Nikolaou P, Spiliopoulou C, Athanaselis S.  $\alpha$ -PVP (“flakka”): a new synthetic cathinone invades the drug arena. *Forensic Toxicol.* 2016;34(1):41–50.
  119. Lin LY, Di Stefano EW, Schmitz DA, Hsu L, Ellis SW, Lennard MS, et al. Oxidation

- of methamphetamine and methylenedioxyamphetamine by CYP2D6. *Drug Metab Dispos.* 1997;25(9):1059–64.
120. Cumba LR, Smith JP, Zuway KY, Sutcliffe OB, Do Carmo DR, Banks CE. Forensic electrochemistry: Simultaneous voltammetric detection of MDMA and its fatal counterpart “dr Death” (PMA). *Anal Methods.* 2016;8(1):142–52.
  121. Katayama JMT, Oiye EN, Ribeiro MFM, Ipólito AJ, De Andrade JF, De Oliveira MF. MDMA electrochemical determination in aqueous media containing illicit drugs and validation of a voltammetric methodology. *Drug Anal Res.* 2020;4(1):3–11.
  122. Teófilo KR, Arantes LC, Marinho PA, Macedo AA, Pimentel DM, Rocha DP, et al. Electrochemical detection of 3,4-methylenedioxyamphetamine (ecstasy) using a boron-doped diamond electrode with differential pulse voltammetry: Simple and fast screening method for application in forensic analysis. *Microchem J.* 2020;157(April):105088.
  123. Murilo Alves G, Soares Castro A, McCord BR, de Oliveira MF. MDMA Electrochemical Determination and Behavior at Carbon Screen-printed Electrodes: Cheap Tools for Forensic Applications. *Electroanalysis.* 2021;33(3):635–42.
  124. Smith JP, Metters JP, Khreit OIG, Sutcliffe OB, Banks CE. Forensic electrochemistry applied to the sensing of new psychoactive substances: Electroanalytical sensing of synthetic cathinones and analytical validation in the quantification of seized street samples. *Anal Chem.* 2014;86(19):9985–92.
  125. Elbardisy HM, García-Miranda Ferrari A, Foster CW, Sutcliffe OB, Brownson DAC, Belal TS, et al. Forensic Electrochemistry: The Electroanalytical Sensing of Mephedrone Metabolites. *ACS Omega.* 2019;4(1):1947–54.
  126. Lima CD, Couto RAS, Arantes LC, Marinho PA, Pimentel DM, Quinaz MB, et al. Electrochemical detection of the synthetic cathinone 3,4-methylenedioxypropylvalerone using carbon screen-printed electrodes: A fast, simple and sensitive screening method for forensic samples. *Electrochim Acta.* 2020;354:136728.
  127. Zhang D, Peng Y, Qi H, Gao Q, Zhang C. Application of multielectrode array modified with carbon nanotubes to simultaneous amperometric determination of dihydroxybenzene isomers. *Sensors Actuators, B Chem.* 2009;136(1):113–21.
  128. Figueroa-Miranda G, Chen S, Neis M, Zhou L, Zhang Y, Lo Y, et al. Multi-target electrochemical malaria aptasensor on flexible multielectrode arrays for detection in malaria parasite blood samples. *Sensors Actuators, B Chem.* 2021;349(September):130812.
  129. Scheel GL, de Oliveira FM, de Oliveira LLG, Medeiros RA, Nascentes CC, Tarley CRT. Feasibility study of ethylone determination in seized samples using boron-doped diamond electrode associated with solid phase extraction. *Sensors Actuators, B Chem.* 2018;259:1113–22.
  130. Tassaneeyakul W, Birkett DJ, McManus ME, Tassaneeyakul W, Veronese ME, Andersson T, et al. Caffeine metabolism by human hepatic cytochromes p450: Contributions of 1A2, 2E1 and 3A isoforms. *Biochem Pharmacol.* 1994;47(10):1767–76.
  131. Aranda J V., Beharry KD. Pharmacokinetics, pharmacodynamics and metabolism of caffeine in newborns. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2020;25(6):101183.
  132. Lajin B, Schweighofer N, Goessler W, Obermayer-Pietsch B. The determination of the Paraxanthine/Caffeine ratio as a metabolic biomarker for CYP1A2 activity in various human matrices by UHPLC-ESIMS/MS. *Talanta.* 2021;234(June):122658.

