

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**DESARROLLO DE SENSORES ELECTROQUÍMICOS PARA LA
DETERMINACIÓN DE DROGAS SINTÉTICAS EN FLUIDOS
BIOLÓGICOS Y MUESTRAS DE INCAUTACIÓN**

Tesis sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Doctorado en
Ciencias para optar al grado y título de Doctor Académico en Ciencias

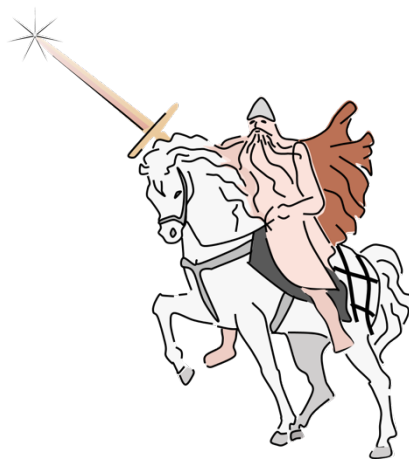
JERSON GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2023

Dedicatoria

*A la vida que amalgama sueños y locuras para que lo inasequible suceda.
A las manos que sostienen y abrazan para que los anhelos sean realidad.
A esos que de niños soñaron hasta el entusiasmo con lo que un día llegaron a ser.*



“Country roads, take me home to the place I belong”.

J. D. 1971

Agradecimientos

Agradezco, profusamente, a mi profesora guía, la Dra. Ana Lorena Alvarado Gámez por darme la oportunidad de ser su estudiante e inspirarme, con su devoción y con su carrera académica, a alcanzar mis objetivos.

Expreso mi sincero agradecimiento a la asesora de este proyecto, la Dra. Miriam Barquero Quirós por la prontitud de encender una luz y marcar con claridad el camino correcto.

Gracias al Dr. Roberto Urcuyo Solórzano, asesor de la tesis. Siempre tuvo la sutil serenidad para calmar mis dudas. Su confianza fue mía también.

Al Dr. Luis Arroyo Mora y a su grupo de investigación en el *Department of Forensic and Investigative Science, West Virginia University, USA*. Gracias por su valiosa colaboración, por su apoyo y por abrirme las puertas de su laboratorio para realizar la primera pasantía de investigación. Me sentí como en casa.

Al Dr. Colby Ott de *West Virginia University* por su compañía, su impecable trabajo y su dedicación a lo largo de todo el proceso de la segunda publicación científica.

A la Dra. María Julia Arcos Martínez de la Universidad de Burgos en España. Su caluroso recibimiento me hizo olvidar el frío de la hermosa ciudad. Gracias por darme la oportunidad de trabajar a su lado.

Al Dr. Álvaro Colina Santamaría y a su grupo de investigación en la Universidad de Burgos en España. Fue un privilegiado trabajar con “vosotros”.

Al B.Q. Guillermo Moya Alvarado por su contagioso carisma y su intachable trabajo colaborativo en la primera y en la tercera publicación científica. Me enorgullece ver su crecimiento profesional.

Al M.S.Ed. Nereo Bonomo por su generoso aporte al revisar la escritura de los manuscritos de las publicaciones científicas en el idioma inglés.

Al Centro de Investigación en Electroquímica y Energía Química (CELEQ) de la Universidad de Costa Rica (UCR) por brindarme las condiciones necesarias para realizar el trabajo de investigación, tanto en la UCR como en las dos pasantías.

A la Vicerrectoría de Investigación de la UCR por los tiempos asignados para desarrollar el trabajo de experimentación en el CELEQ.

Al Programa de Doctorado en Ciencias por el acompañamiento y apoyo recibido durante estos años.

Al Sistema de Estudios de Posgrado de la UCR. Gracias por el apoyo económico para realizar las pasantías de investigación.

Al *West Virginia University Shared Research Facility* por la caracterización estructural de los sustratos de oro para las mediciones de espectroscopia Raman.

Al Centro de Investigación en Estructuras Microscópicas de la UCR (CIEMic) por la facilidad para las mediciones SEM de los biosensores.

Al Centro de Investigaciones en Ciencia e Ingeniería de Materiales de la UCR (CICIMA) por la capacitación y la oportunidad para realizar caracterizaciones estructurales con espectroscopia Raman.

A la Sección de Química Analítica de la Escuela de Química de la UCR por su comprensión en la distribución del trabajo complementario a la investigación.

A la “pandilla” de Burgos, Fernando, Ramón, Raquel, Pepelu y todos los demás. Fueron los mejores anfitriones y amigos que puede tener un visitante.

A los deportes que me han rescatado tantas veces de mí mismo. Gracias infinitas por embriagarme de felicidad.

A mi familia y a mis amigos. Las palabras compartidas me recuerdan el inexorable paso del tiempo y la bondad de la vida que aún nos tiene juntos aquí.

A Jairo García Céspedes. Puedo escribir los agradecimientos más sinceros esta noche, pero se van tiñendo con tu amor mis pensamientos, una palabra entonces, una sonrisa bastan ¡Gracias, *ab imo pectore!*

“Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Doctorado en Ciencias de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Doctorado Académico en Ciencias”.




Dra. Alice Pérez Sánchez
**Representante de la Decana
Sistema de Estudios de Posgrado**



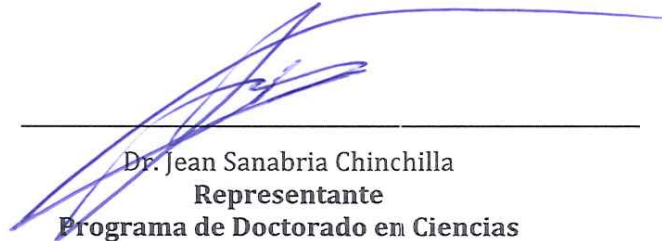
Dra. Ana Lorena Alvarado Gámez
Directora de tesis



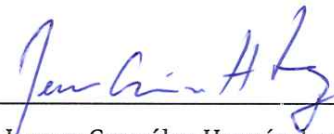
Dra. Miriam Barquero Quirós
Asesora



Dr. Roberto Urcuyo Solórzano
Asesor



Dr. Jean Sanabria Chinchilla
**Representante
Programa de Doctorado en Ciencias**



Jerson González Hernández
Sustentante

Índice general

Dedicatoria	ii
Agradecimientos	iii
Índice general.....	vi
Resumen	viii
Abstract.....	ix
Lista de figuras.....	x
Lista de abreviaturas	xii
Difusión de los resultados.....	xiv
1 Introducción general.....	1
2 Marco teórico.....	4
2.1 Sustancias psicoactivas.....	4
2.1.1 Clasificación de las sustancias psicoactivas.....	5
2.1.2 Nuevas sustancias psicoactivas (NSP).....	7
2.2 Mediciones electroquímicas	11
2.2.1 Instrumentación.....	11
2.2.2 Técnicas de electroanálisis.....	14
2.3 Voltamperometría.....	16
2.3.1 Termodinámica de los procesos electroquímicos.....	17
2.3.2 Cinética de los procesos electroquímicos	19
2.3.3 Forma de los voltamperogramas.....	24
2.4 Técnicas voltamperométricas.....	27
2.4.1 Barrido lineal de potencial.....	27
2.4.2 Barrido escalonado de potencial	30
2.4.3 Barrido sinusoidal de potencial.....	32
2.5 Sensores químicos.....	34
2.5.1 Clasificación de los sensores electroquímicos	36
2.5.2 Biosensores electroquímicos.....	39
2.5.3 Sensores espectroelectroquímicos.....	42
2.6 Uso de sensores electroquímicos para el análisis de NSP	45
3 Hipótesis.....	50

4	Objetivos.....	51
4.1	Objetivo general.....	51
4.2	Objetivos específicos.....	51
5	Sección experimental.....	52
6	Resultados y discusión	55
6.1	Apartado I: Sensores electroquímicos.....	56
6.1.1	<i>Resumen</i>	56
6.1.2	<i>Introducción</i>	57
6.1.3	<i>Publicación científica</i>	60
6.2	Apartado II: Sensor espectroelectroquímico.....	76
6.2.1	<i>Resumen</i>	76
6.2.2	<i>Introducción</i>	77
6.2.3	<i>Publicación científica</i>	80
6.3	Apartado III: Biosensor enzimático.....	96
6.3.1	<i>Resumen</i>	96
6.3.2	<i>Introducción</i>	97
6.3.3	<i>Publicación científica</i>	100
6.4	Discusión general	116
7	Conclusiones generales.....	121
8	Referencias	122

Resumen

La cantidad de nuevas sustancias psicoactivas, popularmente conocidas con términos como: drogas emergentes, drogas de diseño, drogas sintéticas o drogas recreativas, aumenta en el mercado global de las drogas cada año. El uso de nuevas tecnologías para la producción y la comercialización de las sustancias, aunado a una demanda exigente de nuevos efectos psicotrópicos más potentes, son algunos de los factores que contribuyen al incremento de una oferta más variada, así como a la cantidad de consumidores de algún tipo de psicoestimulante a nivel mundial.

A raíz del potencial demostrado de los sensores para el análisis de drogas, se desarrollaron cinco sensores electroquímicos de la siguiente manera: tres sensores basados en transductores de carbono, platino y diamante dopado con boro para la determinación de 25B-NBOMe, DMT, BZP y mCPP en fluido oral con límites de detección entre 0.15 $\mu\text{g/mL}$ y 1.8 $\mu\text{g/mL}$, un sensor espectroelectroquímico de Raman para el análisis selectivo de las catinonas 4-MMC y 4-MEC en orina y en muestras de incautación (límites de detección de 6.6 $\mu\text{g/mL}$ y 2.4 $\mu\text{g/mL}$ para cada molécula respectivamente) y un biosensor enzimático para la cuantificación de fentanilo en muestras de orina con un límite de detección de 0.086 $\mu\text{g/mL}$ y con porcentajes de recuperación entre el 92% y 100%.

El desarrollo de herramientas analíticas fiables y robustas, con la capacidad de respuesta *in situ* para una evaluación preliminar, contribuyen significativamente con la generación de información científica para la atención adecuada de diversas situaciones. Los sensores electroquímicos han ganado terreno en áreas como la toxicología y las ciencias forenses. Esencialmente, porque son dispositivos portátiles de fácil manipulación, altamente versátiles, con mínimos requerimientos en el tratamiento de la matriz y que necesitan cantidades muy pequeñas de muestra. Asimismo, las metodologías electroquímicas –en las que se basa la medición de los sensores– presentan excelentes parámetros de desempeño como bajos límites de detección, alta sensibilidad y muy buena precisión.

Abstract

The number of new psychoactive substances, known popularly by terms such as emerging drugs, designer drugs, synthetic drugs, or recreational drugs, increases in the global drug market every year. The use of new technologies for the production and marketing of substances, along with a rigorous demand for more powerful psychotropic effects, are some of the factors that contribute to the increase in a more varied supply, as well as the number of psychostimulant consumers.

Considering the potential of sensors for drug testing, five electrochemical sensors were developed as follows: three sensors based on boron-doped diamond, platinum and carbon transducers for the determination of 25B-NBOMe, DMT, BZP and mCPP in oral fluid with limits of detection in the range from 0.15 $\mu\text{g/mL}$ to 1.8 $\mu\text{g/mL}$, a Raman spectroelectrochemical sensor for the selective analysis of the cathinones 4-MMC and 4-MEC in urine and seizure samples (limit of detection of 6.6 $\mu\text{g/mL}$ and 2.4 $\mu\text{g/mL}$ for each molecule respectively), and an enzyme biosensor for the quantification of fentanyl in urine samples with a limit of detection of 0.086 $\mu\text{g/mL}$ and an accuracy of 92% and 100%.

The development of reliable and robust analytical tools, with the capacity to respond *in situ* for a preliminary determination, contributes significantly to the generation of scientific information for the adequate addressing of diverse situations. Electrochemical sensors have gained ground in areas such as toxicology and forensic science. Essentially, they are portable devices that are user-friendly and versatile, they require minimal matrix treatment and very small amounts of samples. Likewise, electrochemical methodologies –on which the measurement of the sensors is based– have excellent performance parameters such as low detection limits, high sensitivity, and very good accuracy.

Lista de figuras

Figura 1 Clasificación general de las sustancias psicoactivas de acuerdo con el sistema internacional de fiscalización de drogas vigente.....	6
Figura 2 Clasificación de las nuevas sustancias psicoactivas realizada por ONUDD con base en grupos de sustancias y en los efectos farmacológicos.	9
Figura 3 Cantidad de sustancias identificadas por cada grupo de NSP en el mercado global de las drogas entre los años 2009 y 2021.....	10
Figura 4 Diagrama general del circuito electrónico de un potencióstato.....	12
Figura 5 Clasificación general de los principales métodos electroanalíticos.....	16
Figura 6 Representación gráfica de la transferencia de electrones en reacciones tipo redox sobre electrodos.	17
Figura 7 Gradiente de difusión con respecto al incremento del tiempo y a la distancia desde el electrodo.....	20
Figura 8 Modelación de la doble capa eléctrica al aplicar una carga negativa sobre un electrodo.....	25
Figura 9 Perfiles comunes del comportamiento de los voltamperogramas.....	26
Figura 10 Voltamperometría de barrido lineal.....	28
Figura 11 Voltamperometría cíclica.	28
Figura 12 Voltamperometrías de barrido escalonado.....	31
Figura 13 Voltamperometría de barrido sinusoidal de potencial.....	33
Figura 14 Clasificación de los sensores químicos con base en el tipo de receptor y en el tipo de transductor.	35
Figura 15 Diseño básico de un biosensor con mediador para el flujo electrónico.....	41

Figura 16 Esquema que ilustra el proceso para desarrollar los tres sensores electroquímicos para el análisis de las drogas 25B-NBOMe, BZP, mCPP y DMT.....	52
Figura 17 Esquema que resume el proceso para desarrollar el sensor espectro-electroquímico para la determinación de las catinonas sintéticas 4-MMC y 4-MEC.	53
Figura 18 Esquema representativo del proceso para desarrollar un biosensor enzimático para la determinación cuantitativa de fentanilo.....	54
Figura 19 Estructuras químicas de la drogas 25B-NBOMe, BZP, mCPP y DMT.....	59
Figura 20 Estructuras químicas de las catinonas sintéticas 4-MMC y 4-MEC.	79
Figura 21 Estructura química del fentanilo y representación de la estructura proteica del citocromo <i>c</i>	99

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Significado
25B-NBOMe	Droga del tipo fenetilamina sustituida
4-MEC	4-metilecatinona
4-MMC	Mefedrona
ACV	Voltamperometría de Corriente Alterna Alternating Current Voltammetry
AFM	Microscopia de Fuerza Atómica Atomic Force Microscopy
BZP	Bencilpiperazina
CDC	Centros para el Control y Prevención de Enfermedades Centers for Disease Control and Prevention
CE	Contraelectrodo
CV	Voltamperometría cíclica Cyclic Voltammetry
Cyt <i>c</i>	Enzima citocromo <i>c</i>
DDB	Diamante dopado con boro
DEA	Administración de Control de Drogas de los EE. UU. United States Drug Enforcement Administration
DMT	Dimetilriptamina
DPV	Voltamperometría de Pulso Diferencial Differential Pulse Voltammetry
$E_{1/2}$	Potencial de media onda
ER	Electrodo de referencia
ET	Electrodo de trabajo
FYL	Fentanilo
GC-MS	Cromatografía de Gases Acoplado a Espectrometría de Masas Gas Chromatography-Mass Spectrometry
HOMO	Orbital Molecular Ocupado de Mayor Energía Highest Occupied Molecular Orbital
i_c	Corriente de la celda electroquímica
i_{CE}	Corriente del contraelectrodo
i_L	Corriente límite
i_p	Pico de máxima corriente

Abreviatura	Significado
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada International Union of Pure and Applied Chemistry
JIFE	Junta Internacional de Fiscalización de Estupefacientes
LC-MS	Cromatografía Líquida Acoplada a Espectrometría de Masas Liquid Chromatography-Mass Spectrometry
LOD	Límite de Detección Limit of Detection
LOQ	Límite de Cuantificación Limit of Quantification
LSV	Voltamperometría de Barrido Lineal Linear Sweep Voltammetry
LUMO	Orbital Molecular Desocupado de Menor Energía Lowest Unoccupied Molecular Orbital
mCPP	meta-clorofenilpiperazina
NPV	Voltamperometría de Pulso Normal Normal Pulse Voltammetry
NSP	Nueva Sustancia Psicoactiva
OEDT	El Observatorio Europeo de las Drogas y la Toxicomanía
ONG	Organización No Gubernamental
ONU	La Organización de las Naciones Unidas
ONUDD	Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito
OPS	Organización Panamericana de la Salud
SEC	Espectroelectroquímica Spectroelectrochemistry
SEC-SERS	Espectroelectroquímica de Raman SERS
SEM	Microscopia Electrónica de Barrido Scanning Electron Microscopy
SERS	Espectroscopia Raman de Superficie Mejorada Surface Enhanced Raman Spectroscopy
SPE	Electrodo serigrafado Screen Printed Electrode
SWV	Voltamperometría de Onda Cuadrada Square Wave Voltammetry
UV-Vis	Ultravioleta visible

Difusión de los resultados

Congresos y presentaciones

American Academy of Forensic Science (AAFA) Annual Scientific Meeting 2020

- Del 17 al 22 de febrero, Anaheim, California, USA.
- Presentación del póster: Electrochemical screening of novel psychoactive substances with a boron-doped diamond electrode and disposable screen-printed electrodes based on carbon and platinum.

Programa de Jornada de Investigación 2021 del Programa de Doctorado en Ciencias de la Universidad de Costa Rica (UCR)

- 10 de febrero, Universidad de Costa Rica, sede Rodrigo Facio (virtual).
- Exposición oral: Análisis de Nuevas Sustancias Psicoactivas (NSP) por Técnicas Electroquímicas.

I Encuentro de Investigadores de la Escuela de Química de la UCR 2021

- 17 de marzo, Universidad de Costa Rica, sede Rodrigo Facio (virtual).
- Exposición oral: Análisis de Nuevas Sustancias Psicoactivas (NSP) por Técnicas Electroquímicas.

3ª Escola de Ciências Forenses 2021

- Del 20 al 29 de octubre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil (virtual).
- Exposición oral: Determination of novel psychoactive substances by electrochemical sensors.

Ciclo de Charlas en Electroquímica Convenio de Cooperación Sur-Sur 2023

- 09 de marzo, Universidad de Costa Rica, Universidad Estatal a Distancia y Universidad de la República (Uruguay, virtual).
- Exposición oral: Sensores electroquímicos para la Determinación de Drogas Sintéticas.

Artículos científicos

I Publicación: *Electrochemical Determination of Novel Psychoactive Substances by Differential Pulse Voltammetry Using a Microcell for Boron-Doped Diamond Electrode and Screen-Printed Electrodes Based on Carbon and Platinum.* J. Electroanal. Chem. **2021**. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2021.114994>

II Publicación: *Rapid Determination of the 'Legal Highs' 4-MMC and 4-MEC by Spectroelectrochemistry: Simultaneous Cyclic Voltammetry and In situ Surface-Enhanced Raman Spectroscopy.* Sensors **2022**. <https://doi.org/10.3390/s22010295>

III Publicación: *Electrochemical Biosensor for Quantitative Determination of Fentanyl Based on Immobilized Cytochrome c on Multi - Walled Carbon Nanotubes Modified Screen - Printed Carbon Electrodes.* Microchim. Acta **2022**. <https://doi.org/10.1007/s00604-022-05578-x>

1 Introducción general

Los psicoestimulantes sintéticos son un grupo muy diverso de drogas no controladas definidas como nuevas sustancias psicoactivas (NSP). Según datos de entidades como la Organización de las Naciones Unidas (ONU) y el Observatorio Europeo de las Drogas y la Toxicomanía (OEDT), la cantidad de NSP disponibles en el mercado global de drogas aumenta con cada año. Es común para los distintos países detectar nuevas sustancias mucho más potentes que las drogas convencionales, entre ellas los opioides, los cannabinoides y las catinonas sintéticas; situación que plantea grandes retos para la gestión de la salud pública y para la sociedad [1,2].

Este incremento dinámico de NSP es favorecido, principalmente, por factores como: las nuevas tecnologías, el traslape entre mercados legales e ilegales y componentes socioeconómicos que permean las distintas formas de vida humana [3,4]. El estudio de la oferta y la demanda de psicoestimulantes en un mercado complejo y cambiante deja entrever una predisposición de consumo por las sustancias no controladas, cuyo estatus de no legalidad es ambiguo en muchos países. Estas drogas emergentes se comercializan como una alternativa para las drogas ilegales y se distribuyen a través de nuevos mecanismos que involucran, usualmente, plataformas digitales como las redes sociales [5,6].

Según los últimos informes anuales de la Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (ONUDD), algunos de los países más ricos del mundo —mayor producto interno bruto (PIB)— han logrado contener la rápida propagación de las NSP a través de diferentes acciones que involucran una severa legislación antidrogas. Empero, varias entidades y organizaciones no gubernamentales señalan en la aplicación de estas leyes constantes violaciones a los derechos humanos por parte de las autoridades gubernamentales, una consecuencia lamentable de la actual clasificación de las drogas hecha sin basarse en criterios científicos [7].

Desde otra perspectiva, se observa que los países más pobres con sistemas de control laxos presentan un crecimiento importante en el mercado de las NSP. La falta de recursos financieros, la capacidad limitada de los expertos en salud y una deficiente aplicación de la ley para identificar las NSP con el fin de prevenir un uso inadecuado, aunado a los problemas socioeconómicos que enfrentan estas regiones del planeta, dificultan un abordaje integral y sistematizado de la situación y de la amenaza que esto representa para la vida, la salud y la seguridad [1,8].

Las medidas sanitarias y las restricciones generales relacionadas con la aparición de la enfermedad del coronavirus (COVID-19) han tenido un impacto negativo en la economía global y en la vida social. Estos factores se relacionan con el aumento del consumo de sustancias psicoactivas y, consecuentemente, con el incremento de casos de sobredosis por el uso inadecuado de estupefacientes y psicotrópicos, hechos que han sido muy notorios en los países europeos y de América del Norte [1,8–11]. Los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC por sus siglas en inglés de *Centers for Disease Control and Prevention*) estiman que en el período de doce meses que finalizó en setiembre del 2022, más de cien mil personas murieron por sobredosis de drogas, entre las que resaltan los opioides sintéticos como el fentanilo y sus análogos [12].

A pesar del escaso conocimiento sobre la farmacología y la toxicología de algunas NSP que se consumen, ya sea de forma directa o a través de otros productos de venta –hierbas para aromatizar o sustancias comestibles– se han identificado unas NSP que generan una mayor adicción que las drogas ya conocidas de uso recreativo, como el cannabis. Estos resultados se deben a la rapidez con la que se genera tolerancia a sus efectos en el cuerpo humano por lo que podría ocasionar una elevada toxicidad inmediata o crónica [13].

En respuesta a los nuevos desafíos que plantea el mercado de NSP, es fundamental desarrollar nuevas herramientas tecnológicas para la identificación y la cuantificación de drogas emergentes de manera expedita sin reducir la calidad analítica. Con el fin de agilizar la entrega de resultados se ha propuesto la

implementación de varias técnicas alternativas para el análisis químico de drogas; *e. g.* los métodos electroquímicos como la potenciometría, la voltamperometría y la amperometría [14,15]. Estas técnicas electroquímicas se adaptan bien a las condiciones del laboratorio y a las condiciones de campo, en cuyo caso los resultados *in situ* son indispensables para la toma de decisiones por parte de las autoridades correspondientes [16].

Los sensores electroquímicos están diseñados a partir de electrodos de trabajo que pueden modificarse con una amplia variedad de materiales para mejorar la sensibilidad y, en algunos casos, la selectividad [17]. El uso de electrodos desechables en la configuración de los sensores, permite superar algunas limitaciones que surgen en los experimentos electroquímicos, tales como la pasivación del electrodo o el depósito de contaminantes insolubles en la superficie activa del electrodo cuando ocurren las reacciones químicas redox [18].

Algunas de las ventajas de los nuevos dispositivos de detección son el tamaño miniaturizado, el bajo costo de producción, así como la capacidad de monitorear en tiempo real. Estas propiedades han promovido aplicaciones potenciales para la comunidad científica en distintas áreas como la toxicológica y las ciencias forenses, en donde el análisis preliminar de NSP de manera confiable y veraz es fundamental para la atención pertinente y la resolución de casos en general.

2 Marco teórico

2.1 Sustancias psicoactivas

La Organización Panamericana de la Salud (OPS) define las sustancias psicoactivas como diversos compuestos naturales o sintéticos que actúan sobre el sistema nervioso central y que generan alteraciones en las funciones que regulan los pensamientos, las emociones y el comportamiento [19]. Una serie de características de estas sustancias, tanto intrínsecas como extrínsecas, le endosan una considerable atención en el marco sociocultural. Los usos de estos compuestos químicos pueden ser de carácter farmacológico, recreativo o general como sustancias con valor para la industria.

La OPS, además, advierte sobre el riesgo latente del uso de sustancias psicoactivas independientemente de la motivación o de la necesidad por la que se utilizan estos productos. Las consecuencias adversas podrían presentarse en el corto plazo, ya sean problemas de salud inmediatos provocados por una intoxicación o por propiciar situaciones que ponen en riesgo la integridad de la misma persona o de otros individuos, tales como accidentes, conductas violentas, acciones ilegales, prácticas sexuales inseguras, transmisión de enfermedades, entre otros. El uso prolongado de estas sustancias podría implicar problemas más severos que conllevan al desarrollo de trastornos por dependencia en detrimento de la salud y de las relaciones interpersonales [20].

Ciertamente, un impacto negativo en el consumo de psicoestimulantes, a corto o a largo plazo, depende de una interacción multifactorial que abarca aspectos propios del individuo, del tipo de consumo, del contexto social y de las sustancias químicas [19]. La combinación de algunos de los factores anteriores puede generar –en una determinada población– una situación problemática muy compleja de salud pública, la cual, hasta la fecha ha sido combatida, principalmente, por leyes nacionales e internacionales de control y fiscalización de estupefacientes, psicotrópicos, precursores y nuevas sustancias psicoactivas (NSP). En esencia, los

tratados de fiscalización internacional de drogas tienen como objetivo garantizar la disponibilidad adecuada de sustancias psicoactivas para fines médicos y científicos, asegurándose de que estas sustancias no sean desviadas para propósitos “ilícitos” [21].

Concretamente, estas acciones de control internacional han derivado en la prohibición absoluta del cultivo, producción, fabricación, exportación, importación, venta, posesión y consumo de sustancias psicoactivas, excepto cuando la finalidad es farmacológica o científica como se mencionó en el párrafo anterior. Esto ha dejado un registro de 302 sustancias fiscalizadas hasta diciembre de 2021 según el Informe Mundial de las Drogas 2022 de la ONUDD [22]. No obstante, entidades como la Comisión Global de Políticas de Drogas consideran que las políticas mundiales que exigen estas prohibiciones son represivas y causantes de los daños colaterales de la “guerra contra las drogas” [23].

Como repercusiones de estas decisiones poco flexibles, los organismos mencionados señalan: los problemas en la salud, el deterioro de la seguridad pública, el hacinamiento carcelario, la discriminación, el crecimiento del poder de las organizaciones delictivas, la violencia, la corrupción y la falta de acceso a medicamento esenciales. Este panorama deja entrever la necesidad de aplicar políticas sustentadas en evidencias científicas para la clasificación y el manejo de las sustancias psicoactivas de forma adecuada, ya que prácticas arbitrarias dotaron con el privilegio de legalidad a drogas como el alcohol y el tabaco a pesar de su innegable impacto negativo en la salud pública, los individuos, las familias y las sociedades [24–29].

2.1.1 Clasificación de las sustancias psicoactivas

Existen varias formas de clasificar los psicoestimulantes con base en su abordaje. Por ejemplo, se pueden agrupar por sus efectos farmacológicos en depresoras, estimulantes o alucinógenos; es posible clasificarlas por el origen en naturales, semisintéticas o sintéticas; se pueden separar por su condición de legalidad en legales, ilegales y no controladas; incluso se pueden diferenciar por sus propiedades fisicoquímicas o por su estructura molecular [30,31]. La forma más

común de clasificación de las sustancias psicoactivas es por medio de los tratados del sistema internacional de fiscalización de drogas impulsados por la ONU a través de la Junta Internacional de Fiscalización de Estupefacientes (JIFE), tal como se desglosa en la Figura 1 [32–34].

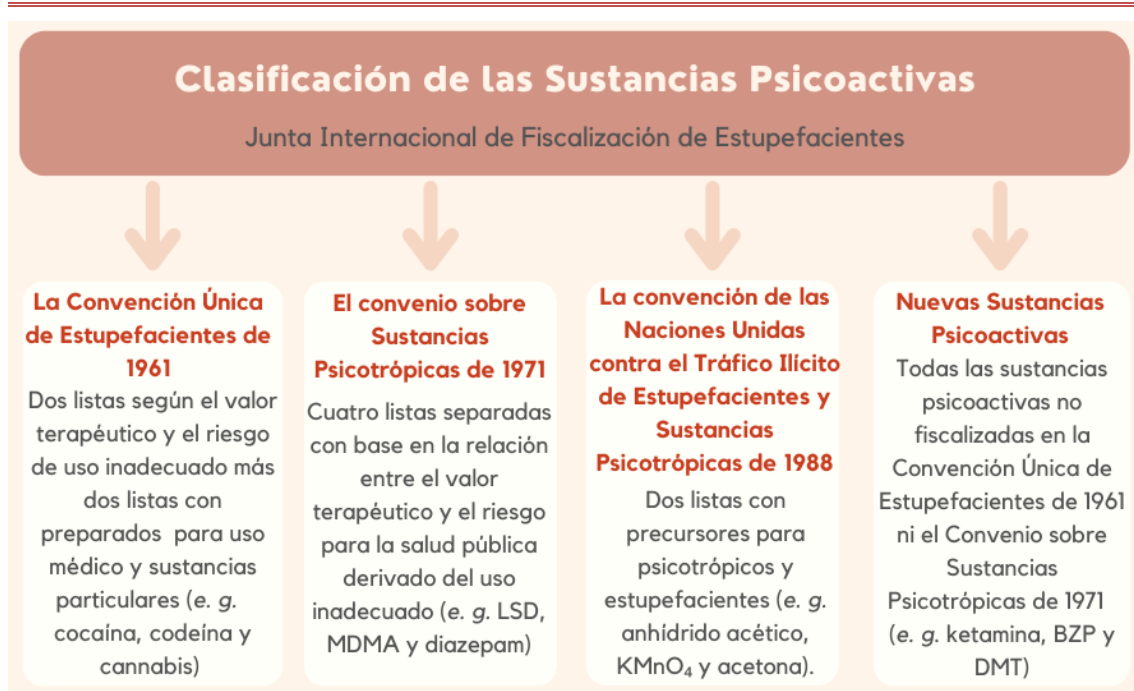


Figura 1 Clasificación general de las sustancias psicoactivas de acuerdo con el sistema internacional de fiscalización de drogas vigente.

La JIFE tiene el mandato de velar por el cumplimiento de los objetivos de los tratados internacionales. Sin embargo, esta misma entidad ha expresado en varias ocasiones su inquietud ante la desigualdad en diferentes partes del mundo para acceder a sustancias controladas con valor y uso terapéutico [21]. Otros organismos –como ciertas ONG– han denunciado un cumplimiento estricto y violento de las distintas leyes derivadas del régimen internacional de fiscalización de drogas, generando masivas violaciones a los derechos humanos, *e. g.* las políticas de cero tolerancia implementadas en algunos países han ocasionado la ejecución y la detención de miles de civiles en cortos periodos de tiempo [35].

Asimismo, la ONUDD en su Informe Mundial sobre Drogas 2022 estima que en el año 2020 unos 384 millones de personas con edades entre 15 y 64 años

consumieron alguna droga no legal en los últimos doce meses –una de cada dieciocho personas en ese rango de edad– para un aumento del 26% con respecto a la década anterior [36]. Ese mismo informe señala el impacto ambiental que genera la producción de las drogas ilícitas, el aumento en el consumo de drogas entre las mujeres y las personas jóvenes, así como el crecimiento continuo de la producción y el tráfico de drogas.

Lo expuesto anteriormente junto con el complejo dinamismo del mercado global de sustancias psicoactivas –novedosas tecnologías facilitan decenas de nuevas drogas sintéticas cada año– evidencian la incoherencia del obsoleto sistema actual de clasificación de drogas [37]. En consecuencia, la categoría de nuevas sustancias psicoactivas que se muestra en la Figura 1 supera por casi cuatro veces la cantidad total de sustancias controladas a nivel internacional, *i. e.* la mayoría de las NSP no son fiscalizadas en ningún sentido [38].

2.1.2 Nuevas sustancias psicoactivas (NSP)

El OEDT y la ONUDD han señalado por varios años la disponibilidad y la amplia diversidad en las pautas de consumo de los psicoestimulantes. Es evidente el aumento en la circulación sin precedentes de una serie de drogas distintas a los productos tradicionales controlados en los convenios de fiscalización internacional [39]. La forma típica de referirse a estas drogas es como nuevas sustancias psicoactivas (NSP), término que la ONUDD define como sustancias de abuso, ya sea en forma pura o en preparados, que no están controladas por la Convención Única sobre Estupefacientes de 1961 o por la Convención sobre Sustancias Psicotrópicas de 1971, pero que pueden representar una amenaza para la salud pública [40].

Los nombres con los que se conocen las NSP en el mercado varían considerablemente, tanto que puede resultar confuso para quienes las venden, las compran y las consumen, acertar con la identidad de la sustancia o la composición para el caso de mezclas y preparados [41]. Algunos de los términos más difundidos para los grupos de NSP son: '*synthetic drugs*' (drogas sintéticas), '*legal highs*' (euforizantes legales), '*bath salts*' (catinonas sintéticas), '*emerging drugs*' (drogas

emergentes), '*herbal incense*' (cannabinoides sintéticos), '*designer drugs*' (drogas de diseño), '*club drugs*' (drogas recreativas), '*research chemicals*' (drogas de varios grupos, *e. g.* análogos de la fenciclidina y cannabinoides sintéticos) y '*chemsex drugs*' (drogas sexuales). Si bien muchas de estas sustancias no ilegales son conocidas desde hace varias décadas; lo que resulta novedoso –como lo indica su nombre NSP– es el uso, la difusión a través de mercados virtuales y de redes sociales, así como la velocidad con la que se reformulan y rediseñan estas drogas [42–44].

Existen varios criterios para clasificar los NSP, tal como sucede con la clasificación general de las sustancias psicoactivas; por lo tanto, no hay una forma universal convenida para categorizar estas drogas. Así, es usual encontrar diferencias en las listas que brindan entidades como la ONUDD, el OEDT o la DEA (siglas en inglés de *U.S. Drug Enforcement Administration*) por mencionar algunas [39,40,45]. En la Figura 2 se muestra la clasificación más reciente hecha por la ONUDD en la que se incluyen once clases basadas en el grupo de sustancia y siete categorías basadas en los efectos farmacológicos.

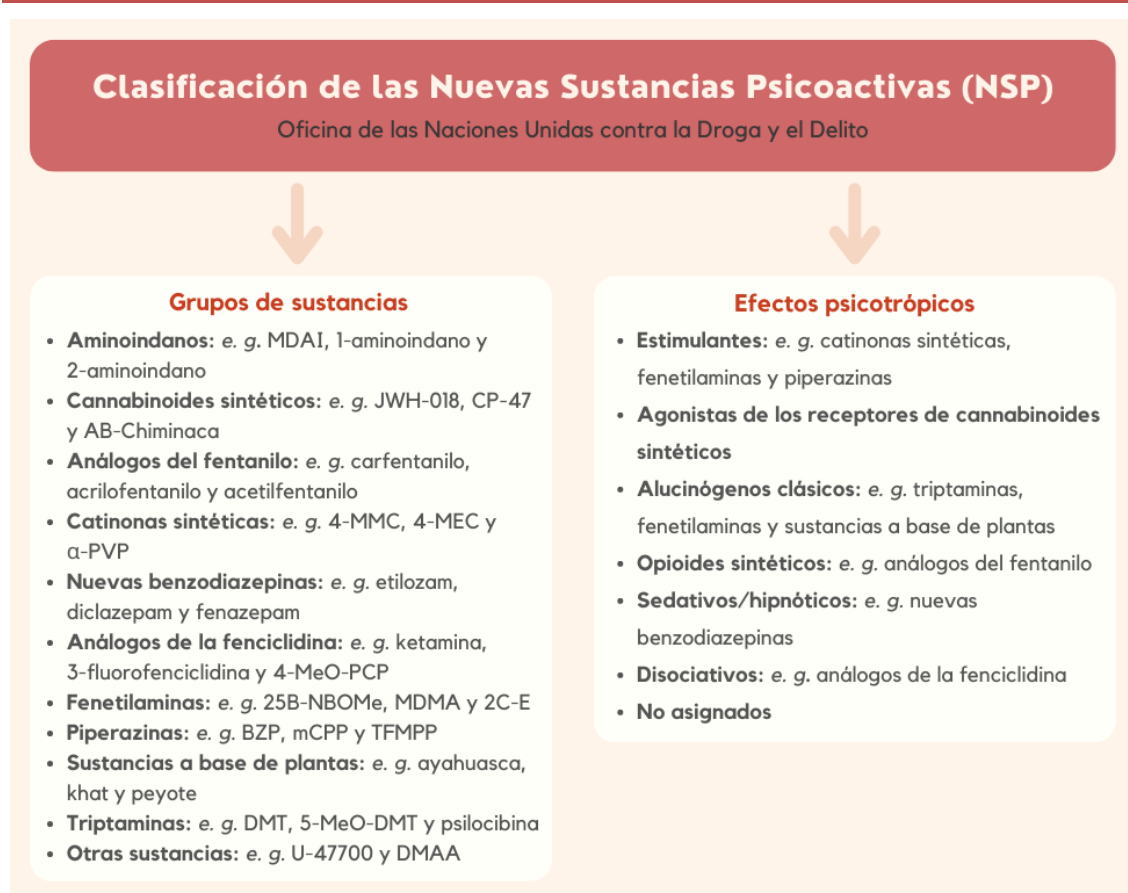


Figura 2 Clasificación de las nuevas sustancias psicoactivas realizada por ONUDD con base en grupos de sustancias y en los efectos farmacológicos.

Datos obtenidos del Sistema de Alerta Temprana sobre Nuevas Sustancias Psicoactivas de la ONUDD [38,40].

Entre los años 2009 y 2021 se ha contabilizado un total de 1127 tipos de NSP en el mercado global de drogas (ver Figura 3), mientras que la cantidad reportada por cada año parece estar estable alrededor de los 550 tipos de NSP, después de la expansión que sufrió entre el 2009 y el 2018. Solo en el año 2020, los estados miembros de la ONU identificaron 77 sustancias completamente nuevas de un total de 548 NSP, lo cual deja en evidencia que, así como hay nuevas sustancias que se integran al mercado mundial, otras NSP no se vuelven a ver en la oferta por diversos motivos como: baja rentabilidad o porque ofrecen efectos psicotrópicos similares a los de otras drogas contra las que no pueden adquirir una cuota del mercado de consumidores que les permitan afianzarse [38].

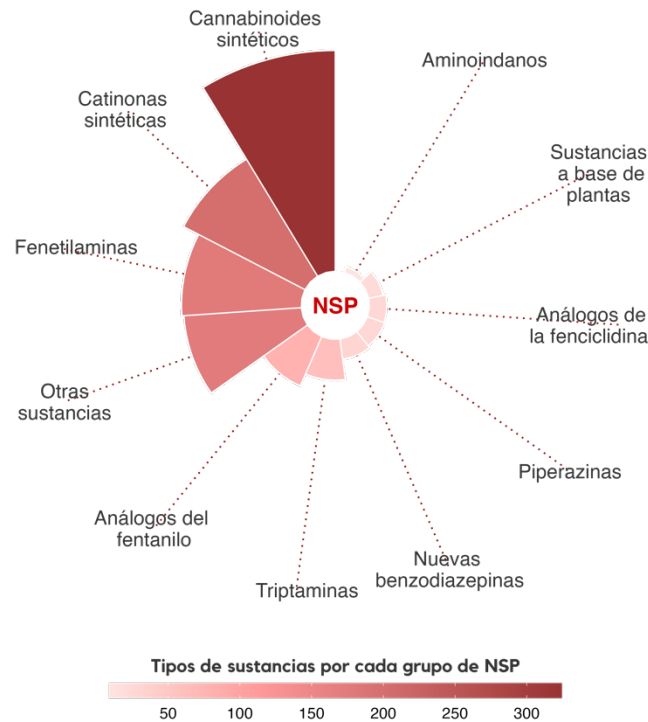


Figura 3 Cantidad de sustancias identificadas por cada grupo de NSP en el mercado global de las drogas entre los años 2009 y 2021.

Datos para el gráfico obtenidos del Informe Mundial sobre las Drogas 2022 de la ONUDD.

En el periodo del 2016 al 20220 la mayoría de las NSP identificadas a nivel mundial fueron estimulantes del tipo catinonas sintéticas y fenetilaminas, seguido de los cannabinoides sintéticos, a pesar de la disminución observada en la cantidad de incautaciones de estas sustancias desde el año 2015 [38].

Los últimos informes sobre drogas emitidos por la ONUDD y la OEDT posicionan al cannabis como la droga de mayor consumo a nivel mundial; empero, son enfáticos en la creciente producción de drogas sintéticas –principalmente opioides como los análogos del fentanilo– y del aumento en el consumo experimental y recreativo en todas las latitudes del planeta. De igual forma, estos organismos advierten de la gran cantidad de NSP en la categoría de otras sustancias aún no clasificadas, consecuente con la constante innovación en la producción de drogas, de las cuales la mayoría son NSP con efectos hipnóticos y sedantes como las nuevas benzodiazepinas [22,39].

2.2 Mediciones electroquímicas

La electroquímica se puede definir como el estudio de la transferencia de electrones en el siguiente tipo de reacciones químicas: $Ox + ne^- \rightleftharpoons Red$

Durante este proceso cada especie se oxida –pierde electrones– o se reduce –gana electrones– a un potencial específico para generar una corriente eléctrica proporcional a la concentración de sustancia [46]. Dicho movimiento de electrones puede ocurrir de manera homogénea en una disolución entre diferentes componentes químicos o de forma heterogénea sobre la superficie de electrodos [47].

En la actualidad, muchos de los estudios modernos electroquímicos de transferencia de electrones son realizados con un equipo analítico conocido como potencióstato, el cual es diseñado para controlar el potencial de un electrodo de trabajo en una celda electroquímica con múltiples electrodos. Se detallará la instrumentación electroquímica actual.

2.2.1 Instrumentación

En la mayoría de las aplicaciones potencióstáticas, la celda electroquímica está conformada por un sistema convencional de tres electrodos –indicador, referencia y auxiliar– sumergidos en una disolución electrolítica. El *electrodo indicador* o de trabajo (ET) está compuesto de un material inerte –por ejemplo, el oro, el platino y el carbón vítreo– en cuya superficie se llevan a cabo las reacciones químicas de interés que dan origen a la corriente eléctrica. El *electrodo de referencia* (ER) mantiene un potencial esencialmente constante bajo las condiciones que prevalecen en una medida electroquímica; los más comunes son el electrodo de Ag/AgCl y el electrodo saturado de calomel. La triada en la celda la completa un *contraelectrodo* (CE) conocido también como electrodo auxiliar, generalmente constituido de un material conductor inerte como el platino o el grafito, cuya función es transportar la corriente que circula por el circuito eléctrico de una celda electroquímica [48].

Un *potenciostato* se define como un instrumento que controla la diferencia de potencial entre el electrodo de trabajo y un electrodo de referencia a través de la aplicación de una corriente eléctrica que fluye del contraelectrodo hacia el electrodo de trabajo en una celda electroquímica tal como se observa en la figura a continuación [49,50].

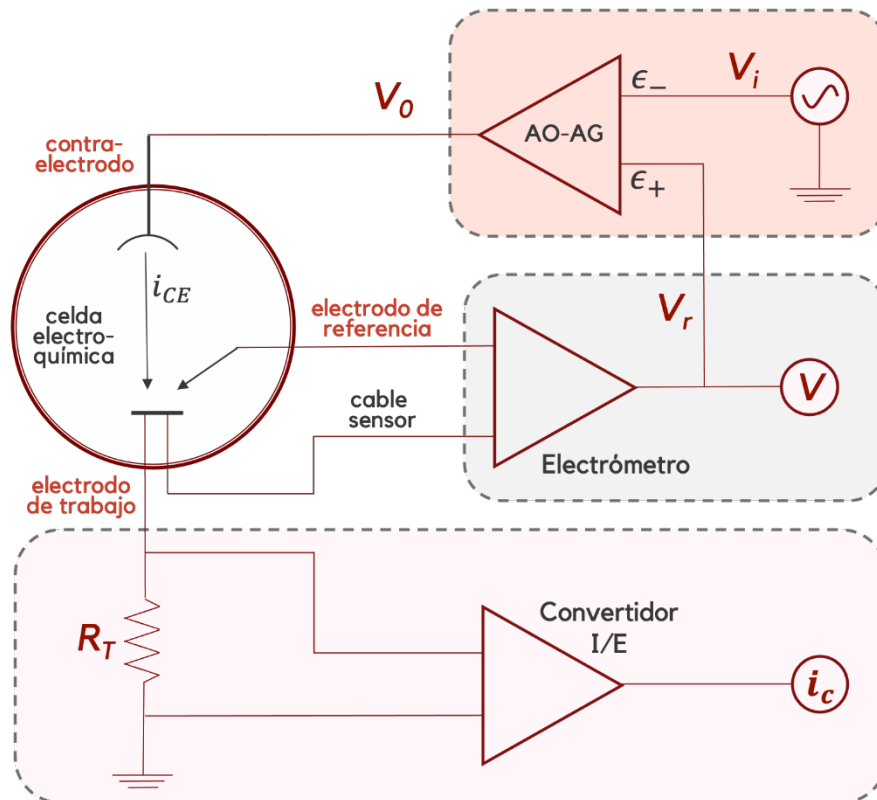


Figura 4 Diagrama general del circuito electrónico de un potenciostato.

Un potenciostato contiene varios circuitos internos para la generación y la medición de potenciales y corrientes. El funcionamiento básico de este instrumento se explica en el diagrama general de la Figura 4. El componente electrónico principal es un amplificador operacional de alta ganancia (AO-AG) capaz de amplificar un voltaje de entrada. La ganancia de lazo abierto del AO-AG es un factor escalar β bajo el principio de configuración de circuito de retroalimentación negativa, según lo define la siguiente ecuación [51,52]:

$$V_o = -\beta(\epsilon_- - \epsilon_+) = -\beta V_i \quad (1)$$

donde V_o es el voltaje de salida y V_i es el voltaje de entrada al amplificador operacional, calculado como la diferencia entre una entrada no inversora (ϵ_+) y una entrada inversora (ϵ_-). El amplificador operacional mantiene el voltaje de la celda –medido como la diferencia de potencial entre los electrodos de trabajo y de referencia– lo más cercano posible al voltaje de entrada de la fuente V_i . Para alcanzar esta igualdad, dicho dispositivo ajusta el voltaje de salida V_o que va hacia al contraelectrodo para intervenir automáticamente la corriente que circula en la celda (i_C). De esta manera, el potencióstato puede ajustar con precisión la señal de voltaje y alcanzar el valor consignado por el usuario correctamente [53].

La corriente emitida por el contraelectrodo a la celda electroquímica (i_{CE}) fluye tanto hacia el electrodo de trabajo como hacia el electrodo de referencia. A medida que esto ocurre, el potencial de la celda decae en un gradiente proporcional a la resistencia eléctrica de la disolución. Dado que el cable sensor del electrodo de trabajo empleado para medir su potencial y el electrodo de referencia están conectados a un amplificador operacional verdadero (electrómetro), cuyas entradas presentan una alta impedancia, la corriente no circula en esta parte del circuito –es decir, su valor es cercano a cero– sin embargo, este pequeño flujo de corriente altera el potencial del electrodo de trabajo (el potencial del electrodo de referencia se mantiene constante por su diseño). De modo que la impedancia impuesta por el electrómetro evita la circulación de la corriente de la celda a través de las terminales conectadas a este dispositivo, el único camino factible para que fluya la corriente de la celda electroquímica es a través del electrodo de trabajo.

El voltaje de salida del electrómetro, llamado voltaje de retroalimentación (V_r), es la diferencia de potencial entre el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia, el cual a su vez alimenta la entrada no inversora ϵ_+ del amplificador operacional de alta ganancia. La función del amplificador operacional tiene como objetivo igualar V_i con el valor de V_r , por lo tanto, este dispositivo aumentará o disminuirá la magnitud de V_o hasta que estos valores sean equivalentes [54]. Con base en el diagrama del circuito del potencióstato de la Figura 4, se puede deducir que ambas entradas (ϵ_- y ϵ_+) tendrán el mismo valor, es decir, existe un

cortocircuito virtual (una diferencia de potencial de cero voltios) así que en este punto se suman los voltajes de entrada V_i y de salida V_o gracias a un bucle de retroalimentación, lo cual simplifica el análisis del circuito y permite considerar que el electrodo de trabajo se encuentra referenciado a tierra virtualmente con respecto al electrodo de referencia (cero voltios) [55].

Por último, la corriente de medición en el electrodo de trabajo no se mide directamente, sino que su voltaje es forzado a pasar por una resistencia conocida (R_T), consecuentemente la caída de voltaje a través de esta resistencia es una medida de la corriente de la reacción por medio de la ley de Ohm como se aprecia en la siguiente ecuación:

$$i_c = \frac{V_r}{R_T} \quad (2)$$

En muchos de los potenciostatos modernos se incluye un convertidor de corriente a voltaje (I/E) en el circuito para medir corrientes que cambian en varios órdenes de magnitud. La forma de hacerlo es a través de la selección automática de la resistencia para un voltaje determinado. En términos muy generales se puede decir que el ajuste del potencial de la celda con la medición simultánea de la corriente que circula por el electrodo de trabajo, se considera el principio fundamental de las técnicas electroquímicas de voltamperometría [56].

2.2.2 Técnicas de electroanálisis

Los métodos electroquímicos se basan en las propiedades eléctricas de especies químicas en una disolución para determinar la concentración de uno o varios analitos bajo el principio de interacción de la energía eléctrica con la materia. Las variables eléctricas relacionadas de forma directa o indirecta con la concentración química que usualmente se miden en este tipo de ensayos son: potencial (E), corriente (I), resistencia (R) o impedancia (Z) y carga (Q). Otras variables que se pueden monitorear con el mismo propósito son el tiempo (t) y la masa electrogenerada (m). Estos procedimientos de análisis electroquímicos abarcan algunas de las técnicas instrumentales más exactas, específicas y sensibles del

mercado [57]. Además, de forma muy general, tienen la ventaja de que el tratamiento de muestra es muy simple y representan una inversión de menor costo instrumental para los laboratorios en comparación con otras técnicas de análisis [58].

La mayoría de los criterios para clasificar los métodos electroanalíticos se fundamentan en las propiedades del diseño experimental. La separación más simple se realiza con base en el sitio donde ocurre el proceso de medición. El primer grupo lo conforman los métodos iónicos, en los cuales se miden las propiedades electroquímicas en el seno de la disolución. El segundo grupo tiene un alcance mayor de aplicaciones y se compone de los métodos interfaciales o electródicos, cuya señal medida está en función de los fenómenos que ocurren en la interfase entre un electrodo –generalmente sólido– y la disolución [59,60].

En la Figura 5 se esquematiza la clasificación general más común de los métodos electroanalíticos [58]. En este apartado se describirán con detalle únicamente las técnicas de voltamperometría en disoluciones estacionarias (sin agitación).

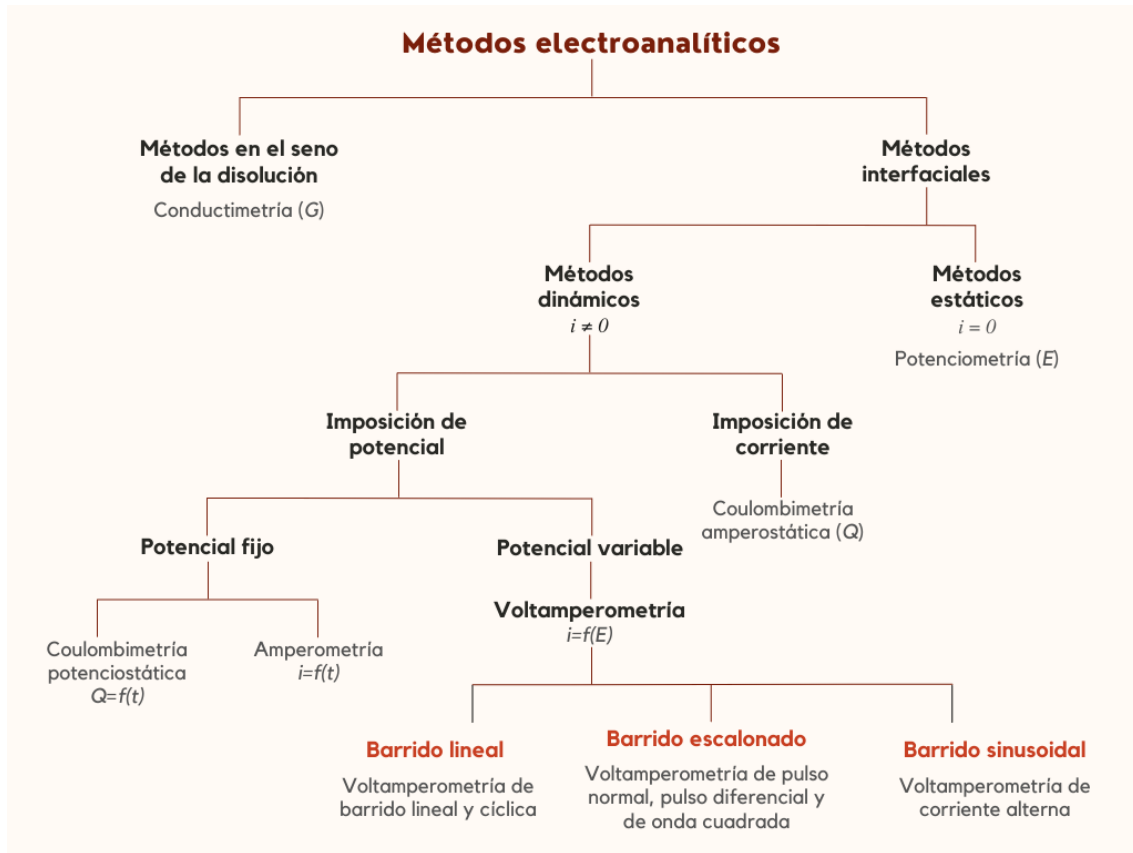


Figura 5 Clasificación general de los principales métodos electroanalíticos.

2.3 Voltamperometría

La técnica de voltamperometría es, en esencia, una diferencia de potencial dependiente del tiempo aplicada a una celda electroquímica cuya corriente resultante cambia en función del potencial aplicado. Al registro gráfico de la corriente versus el potencial se le llama voltamperograma y proporciona información tanto cualitativa como cuantitativa de las especies químicas que participan en el proceso de transferencia electrónica [57].

La modulación electródica externa que se requiere para llevar a cabo la reacción de transferencia de electrones, en principio es determinada por la magnitud energética del orbital molecular desocupado de menor energía o del orbital molecular ocupado de mayor energía, LUMO y HOMO respectivamente (del inglés *Lowest Unoccupied Molecular Orbital* y *Highest Occupied Molecular Orbital*),

tal como se aprecia en la Figura 6. Si el potencial de la celda electroquímica alcanza el valor correspondiente para que la especie electroactiva se oxide o se reduzca, comenzará a fluir una corriente eléctrica en el electrodo de trabajo que se le denomina *corriente farádica*. La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC del inglés de *International Union of Pure and Applied Chemistry*) define la *corriente anódica* como la corriente parcial provocada por la transferencia de carga desde una especie en disolución hacia la superficie del electrodo –oxidación– y la *corriente catódica* como la corriente parcial debida al flujo de carga del electrodo hacia la especie en la disolución –reducción– [61].

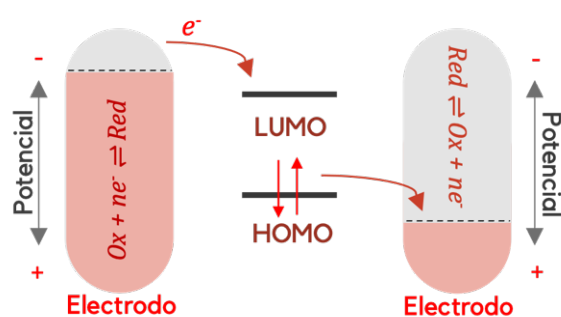


Figura 6 Representación gráfica de la transferencia de electrones en reacciones tipo redox sobre electrodos.

La voltamperometría como técnica de análisis químico sufrió un periodo de desuso después de su invención y desarrollo. Las principales razones para ello fueron las dificultades en el diseño de las celdas electroquímicas y el auge de otras técnicas de análisis como la espectrometría. No obstante, la electroquímica instrumental ha experimentado un resurgimiento en las últimas décadas impulsado por la implementación de diferentes modificaciones en función de los avances tecnológicos que han convertido a la técnica en una herramienta más versátil y más sensible desde el punto de vista analítico [62].

2.3.1 Termodinámica de los procesos electroquímicos

Para comprender como afecta el potencial eléctrico al flujo de la corriente farádica se puede hacer, en primera instancia, un abordaje termodinámico. Desde este punto de vista, el trabajo eléctrico máximo que se puede obtener en una celda

electroquímica a temperatura y presión constantes corresponde a la diferencia de la energía libre de Gibbs (ΔG) de la reacción electroquímica, la cual se expresa de la siguiente forma:

$$\Delta G = R T \ln Q - R T \ln K \quad (3)$$

En la ecuación anterior R corresponde a la constante universal de los gases ideales (8.314 J/(K mol)), T es la temperatura absoluta (K), Q es el cociente de la reacción química y K es la constante de equilibrio.

Por otro lado, el potencial de la celda está relacionado con el trabajo máximo a través de la carga eléctrica (q) y el potencial de la celda (E_c) como se muestra en la siguiente ecuación:

$$E_c = -\frac{\Delta G}{q} \quad \text{o} \quad \Delta G = -n F E_c \quad (4)$$

En la expresión anterior n corresponde a la cantidad de moles transferidos en la reacción y F es la constante de Faraday (96485 C/mol). Acá se corrobora que la espontaneidad de una reacción química ($\Delta G < 0$) se presenta cuando el potencial de la celda es positivo. Si la reacción química sucede en una condición estándar controlada, la ecuación anterior se describe como:

$$\Delta G^\circ = -n F E_c^\circ \quad (5)$$

De esta manera, se puede relacionar el potencial estándar de la celda (E_c°) con la constante de equilibrio de la reacción química (K) como se ve a continuación:

$$\Delta G^\circ = -R T \ln K \quad (6)$$

Por lo tanto, el término ΔG° puede ser sustituido por el término de la ecuación (5) para obtener la ecuación siguiente:

$$n F E_c^\circ = R T \ln K \quad (7)$$

Si se reemplazan en la ecuación (3) los términos derivados en las ecuaciones (4) y (7), el resultado es lo que se conoce como la ecuación de Nernst –en honor al electroquímico formulador Walther Nernst (1864-1941)– mostrada a continuación:

$$E_c = E_c^\circ - \frac{R T}{n F} \ln Q \quad (8)$$

Aunque desde el punto de vista termodinámico, el potencial de la celda (la diferencia de potencial entre los electrodos de trabajo y de referencia) determina si hay o no un flujo de corriente farádica, la magnitud de dicha corriente depende de la cinética de la reacción química [63], por lo que se estudiará este aspecto en el apartado siguiente.

2.3.2 Cinética de los procesos electroquímicos

Puesto que la voltamperometría es un método que se aplica en la zona interfacial entre un electrodo y la disolución, las reacciones químicas que ocurren en el electrodo de trabajo son afectadas principalmente por dos factores: el transporte de las especies reaccionantes hacia el electrodo –*transferencia de masa*– y la transferencia electrónica en la superficie del electrodo –*transferencia de carga*–. La velocidad total de la reacción es dependiente de la cinética de estos dos procesos y, en menor medida, por factores como la remoción de las sustancias producidas y la adsorción [64].

Transferencia de masa. El transporte de la sustancia electroactiva desde el seno de la disolución hacia la superficie del electrodo se puede describir por tres mecanismos básicos: migración, convección y difusión. La *migración eléctrica* es el movimiento de una partícula cargada –movimiento de repulsión o de atracción de acuerdo con la polaridad del electrodo– debido a la acción de un campo eléctrico o, en su defecto, de un gradiente de potencial eléctrico, cuyo fenómeno es el responsable de la conducción eléctrica a través de la disolución. La *convección*, tal como se aplica a la electroquímica, es el movimiento forzado de las especies en la disolución por medios mecánicos tales como la agitación, la rotación del electrodo y las celdas de flujo para transportar los reactivos hacia la superficie del electrodo y, a su vez, remover los productos de la reacción química. La *difusión* ocurre cuando se presenta un gradiente de concentración entre la superficie del electrodo y el resto de la disolución. Los iones o moléculas se difunden desde la región de mayor

concentración hacia la más diluida generando una capa de difusión (δ), tal y como se observa en la Figura 7.

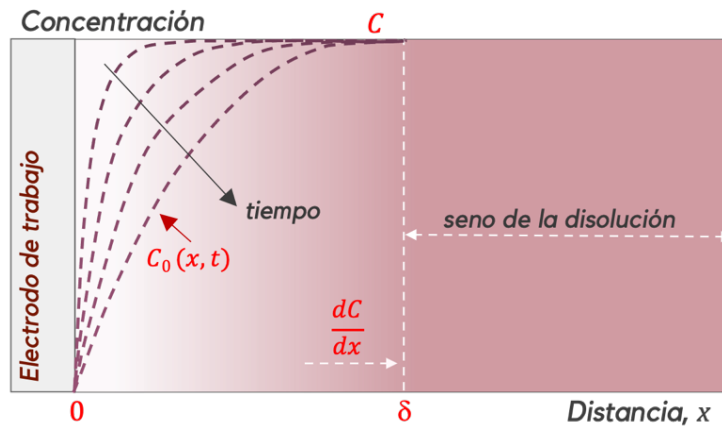


Figura 7 Gradiente de difusión con respecto al incremento del tiempo y a la distancia desde el electrodo.

A un tiempo inicial de cero, justo antes de la aplicación del voltaje, la concentración en la interfase electródica C_0 es igual a la concentración en el seno de la disolución. Cuanto mayor sea el tiempo de aplicación del potencial, mayor será la distancia desde la superficie del electrodo (δ) a la cual comienza la difusión. El término dC/dx representa el gradiente de concentración con respecto a la distancia x .

Cuando la velocidad de transporte de las especies electroactivas hacia la zona de la interfase es insuficiente, se experimenta una disminución en la caída IR , la cual es compensada con la aparición de un sobrepotencial de difusión. A este fenómeno se le conoce como *polarización por concentración*, esto generalmente aumenta el potencial necesario para mantener la corriente en una celda electroquímica, la cual estará limitada, en este caso, por la transferencia de masa –si se supone una cinética electródica infinitamente rápida– [63,65].

Con base en las condiciones encontradas en la mayoría de los ensayos electroquímicos, la difusión suele ser el transporte de masa que desempeña un papel significativamente más importante que los demás. Por este motivo, hay una base matemática más desarrollada que en los otros casos que explica sus efectos. De acuerdo con las leyes de Fick, se establece que el flujo por unidad de área es

proporcional al gradiente de la concentración y tiende a decrecer conforme se acerca a la superficie del electrodo, tal como se muestra en la siguiente ecuación:

$$\text{Flujo por unidad de área} = -\frac{1}{A} \times \frac{dN}{dt} = -D \left(\frac{dC}{dx} \right) \quad (9)$$

en donde A es el área del electrodo, dN/dt representa el número de moles que reaccionan en el electrodo por unidad de tiempo, D corresponde al coeficiente de difusión y dC/dx es el gradiente de concentración a una distancia x desde electrodo. Así, la velocidad neta de difusión hacia una unidad de área superficial en el electrodo, a un determinado tiempo t , es proporcional al gradiente de la concentración producido por las reacciones químicas en la superficie electródica. Por lo tanto, la ecuación matemática (9) se puede expresar de la siguiente forma:

$$\text{Flujo} = -D \left(\frac{dC}{dx} \right)_{x=0} = \frac{D(C - C_o)}{\delta} \quad (10)$$

En la expresión anterior, C es la concentración en el seno de la disolución, C_o es la concentración en la superficie del electrodo y δ es el grosor hipotético de la capa de difusión.

La velocidad de descarga de los iones se puede expresar como i/nF , un término correspondiente a la cantidad de electricidad transportada por equivalente de la especie electroactiva en la disolución. Si se considera que dN/dt es el número de moles reaccionantes por unidad de tiempo, se tiene la siguiente igualdad matemática:

$$\frac{i}{nF} = \frac{dN}{dt} \quad (11)$$

Aunque la transferencia de masa desde la disolución hacia el electrodo y viceversa se compone de los tres fenómenos de transporte mencionados, en el momento en que la difusión sea el mecanismo de transporte más significativo, la corriente se puede expresar en términos electroquímicos a partir de la combinación de las ecuaciones (9), (10) y (11) para generar la expresión siguiente:

$$i = \frac{n F A D (C - C_o)}{\delta} \quad (12)$$

Conviene, para la simplificación del cálculo matemático, según se comentó, limitar el transporte de masa a uno solo de los modos existentes. Tanto la migración como la convección pueden ser mitigadas gracias al diseño experimental de la medición. La consideración de un soporte electrolítico inerte en altas concentraciones evita que los productos y los reactivos de la reacción electroquímica experimenten migración debido a las cargas electrostáticas. Si bien es cierto que cada vez más los experimentos voltamperométricos se llevan a cabo en un volumen de una gota (microcantidades) por el diseño de los nuevos electrodos sólidos, hay que tener en cuenta que no siempre se puede o se debe eliminar la agitación (convección) de los ensayos y que, por el contrario, puede ser de interés realizar el estudio en una disolución agitada [66].

Para un transporte de masa gobernado por la difusión, la ecuación de Cottrell establece que cuando se alcanza el equilibrio en un electrodo plano en contacto con una disolución, la velocidad de descarga de los iones es igual a la velocidad de difusión de la especie electroactiva. Dicha ecuación se muestra a continuación y también puede derivarse para electrodos con geometría esférica, cilíndrica y rectangular [56]:

$$i_L = n F A C \sqrt{\frac{D}{\pi t}} \quad (13)$$

en donde i_L representa la corriente límite que se explica en la sección 2.3.3. El principal aporte de la deducción de la ecuación (13) es que demuestra que la corriente farádica es directamente proporcional a la concentración de la especie reactiva electroquímicamente. El motivo de llegar a esta expresión matemática radica en que esta proporcionalidad es la base sobre la cual se desarrollan las técnicas voltamperométricas cuantitativas, tan ampliamente extendidas en muchas aplicaciones y campos de la ciencia [58].

Transferencias de carga. La magnitud de la corriente farádica es también afectada por la velocidad a la que se transfieren los electrones en los procesos electroquímicos. Las reacciones electroquímicas que se estudian en los métodos de interfase son reacciones heterogéneas en las que se da un intercambio de electrones entre la especie electroactiva y dicho electrodo. La tasa de transferencia de carga es dependiente del potencial eléctrico así como de la estructura de la doble capa (ver la sección 2.3.3), de las reacciones químicas secundarias y de los fenómenos de adsorción y desorción [67].

Si la velocidad de la transferencia electrónica es lo suficientemente rápida, las concentraciones de los reactivos y de los productos en la zona de la interfase se pueden considerar cercanas a los valores en el equilibrio termodinámico —suponiendo que no hay limitaciones en la transferencia de masa—. En estos términos, la reacción electroquímica se puede considerar que está en un estado aparente como *reversible* y cuyo comportamiento puede ser estudiado mediante la ecuación de Nernst, ecuación (8).

No obstante, si la cinética electroquímica es lenta al punto de requerir un potencial adicional para sobrepasar la barrera energética de activación, la reacción en el sentido opuesto tiende a inhibirse por la aplicación de un sobrevoltaje. En vista de que la condición del estado del equilibrio químico se ve alterado por la velocidad de transferencia de carga, las reacciones voltamperométricas son electroquímicamente *irreversibles*, tal como sucede con la mayoría de las reacciones electroquímicas de compuestos orgánicos. A este fenómeno se le conoce como *polarización cinética*, en la cual la corriente está controlada por la velocidad a la que se transfieren los electrones entre el electrodo y la especie electroactiva [65].

En el sentido práctico, las reacciones electroquímicas no siempre se ajustan a uno de los casos de reversibilidad explicados anteriormente, sobre todo porque la cinética de las reacciones es compleja —i. e. hay muchas variables implicadas e incluso hay interacción de variables no contempladas en los modelos matemáticos— lo que significa que no existe una reacción reversible como se entiende en el concepto de idealidad. Los casos en los que la corriente neta es afectada por

componentes de la transferencia de carga en ambos sentidos de la reacción se les denomina *cuasirreversibles* y se comportan como un sistema híbrido de las reacciones reversibles e irreversibles [68].

2.3.3 Forma de los voltamperogramas

Se conoce como *corriente de difusión límite* (i_L) a la corriente que fluye en una celda electroquímica cuando la etapa cinéticamente determinante del proceso es la transferencia de masa, *i. e.* la rapidez con la que difunden las sustancias desde el seno de la disolución hacia la superficie del electrodo. En consecuencia, un aumento adicional del potencial no dará por resultado un aumento del flujo de electrones. La corriente tiene en sí dos componentes principales: la *corriente farádica* –la corriente del proceso redox de interés explicada previamente– y la *corriente residual*, la cual es independiente del analito electroactivo [69].

La corriente residual se compone de dos fuentes. La primera son las reacciones electroquímicas de las impurezas vestigiales que están de manera inevitable en la disolución, tales como el oxígeno disuelto, las trazas de metales en el agua o las impurezas en la sal del electrolito. La segunda fuente es la corriente de carga o corriente capacitiva que procede de la polarización superficial del electrodo al modificar el potencial. En este sentido, los iones de carga opuesta migran desde el seno de la disolución por el efecto del campo eléctrico en la interfase, por lo tanto, se crea un flujo de corriente sin que tenga lugar un proceso de oxidorreducción, tal y como se aprecia en la Figura 8. Al unir de forma imaginaria los centros de las especies adsorbidas sobre la superficie del electrodo (plano interno de Helmholtz, PIH) con los centros de la primera fila de los iones solvatados de carga opuesta a la polarización del electrodo (plano externo de Helmholtz, PEH) se forma una capa que se le conoce como capa rígida o capa Stern. La zona que comprende la capa rígida y la subsiguiente capa de difusión es lo que se conoce como la *doble capa eléctrica* que ocasiona la acumulación de carga [70,71].

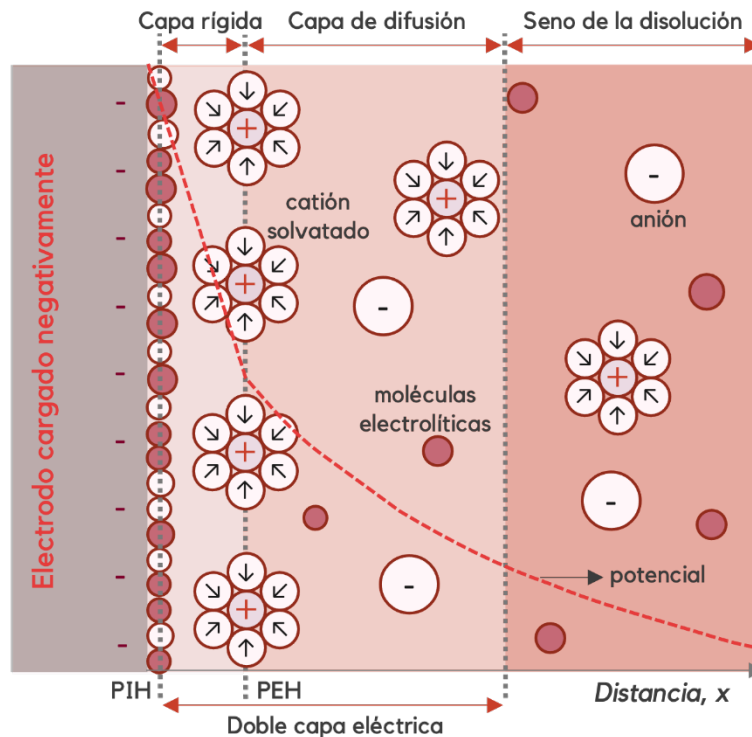


Figura 8 Modelación de la doble capa eléctrica al aplicar una carga negativa sobre un electrodo.

La corriente capacitiva carga y descarga la capacitancia de la doble capa eléctrica. El potencial disminuye linealmente con la distancia en la capa rígida y logarítmicamente a través del resto de la disolución. PIH = plano interno de Helmholtz y PEH = plano externo de Helmholtz.

El perfil de un voltamperograma se determina, básicamente, por la forma en la que se mide la corriente y por el mecanismo de transferencia de masa predominante, ya sea difusión o convección. A pesar de la variedad de técnicas voltamperométricas solo hay tres formas comunes para los voltamperogramas. Si se aplica un mecanismo de convección, la corriente aumenta desde una corriente residual de fondo hasta una corriente límite en forma de S como se ilustra en la Figura 9a. Como la corriente farádica es inversamente proporcional a la capa de difusión (δ), la corriente límite se mantiene constante una vez que se establece debido a que la capa de difusión permanece pequeña e invariable. Esto quiere decir que las sustancias electroactivas se aproximan continuamente a la superficie del

electrodo por agitación mecánica y a su vez se remueven los productos de la reacción de la superficie electródica.

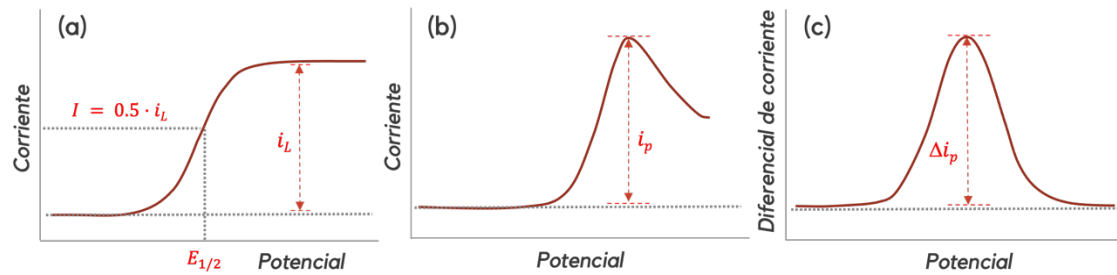


Figura 9 Perfiles comunes del comportamiento de los voltamperogramas.

(a) Corriente límite en condiciones invariables de la capa de difusión. (b) Pico de máxima corriente si la capa de difusión aumenta. (c) Pico de diferencial de corriente con imposición del potencial en forma de pulsos.

En ausencia de convección, la capa de difusión se extiende más en la disolución al paso del tiempo, esto provoca que la corriente límite disminuya en forma exponencial y se registre un voltamperograma con una corriente máxima (i_p) o pico de corriente (Figura 9b). Esta es la razón principal de que el barrido de potencial sea bastante rápido cuando se trabaja con microelectrodos estacionarios (alrededor de los 50 mV/s).

Aunada a las mediciones de corriente en función del potencial aplicado, se presenta otra manera de adquirir los datos de respuesta a través del cambio en la corriente (Δi) luego de un imponer un potencial en forma de pulso como se observa en (Figura 9c), el voltamperograma resultante también muestra una corriente máxima. La medición de la onda de perturbación entre la corriente residual y la corriente límite, que es proporcional a la concentración del analito, hace posible la cuantificación por voltamperometría de potencial variable. En adición, un voltamperograma también es una herramienta cualitativa que permite identificar las especies electroactivas a través del potencial en el que la corriente es la mitad de la corriente límite (potencial de media onda, $E_{1/2}$) en virtud de que este potencial en particular es independiente de la concentración de la especie química [57].

2.4 Técnicas voltamperométricas

Muchas de las variaciones en la configuración de la técnica de voltamperometría están dirigidas a mejorar la sensibilidad a partir de la discriminación entre la corriente farádica del proceso óxido reductivo y la corriente residual. Las modificaciones principales son adaptaciones modernas del método clásico de polarografía. Los parámetros experimentales en los que se fundamentan los principales cambios son: la forma en la que se aplica el potencial de excitación, el momento en el que se mide la corriente y la aplicación de agitación en la celda.

La clasificación de las técnicas en los párrafos venideros se basa en la manera que es aplicado el programa de barrido de potencial e , implícitamente, el tiempo en el que se mide la corriente. Se diferencian los siguientes tres grupos: las técnicas basadas en el barrido lineal de potencial, las técnicas de barrido escalonado y las técnicas de barrido sinusoidal de corriente alterna.

2.4.1 Barrido lineal de potencial

Voltamperometría de barrido lineal (LSV del inglés *Linear Sweep Voltammetry*). Esta técnica corresponde al método clásico y más simple de voltamperometría, en el cual se impone una rampa lineal de potencial en función del tiempo como señal de excitación y se registra continuamente la corriente que fluye en respuesta al cambio de potencial, tal como se muestra en la Figura 10. El voltamperograma típico de estos ensayos electroquímicos expone una corriente máxima o pico de corriente i_p producido por el aumento de la capa difusiva en ausencia de agitación. Entre las variables experimentales que se pueden controlar se encuentran el potencial inicial, el potencial final y la velocidad de barrido [72].

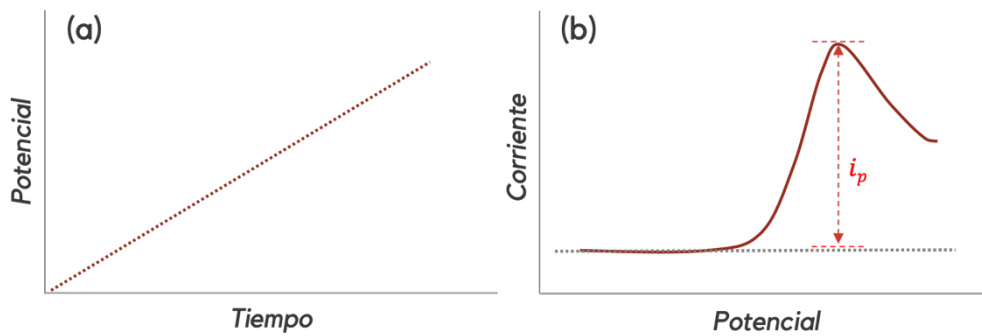


Figura 10 Voltamperometría de barrido lineal.

(a) Imposición de voltaje de forma lineal en el tiempo. (b) Perfil del voltamperograma en condición de medición estacionaria.

Voltamperometría cíclica (CV del inglés *Cyclic Voltammetry*). Si en la imposición de potencial en forma de barrido lineal en el tiempo se invierte la dirección de la aplicación del potencial y se repite por uno o varios ciclos adicionales, da como resultado una *voltamperometría cíclica* (Figura 11). Aunque es cierto que esta herramienta analítica no se emplea usualmente para cuantificar, es muy útil para estudiar los procesos electroquímicos [73].

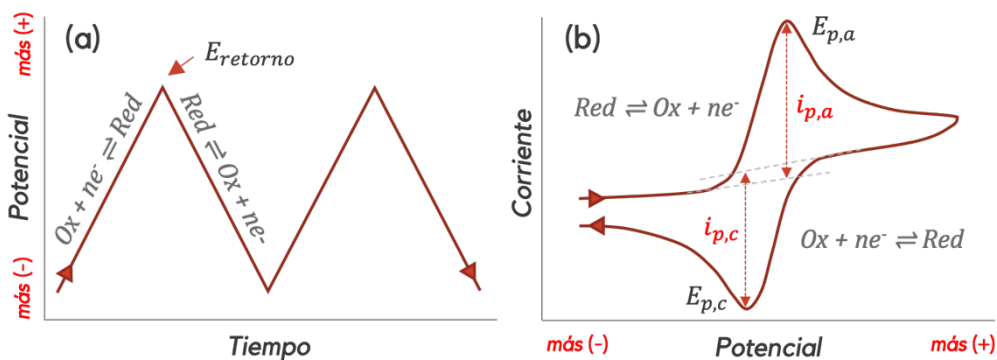


Figura 11 Voltamperometría cíclica.

(a) Representación de la imposición lineal del voltaje para dos ciclos. (b) Perfil del voltamperograma de una reacción electroquímica reversible.

La voltamperometría cíclica se lleva a cabo en una disolución sin agitación, lo que da como resultado una corriente máxima en lugar de una corriente límite. Si el proceso es reversible, se observa tanto un pico de corriente para la oxidación como

otro pico para la reducción (Figura 11b), cuyas magnitudes están definidas a 25 °C por la ecuación de Randles–Ševčík:

$$i_p = (2.69 \times 10^5) C A n^{3/2} D^{1/2} v^{1/2} \quad (14)$$

en donde v corresponde a la velocidad de barrido del potencial. Por lo tanto, se observa una dependencia de la corriente con respecto a la velocidad de aplicación del diferencial del voltaje [74]. La separación entre ambos picos de potencial (ΔE_p) es independiente de la velocidad de barrido y está dada por:

$$\Delta E_p = E_{p,a} - E_{p,c} = \frac{0.059}{n} \quad (15)$$

En la ecuación anterior, $E_{p,a}$ es el potencial de pico anódico y $E_{p,c}$ corresponde al potencial de pico catódico. Por consiguiente, el potencial de media onda, $E_{1/2}$, se ubica entre ambos potenciales de pico como se define a continuación:

$$E_{1/2} = \frac{E_{p,a} + E_{p,c}}{2} \quad (16)$$

Si el sistema es irreversible –cinética lenta de transferencia de carga– de manera que no se satisface la ecuación de Nernst, los potenciales de picos se ven desplazados en función de la velocidad de barrido. La corriente de pico en estos casos está dada por:

$$i_p = (2.99 \times 10^5) C A n^{3/2} \alpha^{1/2} D^{1/2} v^{1/2} \quad (17)$$

en donde α es el coeficiente de transferencia de carga. Para sistemas cuasirreversibles, la corriente de pico está controlada tanto por difusión como por la transferencia de carga. Las ecuaciones (14) y (17) nos indican cuánto se difunde libremente el analito en la disolución y qué peso tiene el coeficiente de transferencia de carga en los sistemas no reversibles [75]. Las desviaciones de la linealidad en un gráfico de i_p versus $v^{1/2}$ sugieren que el sistema es electroquímicamente cuasirreversible o que la transferencia de electrones ocurre por vía de adsorción de la especie electroactiva en la superficie del electrodo [76]. Para estos sistemas en los cuales media la adsorción, la respuesta de corriente se describe por:

$$i_p = \frac{F^2}{4RT} n^2 A \Gamma v = (9.39 \times 10^5) n^2 A \Gamma v \quad (18)$$

en donde Γ corresponde a la cobertura superficial de la especie adsorbida en mol/cm² y la temperatura se considera 25 °C. En la ecuación anterior se observa que, en los casos adsorptivos, la relación de i_p es lineal con respecto a v y no con respecto a $v^{1/2}$ como en los sistemas difusivos.

En términos generales e independientemente del sistema electroquímico, el aumento de la velocidad del barrido (v) provoca un gradiente de concentración más alto cercano al electrodo, lo cual conduce a una disminución en el tamaño de la capa de difusión; en consecuencia, se observa un aumento en el pico de corriente.

2.4.2 Barrido escalonado de potencial

En las técnicas de voltamperometría de barrido escalonado, el potencial se incrementa a través de una serie de pulsos discretos y simétricos. Cuanto más pequeña sea la altura del peldaño (aumento de potencial) y entre más corto sea el tiempo del pulso, más se asemejará al barrido lineal de potencial [77]. La principal ventaja de estas técnicas es la mejora en la sensibilidad analítica que proviene de dos factores. El primero de ellos se debe a la relación del potencial de la celda con las concentraciones de las especies reducidas y oxidadas por medio de la ecuación de Nernst. Al aplicarse un pulso de potencial, las concentraciones del cociente de la reacción química se modifican hasta que se cumpla la igualdad en la ecuación de Nernst; por lo tanto, al momento del pulso fluye una corriente mayor producto del reajuste.

El segundo factor está relacionado con la discriminación entre las corrientes capacitiva y farádica. Al inicio del pulso ambas corrientes son máximas para luego decaer en el tiempo de forma exponencial; sin embargo, la disminución de la corriente capacitiva es mayor con respecto a la caída de la corriente farádica. Por el contrario, si las mediciones de corriente se realizan al final del pulso o de forma diferencial *-i. e.* la resta de las corrientes antes y después del pulso- en lugar de hacer mediciones continuas, la corriente farádica será mayor que la corriente

capacitiva; consecuentemente la relación señal/ruido será también mayor en este punto [62]. En la Figura 12, se muestra la forma de la señal de excitación y el voltamperograma resultante para las tres técnicas de barrido escalonado en las disoluciones estacionarias que se describen a continuación.

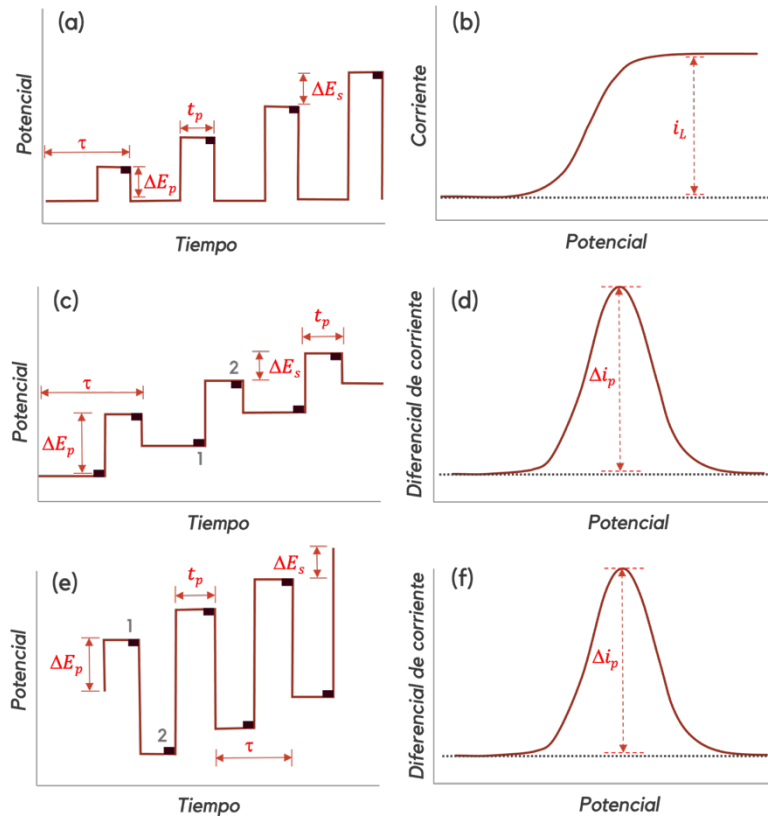


Figura 12 Voltamperometrías de barrido escalonado.

Los rectángulos negros indican el momento de medición de la corriente. (a) y (b) representan la forma de imposición de los pulsos de voltaje y el perfil de la onda típico para la voltamperometría de pulso normal, respectivamente. (c) y (d) simbolizan el pulso escalonado de potencial y el perfil de la señal para la voltamperometría de diferencial de pulso. (e) y (f) son la onda de pulsos de potencial y el voltamperograma característico para la voltamperometría de onda cuadrada.

Voltamperometría de pulso normal (NPV del inglés *Normal Pulse Voltammetry*). En esta técnica electroquímica el potencial se varía por medio de una serie de pulsos de amplitud creciente, caracterizados por un ciclo de tiempo τ , un tiempo del pulso t_p , un potencial del pulso ΔE_p y un cambio de potencial por ciclo de ΔE_s (Figura 12a). La corriente se mide justo antes de que finalice cada pulso de

potencial –antes de volver a su valor inicial– y se registra frente al aumento de la amplitud del pulso [78]. De la forma del voltamperograma se obtiene una corriente límite de difusión i_L tal como se aprecia en la Figura 12b, pues el tiempo τ le permite a la capa difusiva renovarse constantemente después de cada ciclo [79]. La NPV se emplea principalmente cuando es importante mantener una superficie electródica invariable la cual podría verse afectada por imposición de un voltaje.

Voltamperometría de diferencial de pulso (DPV del inglés *Differential Pulse Voltammetry*). Esta modificación se caracteriza porque utiliza un barrido de potencial muy parecido al que emplea la técnica de pulso normal, con la diferencia significativa de que los pulsos tienen una amplitud fija y se superponen a un barrido lineal o escalonado de potencial (Figura 12c). Además, la corriente se mide dos veces por ciclo: una vez justo antes de aplicar el pulso y otra vez precisamente antes de que finalice dicho pulso; la diferencia entre ambas mediciones da como resultado un diferencial de corriente Δi , a raíz del cual proviene el nombre de esta técnica. Una de las ventajas de la DPV es la forma del voltamperograma, pues resulta más fácil medir la altura de un pico que establecer la corriente límite de difusión [77].

Voltamperometría de onda cuadrada (SWV del inglés *Square Wave Voltammetry*). Su funcionamiento se basa en la aplicación de dos pulsos de potencial simétricos –uno negativo y otro positivo– los cuales se superponen a un barrido escalonado de potencial que da como resultado una onda cuadrada con una frecuencia usualmente entre 1 Hz y 100 Hz (Figura 12e). La primera medición de corriente se realiza al final del pulso de onda cuadrada de avance y la segunda medición al final del pulso de onda cuadrada de retorno; la diferencia de estas magnitudes da como resultado un pico más grande porque ambas señales individuales tienen polaridades opuestas y, por lo tanto, signos distintos, así que se suman. Una de las ventajas de esta técnica es que puede adoptar valores muy pequeños de τ , lo cual disminuye considerablemente el tiempo del análisis [72].

2.4.3 Barrido sinusoidal de potencial

A esta técnica se le conoce como voltamperometría de corriente alterna (ACV de su nombre en inglés *Alternating Current Voltammetry*). En esta modificación, un

potencial constante de corriente alterna (onda sinusoidal) se superpone a un potencial de barrido lineal (Figura 13). Como sucede en el procedimiento ordinario, el potencial de la corriente continua se varía en la escala usual, con la particularidad de que se mide la corriente alterna farádica producto del potencial alterno, en cuyo voltamperograma se distingue la corriente máxima en forma de pico. La principal ventaja de esta forma de imponer un voltaje de corriente alterna es su capacidad para discriminar entre las corrientes farádica y capacitiva, pues existe un desfase de 45° entre ambas corrientes que permite su diferenciación [80]. La técnica también es útil para estudios de cinética electroquímica.

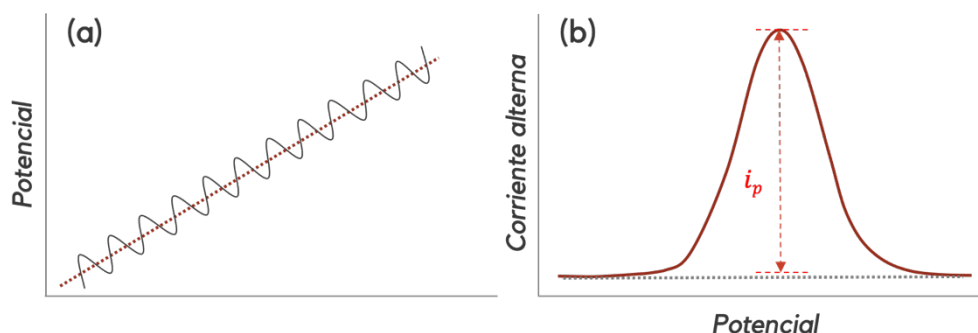


Figura 13 Voltamperometría de barrido sinusoidal de potencial.

(a) Programa de barrido en voltamperometría de corriente alterna. (b) Perfil del voltamperograma en la forma de corriente alterna versus potencial.

La elección de la técnica para realizar un análisis electroquímico depende del propósito y de las características de la muestra. La voltamperometría cíclica es una herramienta que suele ser empleada para estudiar el comportamiento general del proceso electroquímico. En contraste, la voltamperometría de barrido lineal (LSV), las técnicas de barrido escalonado (NPV, DPV y SWV) y ACV se utilizan, primordialmente, para análisis químico cuantitativo. La elección de cuál técnica utilizar a menudo depende de la concentración del analito y de la exactitud y la precisión deseadas.

Los límites de detección para LSV generalmente son del orden de 10^{-5} mol/L; con el fin de mejorar este valor se impulsaron las modificaciones que dieron origen a los métodos de barridos sinusoidal y escalonado, así como asociaciones entre las

técnicas y otros procedimientos alternos. Por su parte, ACV cuenta con límites de detección aproximadamente del orden de 10^{-6} mol/L, NPV del orden de 10^{-7} mol/L, DPV del orden de 10^{-8} mol/L y SWV del orden de 10^{-9} mol/L. Actualmente, los procedimientos de preconcentración electródica, ya sea por electroquímica o por adsorción, permiten disminuir estos límites de detección hasta 10^{-10} mol/L y 10^{-12} mol/L, respectivamente. Estos procedimientos son aplicables a las técnicas anteriores y se les conoce con el nombre de *voltamperometría de redisolución anódica, catódica o de adsorción* [63,65].

2.5 Sensores químicos

Los sensores modernos se emplean para detectar múltiples parámetros de la vida cotidiana. La clasificación más general de los sensores se describe con base en el principio de las mediciones contemplado en el diseño. Los tres grupos principales son: químicos, físicos y biológicos. La IUPAC definió un *sensor químico* como un dispositivo que transforma la información química, desde la concentración de un componente específico de la muestra hasta el análisis de la composición total, en una señal analíticamente útil. La información química puede provenir de una reacción química del analito o de una propiedad física del sistema investigado [81].

Al menos dos componentes básicos componen todo sensor químico: un sistema de reconocimiento –o receptor– que transforma la información química en una forma de energía y un transductor que convierte la energía en una señal de interés analítico. La forma más común de clasificar los sensores químicos se fundamenta en estos dos elementos, tal como se resumen en la Figura 14.

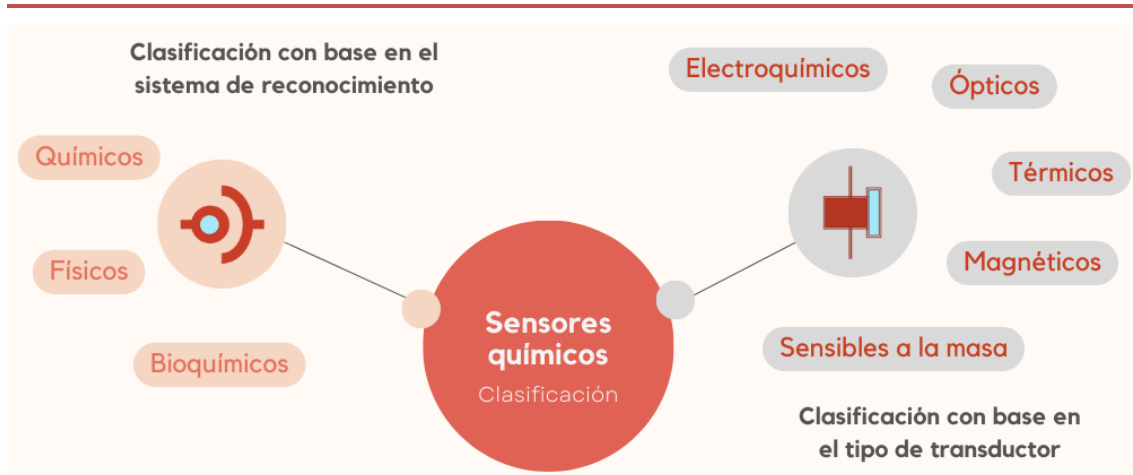


Figura 14 Clasificación de los sensores químicos con base en el tipo de receptor y en el tipo de transductor.

Un *sensor electroquímico*, según la misma IUPAC, es un sistema de medición que permite convertir la información de una reacción química en una señal eléctrica cuantificable por medio de un transductor apropiado [48]. Los componentes transductores en este tipo de dispositivos son conjuntos electródicos seleccionados con base en la función del sensor y empleados bajo condiciones de operación controladas. Los electrodos sólidos de trabajo como los que están hecho a base de carbón vítreo o de diamante dopado con boro han sido extensamente estudiados como transductores porque presentan una amplia ventana de potenciales eléctricos y una baja corriente residual, características muy deseables para la construcción de los sensores [82,83].

Las mejoras sustanciales en el desarrollo de ciertos electrodos los hacen cada vez más versátiles y han solucionado algunos de los inconvenientes en el uso de los electrodos convencionales, tales como la baja reproducibilidad, los procedimientos tediosos de limpieza y la cantidad de muestra requerida para el análisis. Los principales cambios han surgido de la miniaturización y del carácter desechable de los nuevos electrodos. Por ejemplo, como ha sucedido con los dispositivos elaborados con la tecnología serigráfica, los cuales han impulsado el desarrollo general de los sensores químicos [84–86].

El uso de los electrodos serigrafiados (SPE del inglés *Screen-printed Electrode*) como una herramienta de análisis químico ha revitalizado algunas de las aplicaciones básicas de la electroquímica. Su diseño clásico de los tres electrodos integrados en un sustrato ha llegado, incluso, a sustituir las celdas electroquímicas comunes como consecuencia de la reducción del volumen de trabajo a una sola gota. Para serigrafiar este tipo de electrodos se emplean tintas de diversas composiciones entre las que destacan la tinta de carbono, de plata, de oro y de platino; ya sea sobre un sustrato rígido como la cerámica o sobre un sustrato flexible como el plástico o los textiles. El proceso de fabricación de estos dispositivos incluye, además, una etapa de secado y de curado a una determinada temperatura de acuerdo con las propiedades que se requieran en el diseño del sensor [87–89].

La simplicidad de fabricación y el bajo costo que conllevan los sensores electroquímicos los han posicionado en el mercado como una herramienta analítica significativa para detectar y cuantificar una amplia variedad de analitos en diversas áreas como la biomedicina, las ciencias ambientales y las ciencias forenses [90]. Es importante resaltar que este tipo de sensor es el más utilizado principalmente por su buen desempeño analítico que se hace notorio en los bajos límites de detección, en un amplio rango lineal y en una buena precisión; todo lo anterior combinado con cortos intervalos de tiempo de análisis y con la posibilidad de realizar mediciones veraces en tiempo real sobre la composición química de su entorno, ya sea en el laboratorio o en condiciones de campo [91].

2.5.1 Clasificación de los sensores electroquímicos

Los sensores electroquímicos se pueden subdividir en varias categorías en función de la técnica de electroanálisis utilizada. Los sensores más comunes son los conductimétricos, los potenciométricos y los voltamperométricos. En este apartado se describirán con mayor detalle los sensores voltamperométricos, cuya variable de medición es la corriente en función del potencial aplicado.

Sensores conductimétricos. El principio de funcionamiento de los sensores de este grupo es la medición de los cambios de la conductividad eléctrica o de alguna otra propiedad relacionada con la conductividad, ya sea de una porción de un

material o del seno propio del material cuya conductividad se ve afectada por la presencia de un analito. Las mediciones con estos dispositivos determinan la habilidad de una sustancia para restringir el paso de una corriente entre dos electrodos –resistencia eléctrica o en su lugar impedancia si emplea una corriente alterna– [92].

Los métodos que se utilizan con los sensores conductimétricos son principalmente no selectivos debido a que la gran mayoría de electrodos son fabricados de metales inertes como el oro o el platino. No obstante, el desarrollo de nuevos materiales aplicados en la modificación de superficies electródicas junto con una instrumentación muy mejorada, han permitido formular procedimientos más viables para diseñar sensores selectivos para ciertos iones [93].

Sensores potenciométricos. Este tipo de sensor se basan en la medición interfacial de la diferencia de potencial de un electrodo indicador con respecto a un electrodo de referencia en condiciones de circuito abierto, es decir, cuando no hay un flujo de corriente eléctrica en el electrodo. La señal de un sensor potenciométrico se basa en la ecuación de Nernst (8), la cual predice una dependencia lineal de la respuesta del sensor en función del logaritmo de la actividad o de la concentración de la especie en disolución.

Los sensores potenciométricos han sido el grupo de sensores electroquímicos más estudiados y desarrollados a través de varias décadas. La mayor aplicación de estos dispositivos provino de la creación de los electrodos selectivos de iones como sucedió con el electrodo de membrana selectiva de vidrio, tan ampliamente utilizado hoy en día para las mediciones de pH. Los electrodos indicadores metálicos redox y los electrodos de óxido metálico mixto son los otros dos tipos de electrodos que se emplean para el diseño y elaboración de los sensores pertenecientes a esta categoría [94,95].

Sensores voltamperométricos. Los sensores de este tipo registran la información del sistema de medición a través de la intensidad de corriente obtenida (directa o alterna) al imponer un potencial eléctrico sobre el electrodo de trabajo. Tal como se explicó en la sección 2.3, la aplicación de esta técnica en el desarrollo

de sensores conlleva a la medición de la corriente en función de un barrido temporal de potencial en la celda electroquímica. Sin embargo, esta forma de imposición de potencial no es la única forma de aplicar un voltaje en el electrodo de trabajo. Si el potencial se mantiene constante durante todo el ensayo se puede medir la corriente en función del tiempo, a este subgrupo de sensores se les conoce como *sensores amperométricos*. Otro subgrupo de sensores en esta categoría, aunque menos comunes, son los dispositivos que no requieren de una fuente externa de corriente, conocidos como sensores galvánicos [81,96].

Según la IUPAC, los sensores voltamperométricos se fundamentan en el uso de electrodos inertes, electrodos químicamente activos y electrodos modificados [81]. La investigación en el uso de materiales novedosos para este último grupo de electrodos ha mejorado algunas de las limitaciones que presentan los sensores electroquímicos en general que ocasionan, por ejemplo, disminuciones en la selectividad y en la sensibilidad. Los sistemas modernos de detección se han beneficiado de los avances de la microelectrónica y la microingeniería, principalmente en el desarrollo de electrodos miniaturizados y más baratos cuya respuesta analítica suele tener una mejor relación de la señal con respecto al ruido [97].

La innovación en el desarrollo de sensores voltamperométricos ha implementado, además, los beneficios de la nanotecnología y la nanociencia a través de la síntesis y de la aplicación de los nanomateriales compuestos. Las propiedades de estos materiales a escala nanométrica repercuten, particularmente, en los sistemas de medición, en los cuales la relación de la superficie entre el volumen desempeña un papel importante, tal como sucede en las mediciones electrónicas interfaciales [98,99].

Entre los materiales más utilizados para la modificación de superficies de los electrodos están los metales, las cerámicas, los semiconductores, los polímeros, los compuestos organometálicos y las biomoléculas. Las estructuras nanométricas comunes en las que se emplean estos materiales tienen formas de nanopartículas, nanotubos, nanoestrellas, nanofibras, nanoesferas y nanoláminas [100,101].

Algunos de los materiales nanocompuestos ampliamente utilizados son las nanopartículas de oro, los nanotubos de carbono, el grafeno y las enzimas. Entre las principales ventajas que aportan las modificaciones de los electrodos, aparte del ya mencionado, aumento del área superficial, destacan el aumento de la reactividad, una mayor biocompatibilidad, el incremento en la adsorción, la catálisis de reacciones electroquímicas y el soporte estructural para la inmovilización de moléculas. Algunas de estas características influyen positivamente en la eficiencia de la transferencia de carga, lo que se traduce en un mejor desempeño analítico del sensor [91].

2.5.2 Biosensores electroquímicos

La modificación de los transductores electroquímicos (electrodos) con biomoléculas ha sido una práctica muy estudiada para el desarrollo de dispositivos más sensibles y puntualmente más selectivos. Los biosensores se pueden diferenciar de acuerdo con el elemento biológico utilizado como receptor. Algunos de estos pueden ser: organismos, anticuerpos, membranas, organelas, células, tejidos, ácidos nucleicos y enzimas [102].

Las modificaciones electródicas dan origen a biosensores conductimétricos, potenciométricos y voltamperométricos; la elección de la técnica de electroanálisis depende de la reacción biológica que media a través del sistema de reconocimiento. El receptor molecular podría involucrar una conversión del analito en sus respectivos productos por medio de un proceso biocatalítico, o bien, medir las interacciones del analito a través del reconocimiento específico sin una reacción química basada exclusivamente en la bioafinidad. De estos dos subgrupos de biosensores, es claro que los biocatalíticos requieren de una mayor atención en esta sección puesto que los sensores voltamperométricos miden la corriente que se produce en una reacción de transferencia de electrones [92,103].

Los biosensores surgieron en la década de los años 1960. La primera publicación científica sobre un biosensor se refiere a un dispositivo propuesto para la determinación de la glucosa en la sangre. Su principio de medición se fundamentó en la reacción catalítica de oxidación del monosacárido en ácido glucónico por

acción de la enzima glucosa oxidasa inmovilizada en un electrodo selectivo de oxígeno [104]. Desde entonces, los avances en el desarrollo de este tipo de sensor electroquímico han sido muy significativos, convirtiéndolo en uno de los sensores con mayores aplicaciones gracias a los enfoques innovadores que involucran múltiples disciplinas [105].

Entre los componentes receptores típicos de los sensores biocatalíticos destacan las enzimas, unas biomoléculas de naturaleza proteica con actividad catalítica muy específica, *i. e.* son capaces de acelerar reacciones químicas de forma selectiva sin consumirse en el proceso químico. La forma en la que llevan a cabo este proceso es por la disminución de la energía de activación de la reacción a través de una interacción pasajera con los sustratos o las sustancias reaccionantes. El mecanismo básico de la catálisis enzimática se describe como una enzima (E) y un sustrato (S) que se asocian en un complejo transitorio enzima-sustrato ($E-S$) previo a la transformación del sustrato en un producto (P), tal como se muestra en la siguiente reacción general:



La velocidad de formación del producto en la expresión anterior, $d[P]/dt$, se representa por medio de un reacomodo matemático de la ecuación de Michaelis-Menten y se muestra a continuación:

$$\frac{d[P]}{dt} = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]} \quad (19)$$

en la cual V_{max} es la velocidad máxima de la reacción y K_m corresponde a la constante de Michaelis-Menten definida como la concentración del sustrato cuando la velocidad de reacción es la mitad de V_{max} . Esta constante es afectada por varios factores, entre ellos la temperatura, el pH y ciertas propiedades del sustrato mismo [63].

Unas de las enzimas más empleadas en el diseño y construcción de los biosensores catalíticos son las oxidorreductasas, un tipo de biomoléculas que catalizan la transferencia de electrones en las reacciones tipo redox; cualidad que

resulta muy útil para el desempeño analítico del sensor electroquímico. Si bien, dicha transferencia electrónica entre el centro redox de la proteína y la superficie electródica puede suceder de forma directa, la transferencia no siempre ocurre con facilidad debido al aislamiento que generan las mismas cadenas polipépticas. En estos casos es recomendable modificar estructuralmente la superficie del electrodo o utilizar moléculas mediadoras para mejorar el flujo de transferencia de electrones como se representa en la Figura 15 [106].

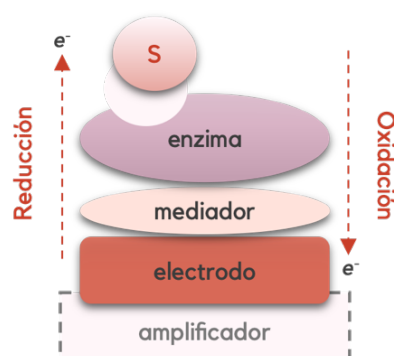


Figura 15 Diseño básico de un biosensor con mediador para el flujo electrónico. Las flechas indican la dirección del flujo de electrones en la catálisis enzimática. S corresponde al sustrato.

La elaboración de este tipo de sensor electroquímico requiere la adherencia al transductor, tanto de la enzima como de cualquier otro elemento que forme parte del diseño estructural. Los métodos de inmovilización se pueden agrupar en dos categorías: a) los físicos como el atrapamiento y los procedimientos con inclusión en membranas y b) los químicos, entre los que se pueden mencionar la adsorción, el entrecruzamiento y la fijación por medio de enlaces covalentes. La principal ventaja de la fijación de los componentes es brindar una mayor estabilidad de la enzima y del sistema de medición completo; aunque esto puede disminuir la actividad catalítica ocasionalmente [107].

Una de las técnicas más extendidas para la inmovilización de agregados proteicos es la reacción de entrecruzamiento a través del glutaraldehído ($C_5H_8O_2$). Este compuesto orgánico se distribuye comercialmente en disoluciones acuosas que presentan distintas estructuras químicas –forma monomérica, cadenas lineales

hidratadas, hemiacetales cíclicos y oligómeros– de acuerdo con el pH, la concentración y la temperatura. El glutaraldehído suele reaccionar con las aminas primarias presentes en la estructuras básicas de las proteínas para formar enlaces covalentes entrecruzados que se extienden por polimerización fijando las macromoléculas a la superficie electródica [108–110]. Algunos procedimientos alternativos que mejoran la fijación polimérica de las proteínas son el depósito previo de nanomateriales como los nanotubos que sirven para un mayor soporte y los pretratamientos electroquímicos de las superficies de los electrodos.

2.5.3 Sensores espectroelectroquímicos

El diseño de dispositivos de alta especificidad –*e. g.* los sensores selectivos de iones o los biosensores– contribuye a mejorar la selectividad en los sistemas de medición electroquímicos. Para que esto suceda, deben cumplirse condiciones muy específicas que no siempre se pueden garantizar si se toman en cuenta las propiedades fisicoquímicas del analito y las características de la matriz de análisis. Otra solución para aumentar la capacidad de resolución analítica suele ser la combinación de técnicas instrumentales para recolectar información de los fenómenos que ocurren en un proceso electródico desde dos aristas distintas. Esta tecnología híbrida integrada en un sensor voltamperométrico combina las ventajas de cada técnica analítica en un solo ensayo para obtener una mejor descripción del sistema químico [111].

La espectroelectroquímica (SEC por sus siglas en inglés de *Spectroelectrochemistry*) se compone de un grupo de métodos de análisis que combinan las mediciones de espectrometría y de electroquímica para adquirir datos de forma simultánea e *in situ* en una celda electroquímica [112]. El aporte espectroscópico depende de la región del espectro analizada, del tipo de interacción que tenga con el analito y de la forma en la que se mida. Los resultados de la espectroscopia molecular, luminiscente o vibracional, por mencionar algunas metodologías ópticas, contribuyen no solo a recopilar información estructural y conformacional para identificar las especies electroactivas e intermediarios de la

reacción, sino a elucidar los mecanismos de transferencia electrónica y a entender mejor los sistemas estudiados [113,114].

La cuantificación en los análisis SEC generalmente se realiza a través del transductor electroquímico empleado en el sensor, algunos de los cuales se consiguen comercialmente en múltiples presentaciones que van desde electrodos ópticamente transparentes hasta sustratos de superficie mejorada para espectroscopia Raman [115].

No obstante, cada vez resulta más común la elección de técnicas espectroscópicas con una utilidad más allá de la descripción e identificación molecular. Por tal motivo, las combinaciones de técnicas más usadas para el desarrollo de este tipo de sensor son: SEC de absorción UV-Vis, SEC de fluorescencia y SEC de dispersión Raman. Independientemente del objetivo con el que se configure el sistema híbrido SEC, su mayor potencial proviene del carácter dinámico de la correlación bidimensional de metodologías y de la capacidad de alta resolución temporal [116].

SEC de UV-Vis. Los sensores de esta categoría combinan la técnica de absorción molecular en la región del espectro ultravioleta o visible con alguna de las técnicas electroquímicas. Ha sido por muchas décadas la herramienta espectroelectroquímica más explorada, principalmente por su versatilidad, su bajo costo y porque es un procedimiento relativamente sencillo [117].

La configuración de la celda de medición se establece de acuerdo con el ángulo de incidencia del haz de luz, que puede ser perpendicular al electrodo (configuración normal) o de forma paralela (es decir, el camino óptico más largo). El principio de medición espectroscópico varía tanto por la configuración de la celda como por lo que se desea investigar del sistema electroquímico; así podría emplearse, *e.g.* espectroscopia UV-Vis en modo de transmitancia o reflectancia [116,118].

SEC de fluorescencia. Los sensores espectroelectroquímicos de este tipo adicionan al desempeño electroquímico la alta sensibilidad y la selectividad de la espectroscopia fluorescente; propiedades que permiten ampliar el rango de

aplicaciones en distintos campos, principalmente en aquellos en los que se requiere un análisis cuantitativo. Uno de los mayores aportes de esta metodología es el monitoreo del tiempo de vida de especies luminiscentes bajo la transformación electroquímica *in situ* del analito [119].

Por el contrario, la poca versatilidad de las celdas de medición para cumplir con el requisito de detección luminiscente a 90°, sumado a que se limita a un grupo reducido de moléculas electroactivas que presentan una buena intensidad fluorescente, contribuyen a desestimular su investigación y su uso. Esto ha impedido el desarrollo exhaustivo de sensores como el que sí ha tenido la SEC de absorción UV-Vis [120,121].

SEC de Raman. La espectroscopia Raman es una técnica basada en el efecto de la dispersión inelástica –dispersión Raman– de una fuente de luz láser monocromática, usualmente en la región entre el ultravioleta cercano y el infrarrojo cercano. En los últimos años la SEC de espectroscopia Raman se ha convertido en una herramienta valiosa para estudiar diversos procesos electroquímicos. Algunas de las aplicaciones más importantes son: estudios de transferencia iónica y electrónica, análisis cualitativos y cuantitativos, caracterización de materiales y estudios sobre la transformación y el almacenamiento de la energía [122,123].

A pesar de que la espectroscopia Raman es una de las mejores técnicas para la identificación molecular a través de la huella espectroscópica de frecuencias vibracionales, su uso en SEC ha estado subordinado a la sensibilidad analítica que determina la señal de la dispersión Raman, la cual es bastante baja en relación con la dispersión elástica de Rayleigh; ya que aproximadamente solo una molécula en el intervalo entre 10^8 moléculas y 10^{11} moléculas experimenta una dispersión inelástica [118]. El posicionamiento como una herramienta versátil y con potencia analítica para mediciones de SEC, proviene de la integración de técnicas que amplifican significativamente las señales de las frecuencias de dispersión, por ejemplo, la espectroscopia Raman de superficie mejorada (SERS por sus siglas en inglés de *Surface Enhanced Raman Spectroscopy*) [124,125].

El fenómeno SERS ocurre por la combinación de dos mecanismos principales; el primero es el mecanismo electromagnético, cuyo efecto se debe a la resonancia de los plasmones cuando inciden los fotones sobre la superficie rugosa del sustrato metálico, que ocasiona un aumento del campo eléctrico y así un incremento de la señal. El segundo mecanismo es el aumento químico, el cual es un tanto más difícil de predecir y significativamente más débil que el efecto electromagnético. De forma muy general, este efecto químico se puede atribuir a la transferencia de carga que se da en un pseudocomplejo entre las moléculas del analito y la superficie nanoestructurada del sustrato [122,126].

La ganancia en la amplificación de la señal por medio de la técnica SERS es de varios órdenes de magnitud, aproximadamente entre 10^{10} y 10^{14} veces mayor que la señal convencional [127,128], que según reportes de la literatura científica, es suficiente para detectar una molécula individual [129,130].

Hoy en día existen muchas configuraciones de celdas para las mediciones de SEC de Raman, múltiples materiales empleados como sustratos y diversas formas de dirigir los ensayos electroquímicos y los espectroscópicos. Por ejemplo, es posible emplear el procedimiento electroquímico para cuantificar el analito, para electroactivar la superficie del sustrato con el propósito de favorecer el mecanismo SERS o para absorber el analito sobre la superficie plasmónica del metal [116].

El incremento cuantioso que proporciona la técnica SERS a la sensibilidad analítica sumado a la alta selectividad de la espectroscopia Raman, convierten la SEC de espectroscopia Raman en una de las técnicas más promisorias para el desarrollo de sensores espectroelectroquímicos. Los esfuerzos de investigación actuales van dirigidos hacia la búsqueda y creación de nuevos y mejores materiales que funcionen como superficie electródica y a su vez como sustrato para SERS [131].

2.6 Uso de sensores electroquímicos para el análisis de NSP

El análisis químico de las sustancias psicoactivas abarca una serie de elementos que incluyen procedimientos muy específicos para la recolección de las

muestras y técnicas de análisis muy especializadas para la determinación de los analitos [16].

En el campo de las pruebas de drogas se distinguen, generalmente, dos tipos de análisis: las pruebas preliminares y las pruebas confirmatorias. Las metodologías analíticas por excelencia para la confirmación cualitativa y cuantitativa de NSP se basan en técnicas estandarizadas de separación acopladas con la espectrometría de masas, *e. g.* la cromatografía de gases (GC-MS del inglés *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*) y la cromatografía líquida (LC-MS del inglés *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*) [132,133].

En contraste, las pruebas preliminares son un campo más dinámico que adapta y aplica algoritmos *in situ* con el propósito de obtener resultados en tiempo real. El desarrollo de los sensores electroquímicos ha puesto una especial atención a los requerimientos del análisis de campo, en el cual es imprescindible una respuesta inmediata sin comprometer la calidad analítica de los resultados, tal como lo demandan la toxicología y la medicina forense.

Es bien conocido el buen desempeño analítico que presentan las técnicas de separación con espectrometría de masas. Las altas sensibilidad y selectividad hacen posible la determinación, básicamente, de cualquier psicoestimulante y de sus derivados con un elevado porcentaje de confiabilidad, incluso a niveles de concentración muy bajos y en diferentes matrices [134]. No obstante, estas potentes plataformas analíticas están restringidas a un entorno de laboratorio debido a la falta de características de portabilidad instrumental. Así mismo, los tiempos de respuesta analítica no son inmediatos debido a la manipulación y a la preparación de muestras en varias etapas [135]. Estas características –sumadas a los altos costos de mantenimiento– han motivado la búsqueda de herramientas más versátiles y con menores costos operativos que permitan solventar las necesidades de una primera respuesta en ensayos preliminares.

Los nuevos dispositivos de detección miniaturizados han provisto a la comunidad científica de aplicaciones modernas para el monitoreo analítico en tiempo real en las pruebas de drogas. Ciertas características de los sensores

electroquímicos –como la fácil manipulación, una mínima huella residual relacionada con la capacidad de analizar micro cantidades de muestra, así como un bajo costo para el diseño y el desarrollo del dispositivo– destacan la idoneidad para los análisis *in situ* [136].

Los procedimientos electroquímicos de los distintos sensores se adaptan bien a las condiciones requeridas de campo. Ofrecen, además, métodos de cuantificación precisos y con bajos límites de detección, cuyos resultados permiten tomar decisiones en el sitio en conjunto con las autoridades correspondientes, previo al envío de las muestras al laboratorio para su procesamiento y análisis confirmatorio [15,137].

En el Cuadro I se muestran los sensores electroquímicos reportados para la determinación cuantitativa de las siguientes NSP sintéticas: las piperazinas bencilpiperazina (BZP) y meta-clorofenilpiperazina (mCPP), la fenetilamina sustituida 25B-NBOMe, la triptamina dimetiltriptamina (DMT), las catinonas mefedrona (4-MMC) y su derivado 4-metilecatinona (4-MEC), así como el fentanilo (FYL). La búsqueda bibliográfica de los sensores incluidos en el Cuadro I se limitó a estas sustancias psicoactivas aún presentes en el mercado global clandestino porque son las moléculas estudiadas y reportadas en esta tesis doctoral.

Cuadro I. Sensores electroquímicos reportados en la literatura para la cuantificación de un grupo de NSP sintéticas.

NSP	Método	Electrodo de trabajo	Medio	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	Fecha de publicación	Referencia
25B-NBOMe	DPV	SP-C	PBS pH 7.0	11	12-2016	[138]
	SWV	BDD	BA pH 4.0	0.04	08-2017	[139]
	SWV	BDD	BA pH 9.5	0.04	04-2018	[140]
	DPV	BDD	CH ₃ CN/TEAP	0.24	01-2021	*[141]
	DPV	SP-C	BBR pH 8.0	0.44	01-2021	*[141]
	DPV	SP-Pt	CH ₃ CN/TEAP	0.76	01-2021	*[141]
BZP	SWV	CP	BBR pH 9.5	1.0	12-2016	[142]
	DPV	BDD	CH ₃ CN/TEAP	0.77	01-2021	*[141]
	DPV	SP-C	BBR pH 9.0	0.61	01-2021	*[141]
	DPV	SP-Pt	CH ₃ CN/TEAP	1.3	01-2021	*[141]
	DPV	SP-C	BBR pH 5.0	0.05	04-2021	[143]
mCPP	POT	PMBS	Tris-HCl pH 7.0	0.10	09-2019	[144]
	DPV	BDD	BBR pH 10	0.22	02-2020	[145]
	DPV	BDD	CH ₃ CN/TEAP	0.27	01-2021	*[141]
	DPV	SP-C	BBR pH 8.0	0.15	01-2021	*[141]
	DPV	SP-Pt	CH ₃ CN/TEAP	1.1	01-2021	*[141]
	SWV	SP-C	BBR pH 7.0	0.02	10-2021	[146]
DMT	DPV	GC modificado	NaClO ₄ pH 6.0	0.33	03-2020	[147]
	DPV	BDD	CH ₃ CN/TEAP	0.38	01-2021	*[141]
	DPV	SP-C	BBR pH 8.0	0.33	01-2021	*[141]
	DPV	SP-Pt	CH ₃ CN/TEAP	1.8	01-2021	*[141]
4-MMC	CV	SP-G	PBS pH 12.0	13.2	11-2013	[148]
	CV	SP-G	BA pH 4.3	11.8	08-2014	[149]
	CV	Moneda de un penique	BA pH 8.5	0.56	07-2015	[150]
	SWV	GC modificado	pH 6.0	1.4x10 ⁻⁴	08-2018	[151]
	CV-SERS	SP-Au	H ₂ SO ₄ pH 1.8	6.6	12-2021	*[152]
	AdSSWV	CP modificado	Tris-HCl pH 9.0	6.08x10 ⁻⁷	02-2022	[153]
	DPV	GC modificado	BF pH 6.0	0.21	04-2022	[154]
	POT	Selectivo de iones	--	0.18	01-2023	[155]
4-MEC	CV	SP-G	PBS pH 12.0	36.3	11-2013	[148]
	CV	SP-G	BA pH 4.3	11.6	08-2014	[149]
	CV	Moneda de un penique	BA pH 8.5	0.50	07-2015	[150]
	CV-SERS	SP-Au	H ₂ SO ₄ pH 1.8	2.4	12-2021	*[152]

Continuación del Cuadro I.

NSP	Método	Electrodo de trabajo	Medio	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	Fecha de publicación	Referencia
FYL	CSWV	SP-C modificado	PB pH 7.4	1.68	02-2019	[156]
	SWV	SP-C modificado	PBS pH 7.4	3.36	04-2019	[157]
	DPV	GC modificado	PB pH 7.0	0.101	01-2020	[158]
	DPV	Reticulado de SWCNT	PBS pH 7.4	0.004	01-2020	[159]
	DPV	SP-C modificado	PB pH 7.0	0.101	04-2020	[160]
	AdSSWV	SP-C	Tris-HCl pH 8.5	0.233 0.037	07-2020	[161]
	AdSDPV	GC modificado	PB pH 7.4	0.034	09-2020	[162]
	DPV	GC modificado	PBS pH 7.0	0.003	10-2021	[163]
	SWV	LCE	PBS pH 7.4	0.336	04-2022	[164]
	DPV	GC modificado	PBS pH 7.0	0.001	07-2022	[165]
	SWV	Au modificado	PB pH 7.4	0.002	08-2022	[166]
	SWV	GC modificado	PBS pH 7.4	0.002	09-2022	[167]
	AdSCV	SP-C modificado	PB pH 7.5	0.086	11-2022	*[168]

*Publicaciones realizadas de esta tesis doctoral. POT: potenciometría, AdSSWV: *adsorptive stripping* SWV, AdSDPV: *adsorptive stripping* DPV, SP-C: *screen-printed carbon*, BDD: *boron-doped diamond*, SP-Pt: *screen-printed platinum*, CP: *carbon paste*, PMBS: *Polymeric membrane-based sensor*, SP-G: *screen-printed graphite*, SP-Au: *screen-printed gold*, GC: *glassy carbon*, SWCNT: *single-walled carbon nanotubes*, LCE: *laser carbonized electrode*, PBS: *phosphate-buffered saline*, BA: *buffer de acetato*, TEAP: *tetraethyl ammonium perchlorate*, BBR: *Buffer Britton Robinson*, BF: *buffer de fosfatos*.

En la última década se han reportado alrededor de cincuenta sensores electroquímicos de distintas técnicas y modificaciones electródicas solo para estas siete sustancias psicoactivas. El aumento reciente de propuestas analíticas con nuevos dispositivos electroquímicos evidencia la relevancia de las metodologías electroquímicas, tanto así que se ha incrementado la oferta comercial de instrumentos, electrodos y distintos accesorios electroquímicos para el desarrollo de sensores diseñados para analizar, no solo drogas, sino una enorme variedad de analitos.

3 Hipótesis

Los métodos electroquímicos basados en la medición de señales de diferentes técnicas electroquímicas con electrodos sólidos tienen la capacidad analítica para identificar y cuantificar nuevas sustancias psicoactivas, conocidas como drogas emergentes o de diseño, de manera más sencilla que otras técnicas de análisis químico.

4 Objetivos

4.1 Objetivo general

Desarrollar sensores electroquímicos para la determinación cualitativa y cuantitativa de drogas sintéticas a partir de varios tipos de electrodos sólidos.

4.2 Objetivos específicos

1. Optimizar las condiciones electroanalíticas para desarrollar sensores electroquímicos a través del uso de diferentes materiales empleados como electrodo indicador y soporte electrolítico.
2. Recomendar un sensor electroquímico óptimo para el análisis de drogas sintéticas en saliva por medio de la comparación de los parámetros de desempeño analítico.
3. Desarrollar un sensor selectivo para la determinación de drogas de diseño con estructuras químicas similares por medio de la sincronización de una técnica electroquímica con una técnica espectroscópica.
4. Usar un sensor espectro-electroquímico para la identificación de drogas en aplicaciones forenses por voltamperometría cíclica y espectroscopia Raman de superficie mejorada (SERS).
5. Crear un biosensor enzimático para la determinación de drogas de uso recreativo a través de la modificación de electrodos serigrafiados de carbono con nanotubos de carbono y citocromo *c*.
6. Validar la metodología electroquímica utilizada por el biosensor enzimático para analizar fentanilo en orina mediante la determinación de algunos parámetros analíticos tales como: sensibilidad, linealidad, reproducibilidad, límites de detección y cuantificación, entre otros.

5 Sección experimental

En las siguientes figuras se esquematizan los procesos generales de la parte experimental de esta investigación para la elaboración de los tres sensores químicos, el biosensor enzimático y el sensor electroquímico. Los procedimientos detallados que corresponden a cada una de las etapas de esos procesos de elaboración se describen en los respectivos apartados de la sección de resultados y discusión [108,159,169-172].



Figura 16 Esquema que ilustra el proceso para desarrollar los tres sensores electroquímicos para el análisis de las drogas 25B-NBOMe, BZP, mCPP y DMT.

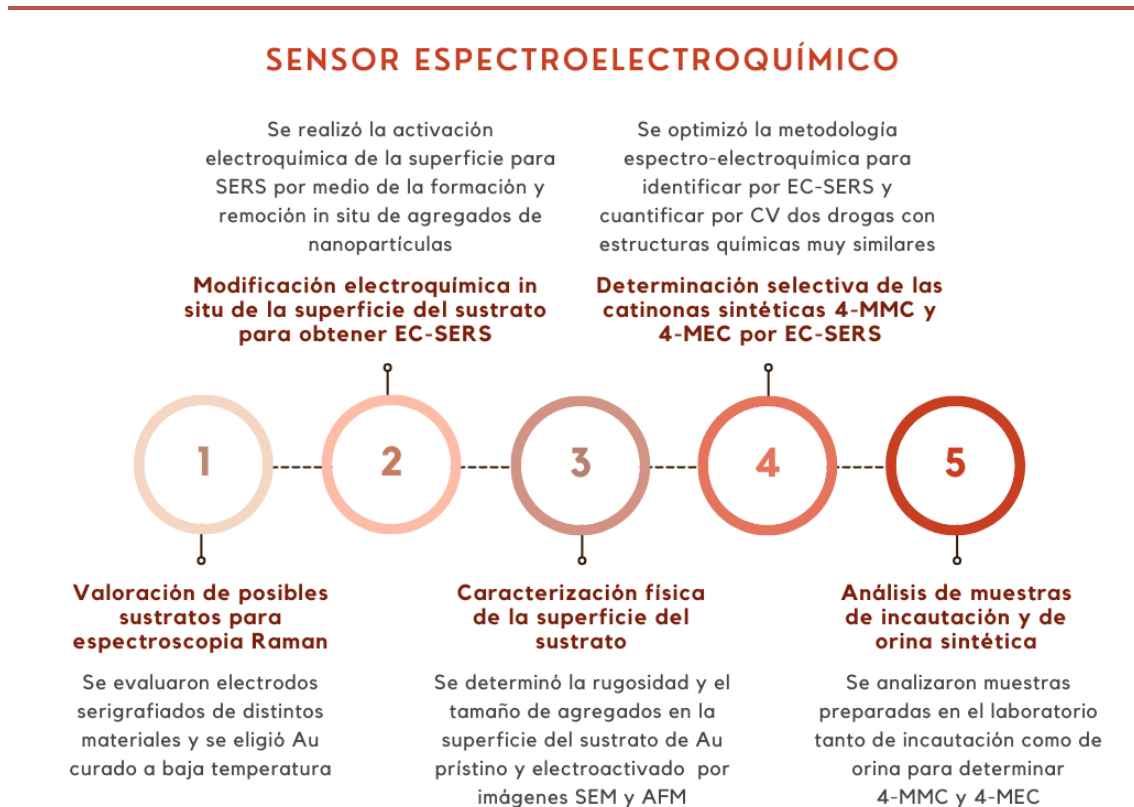


Figura 17 Esquema que resume el proceso para desarrollar el sensor espectroelectroquímico para la determinación de las catinonas sintéticas 4-MMC y 4-MEC.

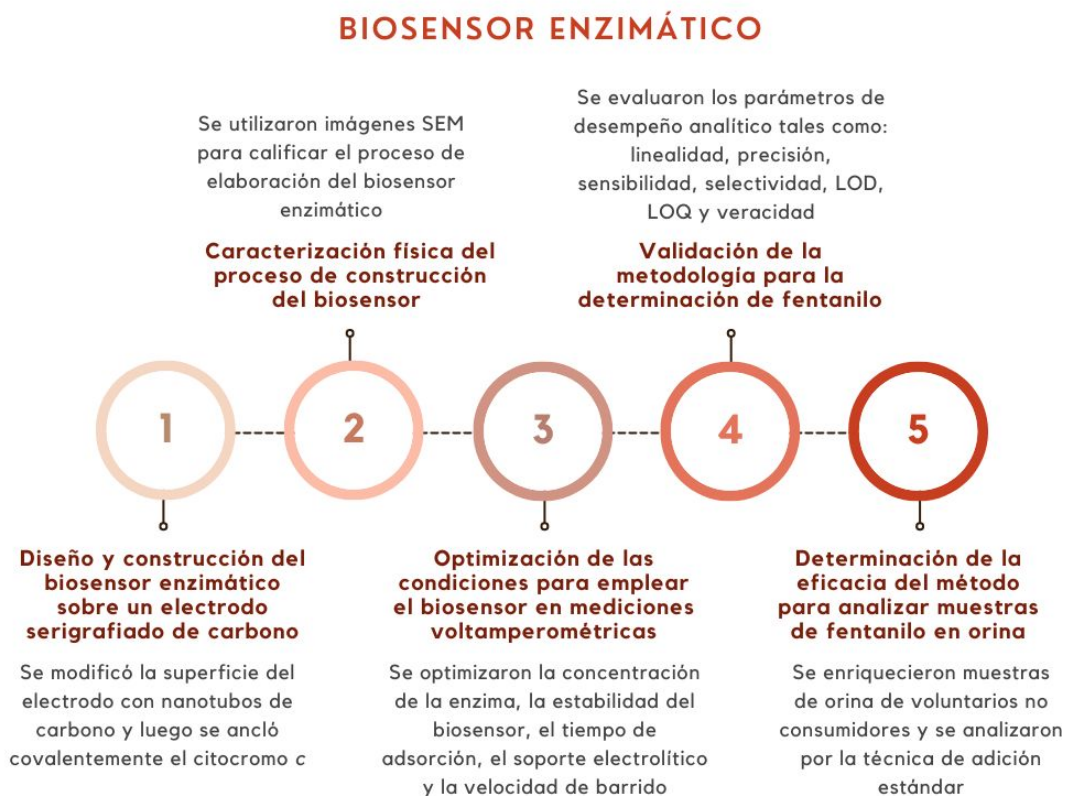


Figura 18 Esquema representativo del proceso para desarrollar un biosensor enzimático para la determinación cuantitativa de fentanilo.

6 Resultados y discusión

Los resultados que se muestran a continuación están separados en tres apartados que abordan el diseño, la experimentación y el desarrollo de distintos sensores electroquímicos para los análisis de las NSP. La forma en la que se presenta cada apartado corresponde al formato original de la publicación científica en el idioma inglés, generada de acuerdo con los objetivos planteados –se tradujo el resumen y la introducción–.

En el primer apartado se exponen tres sensores electroquímicos construidos con electrodos serigrafiados de carbón y platino, así como con el electrodo sólido de diamante dopado con boro. Los dispositivos se optimizaron para analizar cuatro drogas del conjunto de nuevas sustancias psicoactivas: 25B-NBOMe, BZP, mCPP y DMT. La efectividad de los tres sensores para determinar las cuatro drogas se midió en muestras simuladas de fluido oral. El esquema general de la parte experimental se puede consultar en la Figura 16.

Seguidamente, en el apartado II, se muestran los resultados y los datos de la experimentación para el desarrollo de un sensor electroquímico basado en voltamperometría cíclica y espectroscopia Raman de superficie mejorada (SERS). El dispositivo se utilizó para identificar y cuantificar la mefedrona (4-MMC) y su derivado la 4-metilecatinona (4-MEC). Se empleó un electrodo serigrafiado de oro, tanto para la voltamperometría como para SERS (ver la Figura 17 para consultar la parte experimental). La viabilidad del sensor se probó en muestras simuladas de incautación y de orina sintética.

Por último, en el tercer apartado se presenta un biosensor voltamperométrico de catálisis enzimática para la determinación de fentanilo, según el procedimiento experimental que se ilustra en la Figura 18. El diseño se basó en un electrodo serigrafiado de carbón modificado con nanotubos de carbón y con una biopelícula de citocromo *c*. El desempeño analítico del dispositivo se midió con los resultados del análisis de muestras simuladas de fentanilo en orina natural.

6.1 Apartado I: Sensores electroquímicos

Sensores electroquímicos para el análisis cuantitativo de las drogas de diseño 25B-NBOMe, DMT, BZP y mCPP en saliva

6.1.1 Resumen

Las drogas 25B-NBOMe, N,N-dimetiltriptamina (DMT), 1-bencilpiperazina (BZP) y 1-(3-clorofenil)piperazina (mCPP) se clasifican como nuevas sustancias psicoactivas (NSP) con potentes efectos alucinógenos y estimulantes. Con el fin de desarrollar dispositivos basados en métodos expeditos para el análisis preliminar de drogas, se investigó el comportamiento electroanalítico de estas moléculas mediante las voltamperometrías cíclica (CV) y de diferencial de pulso (DPV). Los transductores que se utilizaron en el diseño de los sensores fueron un electrodo de diamante dopado con boro –ensamblado en una microcelda impresa en 3D– y varios electrodos serigrafiados desechables, tanto de carbón como de platino. El método de bajo costo propuesto en este estudio se caracteriza por requerir un volumen entre los 50 μL y los 100 μL , por una preparación simple de la muestra y por generar muy pocos residuos.

Las señales electroquímicas registradas como picos de corriente anódica se obtuvieron de curvas de regresión lineal de cinco puntos ($n = 3$), optimizadas para estimar la sensibilidad, los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ), la repetibilidad y la precisión intermedia. Los resultados fueron concordantes con dispositivos analíticos de alta sensibilidad, con una precisión satisfactoria – coeficientes de variación entre el 1.7% y el 9.0%– y con bajos límites de detección – valores entre 0.15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 1.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ – que prevén un potencial valor analítico en aplicaciones clínicas y forenses. La veracidad del método y la aplicabilidad del sensor voltamperométrico se evaluaron a través de curvas de adición estándar para analizar muestras enriquecidas de fluido oral; cuyas recuperaciones analíticas estuvieron entre el 98% y el 103%. Este trabajo de investigación permitió comparar, por primera vez, los parámetros de desempeño analítico de cada uno de los tres sensores electroquímicos para la determinación de las cuatro sustancias psicoactivas elegidas.

6.1.2 Introducción

Las NSP con potentes efectos psicotrópicos preparadas en laboratorios clandestinos plantea retos importantes para la salud pública, ya sea por el uso indebido o por el abuso de estas sustancias [173]. A principios del año 2020, alrededor de 120 países de todo el mundo reportaron la aparición de un total acumulado de casi mil tipos de NSP, muchas de las cuales son agonistas y estimulantes de los receptores de cannabinoides sintéticos como las fenetilaminas y las catinonas sintéticas [174].

La expansión en la producción de NSP se evidencia, además, en el número de incautaciones de los precursores, en el análisis de residuos de drogas sintéticas en diferentes matrices y en la detección de nuevos laboratorios para la síntesis de drogas no legales, lo que indica un aumento en la demanda de estas sustancias [175].

El estudio de la actividad comercial de las NSP revela un mercado complejo que cambia rápidamente por muchas razones, principalmente, por motivos sociales y legales que afectan su estabilidad [3]. Parte de esta dinámica se debe a la introducción de nuevas sustancias que actualmente no están bajo ningún control y que pueden comercializarse como alternativas a las drogas ilegales a través de mecanismos de distribución como internet o las redes sociales [5].

Ciertas drogas emergentes se venden libremente porque no están prohibidas de manera oficial. Es común conocer estas sustancias en el mercado como “euforizantes legales” cuya distribución evidencia un estatus de legalidad ambiguo que no se aborda de la misma forma en todos los países [6].

La innovación en la manipulación química de las sustancias psicoactivas ocurre de muchas formas, desde la eliminación o adición de átomos en una molécula ya conocida por sus efectos psicotrópicos, hasta la síntesis química de un producto completamente nuevo [4]. Estos procedimientos aumentan la probabilidad de que las NSP no sean reconocidas por las autoridades y de favorecer su comercialización, tanto en pequeñas cantidades como a mayor escala por los grupos del crimen organizado [2].

En respuesta a los nuevos desafíos que plantea el mercado de las NSP, es fundamental desarrollar métodos analíticos prácticos y más rápidos que puedan aplicarse en el laboratorio o en el campo. Estos procedimientos le permiten a las autoridades tomar acciones oportunas en el análisis forense de drogas y en la incautación de las NSP, lo que resulta en una rápida identificación y cuantificación de drogas legales e ilegales [16].

Para hacer frente a la creciente necesidad de agilizar la generación de datos para el análisis de NSP y al mismo tiempo reducir los costos operativos sin disminuir la sensibilidad del método [176], diferentes grupos de investigación han promovido el uso de técnicas de detección electroquímica como la CV, la DPV, la SWV y la amperometría [156,177]. La electroquímica como una herramienta analítica para la cuantificación de NSP ha recibido una amplia aceptación debido a sus muchas ventajas que incluyen: costos moderados, alta sensibilidad, preparación mínima de la muestra, tiempo cortos de análisis, determinaciones simultáneas de varios analitos y portabilidad instrumental [161,169,178].

La GC-MS y la LC-MS suelen ser las técnicas de análisis para NSP más comunes en los laboratorios químicos forenses. La desventaja de estas plataformas analíticas es que están restringidas a un entorno de laboratorio, por lo que carecen de portabilidad y requieren altos costos de mantenimiento [179]. En contraste, las técnicas electroquímicas son bastante versátiles y se adaptan muy bien tanto a las condiciones de laboratorio como a las de campo para un análisis preliminar de sustancias psicoactivas [88,142].

El desarrollo de electrodos de detección miniaturizados y desechables capaces de analizar microcantidades de un material de prueba y con una generación mínima de residuos, ha abierto nuevas oportunidades dentro de las comunidades forenses y toxicológicas [180]. Así mismo, la poca afectación de los efectos de acumulación presentes en los electrodos sólidos convencionales, aunado a la versatilidad para modificar la superficie de estos electrodos con el propósito de aumentar la sensibilidad y la selectividad de la respuesta analítica de los

dispositivos, lo convierten en una excelente herramienta para la detección de NSP [181–183].

Durante el desarrollo de un experimento electroquímico pueden surgir algunos imprevistos, *e. g.* el depósito de contaminantes insolubles producto de las reacciones químicas en la superficie del electródica y la pasivación del electrodo. Estas limitaciones se minimizan al utilizar electrodos serigrafados o un electrodo de diamante dopado con boro (DDB) empleando un procedimiento de limpieza electroquímico [18]. Para el siguiente trabajo de investigación se utilizaron tres tipos de electrodos de trabajo disponibles comercialmente para estudiar los resultados y los parámetros analíticos.

El método electroquímico desarrollado se aplicó para la detección en saliva de algunas NSP (ver Figura 19) que contienen una amina secundaria en sus estructuras. Se construyó una microcelda casera (100 μL) para el electrodo de DDB y se empleó el análisis en gota (50 μL) para los electrodos serigrafados de carbono y de platino. Se compararon por primera vez los resultados obtenidos por DPV con los tres electrodos de trabajo para estas cuatro drogas sintéticas.

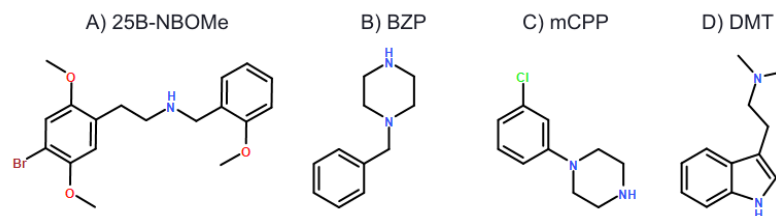
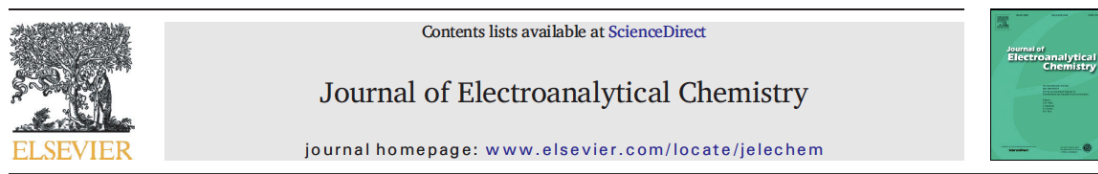


Figura 19 Estructuras químicas de la drogas 25B-NBOMe, BZP, mCPP y DMT.

(a) Alucinógeno sintético de la serie NBOMe. (b) Bencilpiperazina y (c) 1-(3-clorofenil)piperazina son ambas estimulantes sintéticos pertenecientes al grupo de las piperazinas. (d) N,N-dimetiltriptamina es una sustancia alucinógena de la familia de las triptaminas [184].

6.1.3 Publicación científica



Electrochemical determination of novel psychoactive substances by differential pulse voltammetry using a microcell for boron-doped diamond electrode and screen-printed electrodes based on carbon and platinum



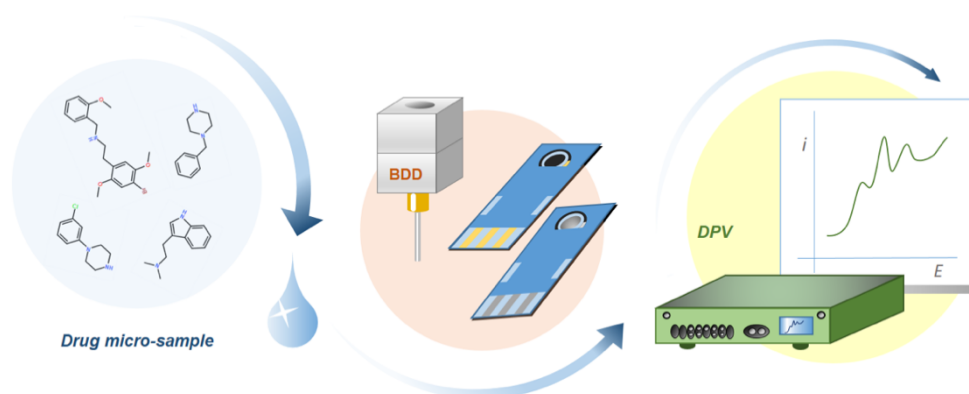
Jerson González-Hernández^{a,b,*}, Ana Lorena Alvarado-Gómez^{a,b}, Luis E. Arroyo-Mora^c, Miriam Barquero-Quirós^{a,b}

^a Centro de Investigación en Electroquímica y Energía Química (CELEQ), Universidad de Costa Rica, San José 11501-2060, Costa Rica

^b Escuela de Química, Universidad de Costa Rica, San José 11501-2060, Costa Rica.

^c Department of Forensic and Investigative Science, West Virginia University, Morgantown, WV 26506, United States of America

Graphical abstract



Highlights

- Electrochemical micro-method developed to analyze novel psychoactive substances.
- Differential pulse voltammetry as a rapid screening technique for drug analysis.
- Homemade microcell designed for housing a boron-doped diamond electrode.
- Screen-printed electrodes based on carbon and platinum for sensing illicit drugs.
- Electro-oxidation of emerging drugs containing one secondary amine group.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Electroanalytical Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jelechem

Electrochemical determination of novel psychoactive substances by differential pulse voltammetry using a microcell for boron-doped diamond electrode and screen-printed electrodes based on carbon and platinum



Jerson González-Hernández^{a,b,*}, Ana Lorena Alvarado-Gámez^{a,b}, Luis E. Arroyo-Mora^c, Miriam Barquero-Quirós^{a,b}

^a Centro de Investigación en Electroquímica y Energía Química (CELEQ), Universidad de Costa Rica, San José 11501-2060, Costa Rica

^b Escuela de Química, Universidad de Costa Rica, San José 11501-2060, Costa Rica.

^c Department of Forensic and Investigative Science, West Virginia University, Morgantown, WV 26506, United States of America

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 August 2020

Received in revised form 7 January 2021

Accepted 7 January 2021

Available online 12 January 2021

Keywords:

Screen-printed electrode

Boron-doped diamond electrode

25B-NBOMe

Benzylpiperazine

1-(3-chlorophenyl)piperazine

N,N-dimethyltryptamine

ABSTRACT

25B-NBOMe, benzylpiperazine (BZP), 1-(3-chlorophenyl)piperazine (mCPP), and *N,N*-dimethyltryptamine (DMT) are potent hallucinogenic and stimulant drugs which have emerged as novel psychoactive substances (NPS). The electroanalytical behavior of these compounds was investigated by differential pulse voltammetry (DPV) on boron-doped diamond (BDD) electrode assembled in a homemade microcell, and disposable screen-printed electrodes based on bare carbon (SP-C) and platinum (SP-Pt). The low-cost micro-method proposed in this paper requires volume ranging from 50 μ L to 100 μ L, minimal sample preparation, and generates very few residues. The electrochemical screening exhibited anodic peaks studied by linear regression of five-point analytical curves ($n = 3$) which allowed for estimating the sensitivity, limits of detection (LOD) and quantification (LOQ), repeatability (S_r), and intermediate precision (S_{RW}). These results translate into methods with high sensitivity, satisfactory precision (range of 1.7% to 9.0%) and low limits of detection (LOD from 0.15 μ g/mL to 1.8 μ g/mL) with analytical value in clinical and forensic techniques. Accuracy and applicability of the voltammetric method was assessed in spiked oral fluid samples by standard additions calibration curves with recovery ranging from 98% to 103%. For the first time, the electrochemical data obtained by DPV on three different working electrodes and the analytical parameters are compared for these NPS.

1. Introduction

The United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC), defines novel psychoactive substances (NPS) as “substances of abuse, either in a pure form or a preparation, that are not controlled by the Convention on Narcotic Drugs or Psychotropic Substances, but which may pose a public health threat” [1].

The last reports of UNODC reflect an increase in the production and distribution of illicit drugs. The large and rising amounts of seized drugs by authorities are not limited only to traditional drugs. Newer and unexpected illicit NPS prepared in clandestine laboratories with unknown quality control pose a growing threat to public health, either due to misuse or abuse of these substances [1].

In early 2020, 120 countries worldwide have reported the emergence of a cumulative total of almost one thousand individual NPS, most of which are synthetic cannabinoids receptor agonists and stimulants, such as phenethylamines and synthetic cathinones [2]. The expansion in NPS production is also evidenced by the seizures of precursors, the analysis of

synthetic drug residues in different matrices and the detection of new illicit drug laboratories, indicating an increase in demand [3].

The study of the supply and demand of NPS has revealed a very complex market which changes very quickly for a variety of reasons, mainly societal and legal, which affect its stability [4]. Part of this dynamic is due to the introduction of the synthesis of new substances that are not currently under control and that can be marketed as alternatives to illegal drugs through new distribution mechanisms such as the internet or social media [5]. These emerging drugs are called “legal highs” because they may be considered legal in some places, thus revealing a legal status that is, in fact, ambiguous and not present in all countries [6].

Innovation in the chemical manipulation of these substances occurs in many ways, from the simple removal or addition of atoms in a molecule already known for its psychotropic effects to the chemical synthesis of a completely new product [7]. These procedures increase the likelihood that the NPS will not be identified by the authorities and therefore, are more easily marketed in both small amounts and on a larger scale by organized crime groups [8].

* Corresponding author at: Centro de Investigación en Electroquímica y Energía Química (CELEQ), Universidad de Costa Rica, San José 11501-2060, Costa Rica.
E-mail addresses: jerson.gonzalez@ucr.ac.cr (J. González-Hernández), miriam.barquero@ucr.ac.cr (M. Barquero-Quirós).

In response to the new challenges posed by the NPS market, it is essential to develop practical and quicker analytical methods which can be applied in the laboratory or in the field. These novel procedures will allow authorities to take timely actions in forensic drug analysis and seizure of NPS, resulting in the rapid identification and quantification of both legal and illegal drugs [9].

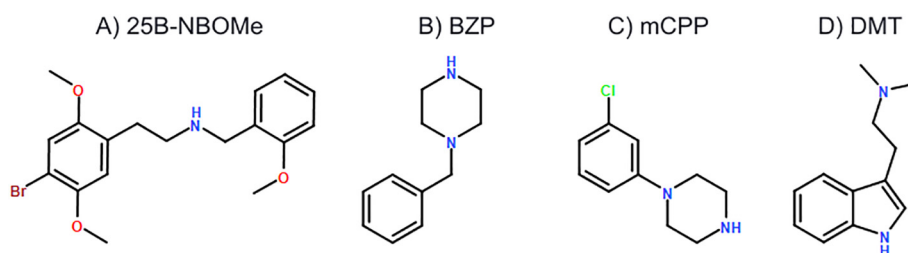
To address the growing need to streamline the data generation for NPS analysis while also reducing operating costs and not decreasing the sensitivity of the method [10], different research groups have promoted the use of electrochemical screening techniques like cyclic voltammetry, differential pulse voltammetry, square wave voltammetry and amperometry [11,12]. The use of electrochemistry as an analytical tool for the quantification of NPS has received wide acceptance because of its many advantages, including: moderate cost, high sensitivity, minimum sample preparation, rapid analysis time, simultaneous determinations of several analytes and portability [13–15].

Typically, gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) and liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS) are the most common NPS analysis techniques in forensic laboratories. The combination of high sensitivity and selectivity makes possible the identification of a large number of organic substances with a reliable confirmation capacity [16]. The disadvantage of these analytical platforms is that they are restricted to a laboratory environment, therefore lacking portability features and requiring high maintenance costs [17].

The electrochemical techniques are quite versatile and adapt very well to laboratory or field conditions for a preliminary screening of target drugs [18,19]. Coupling electrochemical techniques with confirmatory methods such as Raman spectroscopy, allows processing a larger number of samples, reduces costs, and provides better identification criteria [20]. The development of miniaturized sensing devices capable of analyzing microquantities of a testing material, and with minimum waste generation, has opened new opportunities within the forensic and toxicology communities [21]. Also, the lack of memory effects present in solid electrodes and the practical ability to chemically modify the surface of these electrodes to increase the sensitivity and selectivity of the analytical response of the devices, make it an excellent tool for the detection of NPS [22–24].

During the development of an electrochemical experiment some challenges, such as the deposition of insoluble contaminants from chemical reactions on the electrode surface and the solid electrode passivation, may arise. These limitations are overcome when using either disposable screen-printed electrodes or a boron-doped diamond (BDD) electrode, optimizing an electrochemical procedure for cleaning [25]. Consequently, three types of commercially available working electrodes were used to investigate the results and analytical parameters in order to recommend the best method for assessing the applicability for the testing of real samples.

In this work, an electrochemically eco-friendly method applied to the sensing of NPS containing one secondary amine group was developed. It was performed in a homemade microcell (100 μ L) for BDD electrode and drop solution (50 μ L) techniques for screen-printed electrodes based on carbon and platinum. For the first time, the electrochemical results obtained on three different working electrodes by DPV are compared for these illicit drugs under study shown in Scheme 1.



Scheme 1. Chemical structures of the NPS and their trivial names. (A) Synthetic hallucinogen from the NBOMe series, (B) benzylpiperazine and (C) 1-(3-chlorophenyl)piperazine are synthetic stimulants belonging to the piperazine group and (D) *N,N*-dimethyltryptamine is a hallucinogenic substance from the tryptamine group [26].

2. Experimental

2.1. Materials

All chemicals used were of analytical grade without further purification. All solutions were prepared with deionized water of resistivity 18.2 M Ω ·cm supplied by TKA (inverse osmosis with an UV lamp irradiation system).

Britton Robinson buffer (BRB) solutions for screen-printed carbon (SP-C) electrodes determinations were prepared at 0.04 M with H₃BO₃ ($\geq 99.5\%$), H₃PO₄ 85% (ACS reagent) and acetic acid Suprapur® (CH₃COOH, 99.8%) purchased from Merck, Darmstadt, Germany; and the pH was adjusted with NaOH Suprapur® solution (Merck, Darmstadt, Germany). Tetraethylammonium perchlorate (TEAP, (C₂H₅)₄NClO₄, $\geq 99.0\%$, Sigma-Aldrich) 0.02 M in acetonitrile (CH₃CN, Merck, Darmstadt, Germany) was used as the supporting electrolyte for boron-doped diamond (BDD) and screen-printed platinum (SP-Pt) electrodes determinations.

Na₂CO₃·10H₂O and NaHCO₃ (Merck, Darmstadt, Germany) were used for the preparation of 0.10 M carbonate-bicarbonate buffer solution at pH 10.0 adjusted with NaOH Suprapur® solution.

The Analytical Reference Standards of the NPS in methanol solution were supplied by Sigma-Aldrich (Cerilliant®): 2-(4-bromo-2,5-dimethoxyphenyl)-*N*-[(2-methoxyphenyl)methyl]ethanamine HCl (25B-NBOMe), 1-Benzylpiperazine 2HCl (BZP), 1-(3-Chlorophenyl)piperazine HCl (mCPP) and 2-(1H-indol-3-yl)-*N,N*-dimethylethanamine (DMT), also mCPP was supplied in the form of crystalline powder and additionally BZP was synthesized and characterized by Laboratorio de Química Supramolecular, Escuela de Química, Universidad de Costa Rica.

2.2. Instruments and apparatus

Voltammetric measurements were carried out using an electrochemical system Autolab PGSTAT Echo Chemie128 N (Echo Chemie, Utrecht, The Netherlands) controlled by the electrochemistry software Nova v2.1.4.

Experiments were performed utilizing a 3 mm diameter BDD electrode (Windsor Scientific Ltd.) assembled in a glass and polylactide polymer for 3D printing the homemade microcell (Fig. 1, platinum wire and Ag/AgCl wire were used as auxiliary and reference electrodes), SP-C electrodes (DRP-C110 Metrohm, WE carbon, CE carbon and RE Ag/AgCl pseudo-reference electrode) and SP-Pt electrodes (thick film 61,208,510 Metrohm, WE platinum, CE carbon and RE Ag/AgCl pseudo-reference electrode).

A DropSens connector for plastic substrate screen-printed electrodes was used for the measurements. Since non-aqueous solvents were being applied to the platinum electrodes, a DRP-Transcell, purchased from DropSens, was utilized.

The pH values were adjusted with a pH-meter (Mettler Toledo™, Schwerzenbach, Switzerland).

2.3. Electrochemical measurements

The supporting electrolytes tested were BRB, carbonate buffer, and acetonitrile containing TEAP.

The electrochemical parameters were optimized using three different working electrodes under study for the detection of these analytes. The

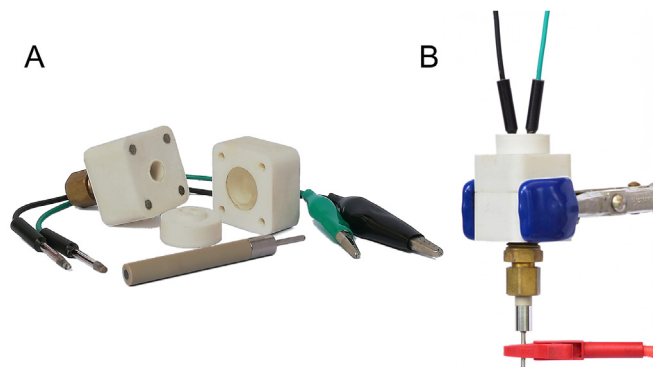


Fig. 1. (A) Homemade microcell, working electrode of BDD, reference electrode of Ag/AgCl (green electrode) and platinum auxiliary electrode. (B) Assembled microcell for measurements on BDD electrode.

sequential variation of the parameters within the selected range led to the selection of the best instrumental conditions: scan potential ($-0.1\text{ V} - 1.8\text{ V}$), interval time ($0.15\text{ s} - 0.5\text{ s}$), modulation amplitude ($40\text{ mV} - 80\text{ mV}$) and scan rate ($10\text{ mV/s} - 100\text{ mV/s}$).

The chemical standards in methanol were evaporated, using either a continuous flow of nitrogen gas or an oven with a controlled temperature of $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ for two hours, and then were dissolved in the corresponding solvent (BRB solution for measurements at SP-C electrodes and acetonitrile for BDD and SP-Pt electrodes).

BDD electrode was manually polished with alumina powder on a nylon pad, followed by rinsing with deionized water. Electrode surface was pretreated galvanostatically in $0.5\text{ M H}_2\text{SO}_4$ with a cathodic pretreatment by applying a current density of 25 mA/cm^2 (1.77 mA) for 120 s followed by an anodic pretreatment by applying -25 mA/cm^2

(-1.77 mA) for 180 s [14]. The differential pulse voltammetry was performed using the following optimized electrochemical parameters: modulation time of 0.05 s , the interval time of 0.2 s , modulation amplitude of 70 mV , step potential of 10.5 mV , and a scan rate of 50 mV/s .

SP-C electrodes analytical determinations were optimized in aqueous solution at different pH values (BRB at pH values of $5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0$ and 10.0). The carbon electrodes were rinsed with 1.0 mL of deionized water. The differential pulse voltammetry analysis was performed using the following optimized electrochemical parameters: modulation time of 0.05 s , the interval time of 0.2 s , modulation amplitude of 60 mV , step potential of 10.5 mV , and a scan rate of 50 mV/s .

SP-Pt electrodes were rinsed with $100\text{ }\mu\text{L}$ of acetonitrile between each measurement. The differential pulse voltammetry analysis was carried out using the following optimized electrochemical parameters: modulation time of 0.05 s , interval time of 0.3 s , modulation amplitude of 60 mV , step potential of 10.5 mV and a scan rate of 35 mV/s .

2.4. Influence of interferences

This study was conducted assuming the same analytes as possible interferences. The binary solutions were prepared at a concentration ratio of $1:1$ (analyte:interference) to investigate the overlapping peaks. A concentration mixture of $5\text{ }\mu\text{g/mL}$ was used for the method using the BDD electrode and $15\text{ }\mu\text{g/mL}$ for the SP-Pt electrodes. The influence of interference on the SP-C electrode was studied at $3\text{ }\mu\text{g/mL}$ and $5\text{ }\mu\text{g/mL}$. Additionally, a mixed solution with the four analytes at the same concentration was also analyzed to evaluate the selectivity of the methods for the target NPS.

2.5. Analysis of spiked samples

Four simulated samples were prepared by spiking drug-free oral fluid from volunteers with the standards (25B-NBOMe, BZP, mCPP or DMT).

Saliva was self-collected by having volunteers spit into a sterile test tube one hour after the last food or drink consumption.

A micro-aliquot from oral fluid was spiked with the standard at $50\text{ }\mu\text{g/mL}$ in BRB at pH 8.0 . Another micro-aliquot of saliva was spiked with only BRB and treated as an analytical blank. The spiked sample at $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ and the blank were crashed with cold acetonitrile at a ratio of $1:1$ and centrifuged at 3500 rev/min for 5 min . The supernatant was separated from the protein pellet and the residual acetonitrile was evaporated using a flow of nitrogen.

The optimized electrochemical procedure by DPV on SP-C electrode was applied to test the simulated samples by standard addition calibration technique and assess the potential use of this method in biological samples.

3. Results and discussion

An electrochemical method is proposed for the analytical determination of four analytes classified as NPS: 25B-NBOMe, BZP, mCPP and DMT as shown in Scheme 1. Differential pulse voltammetry (DPV) was optimized in both aqueous and organic solvents using BDD, SP-C and SP-Pt as working electrodes in microvolume samples ranging from $50\text{ }\mu\text{L}$ to $100\text{ }\mu\text{L}$. The minimal sample sizes make this an eco-friendly technique. The electroanalytical conditions for each electrode were optimized to enhance the peak height current to analyze all compounds of interest in the same supporting electrolyte and electrochemical parameters. The solutions selected were BRB solution for SP-C electrode and acetonitrile containing TEAP for BDD and SP-Pt electrodes due to these solvents having an electrochemical window that allows the four substances to be tested under the same conditions.

The electro-oxidation process of the analytes was investigated by cyclic voltammetry (CV) using the selected medium for the three types of electrodes. The voltammograms in Fig. 2, evidenced an electrochemical non-reversible behavior with anodic peaks for chemical reactions from all target substances on the working electrode surface as reported by other researchers [18,27–29]. The voltammograms recorded on BDD and SP-Pt electrodes are presented in the supplementary information (Fig. S1 and S2). Probably due to the combination of a low sensitivity of the CV technique with a low concentration of the tested NPS, only a non-reversible oxidation wave was observed for BZP on BDD electrode and DMT on SP-Pt electrode, contrary to the two anodic signals suggested by screening using differential pulse voltammetry. The oxidative waves (E_p) for 25B-NBOMe, BZP, mCPP and DMT recorded by CV on the SP-C electrode were 0.74 V , 0.71 V , 0.56 and 0.51 V respectively.

3.1. Sensing on the BDD electrode

Fig. 1A shows the parts of the homemade microcell designed for this research to replace the traditional cell of 5 mL with a system in which the sample size is in the order of microvolume (maximum $100\text{ }\mu\text{L}$). By assembling the microcell as in Fig. 1B, the three electrodes are brought into contact with the liquid sample, which allows the electrochemical determination of the analytes driven by a diffusion process to access the working electrode at the bottom of the microcell. This method has some inherent advantages, such as minimum sample preparation and reduced sample size requirements. Therefore, the chemical residues generated from the tests are minimal compared to the waste produced by using cells with higher volume capacity ($5\text{ mL} - 20\text{ mL}$) for measurements on the BDD electrode.

The electroanalytical determination of the substances was performed in $0.02\text{ M TEAP/CH}_3\text{CN}$ at the anodic potential in the range from $+0.2\text{ V}$ to $+1.8\text{ V}$. These conditions allowed the target species' characterization in which different electrochemical mechanisms are probably involved. These included either the electro-oxidation peak of the secondary amine present in the four analytes' chemical structure or the electro-oxidation peak of the substitution chemical reaction to replace the halide group by the hydroxyl group in the aromatic ring for 25B-NBOMe and mCPP [30,31].

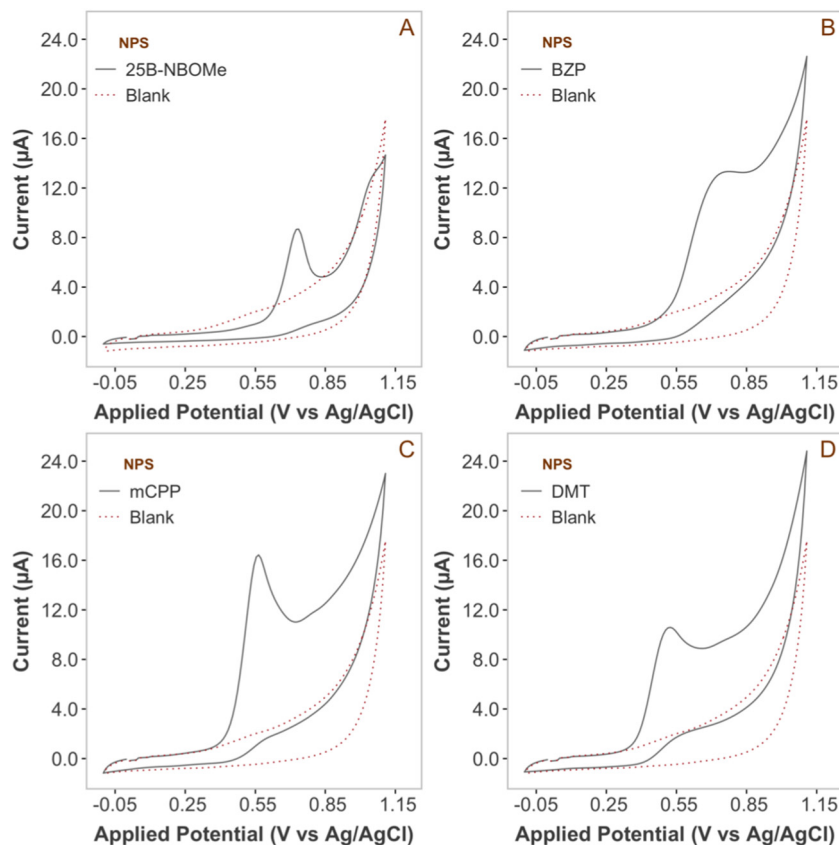


Fig. 2. Cyclic voltammograms profiles for the analytes at 25.0 $\mu\text{g/mL}$ in BRB solution at pH 8.0, recorded using a SP-C electrode. (A) 25B-NBOMe; (B) BZP; (C) mCPP; and (D) DMT. Scan rate: 100 mV/s.

The initial test concentration was from 0.5 $\mu\text{g/mL}$ to 1.0 $\mu\text{g/mL}$ to identify an oxidation signal different from the blank. In the case of BZP, the concentration was increased every 2 $\mu\text{g/mL}$ until obtaining a quantifiable signal ranging from 15.0 $\mu\text{g/mL}$ to 20.0 $\mu\text{g/mL}$. Before conducting any measurements on the BDD electrode, preliminary treatment of its surface was performed. This electrochemical procedure consists of an initial cathodic, and later galvanostatic treatment using 0.5 M H_2SO_4 for cleaning the electrode surface and improving the repeatability of the method [14]. Additionally, the electrode was manually polished at the beginning of each calibration curve with alumina powder on a nylon pad, followed by rinsing with deionized water.

Fig. 3. depicts the curve profile of the voltammograms recorded by DPV at the BDD electrode assembled in the microcell and increasing concentration of 25B-NBOMe (1.0 $\mu\text{g/mL}$ - 5.0 $\mu\text{g/mL}$), BZP (20.0 $\mu\text{g/mL}$ - 40.0 $\mu\text{g/mL}$), mCPP (1.0 $\mu\text{g/mL}$ - 5.0 $\mu\text{g/mL}$) and DMT (1.0 $\mu\text{g/mL}$ - 5.0 $\mu\text{g/mL}$). A five-point analytical curve demonstrates a linear relationship between anodic peak current (I_p) and the standard concentration (C) (see Fig. S3). The investigation of the electro-oxidation process of BZP (Fig. 3B) and mCPP (Fig. 3C) exhibited a second slightly increasing peak (II) shifted to more positive potential (+1.4 V and +1.2 V respectively) which can contribute to the electrochemical identification of piperazines, however, the analytical determination was carried out at peak I (+0.92 V for BZP and +1.05 V for mCPP) in order to get a higher selectivity. Other researchers suggest that the oxidation reaction of piperazines can take place through the tertiary amine [18], therefore the electro-oxidation mechanism could involve two functional groups (secondary and tertiary amine) in two different steps depending on the type of electrode used and the solvent, such as is evidenced in this study.

Based on the BDD electrode results, this method showed good performance for the electro-oxidation of the selected substances. Table 1 summarizes the analytical parameters of each calibration curve on this working electrode. It can be seen that the oxidation potentials are in the range

from +0.92 V to +1.30 V. The highest sensitivity of the method is for DMT and the lowest for BZP based on the slope of the analytical curve, and correlation coefficients $r^2 > 0.990$ confirm the linear dependence.

3.2. Sensing on the SP-C electrode

The experimental conditions for the SP-C electrode were optimized using BRB because the best analytical response signal was obtained in this medium for the standards studied. Fig. 4A demonstrates a linear relationship of oxidation potential (E_p) vs. pH of the buffer, in which the potential is inversely proportional to the pH in the range of 5.0 to 10.0 using DPV [32]. This electrochemical dependence on the pH suggests a redox process governed by the amines rather than other possible groups in the structure of the NPS such as halides or benzene ring. The slopes of the analytical curves tested in triplicate for the 25B-NBOMe (r^2 0.986), BZP (r^2 0.976), mCPP (r^2 0.984) and DMT (r^2 0.993) were -40, -49, -40 and -49 mV by pH unit at 25 $^\circ\text{C}$ respectively. These values were close to the expected theoretical slope of 59 mV by pH unit at 25 $^\circ\text{C}$ [33] for an irreversible oxidation mechanism based on a single proton and electron by analogy to the Nernst equation, a process attributed to the monoelectronic oxidation of the secondary amine present in all drugs studied [30].

Fig. 4B shows the analytical response of the SP-C electrode for a 2.0 $\mu\text{g/mL}$ standard screened at different pH values of BRB. The highest peak current for the substances was obtained at pH values close to the calculated pKa [34] of the NPS tested. For 25B-NBOMe (pKa 8.79), mCPP (pKa 8.87) and DMT (pKa 9.55) the pH with the maximum response peak (I_p) was 8.0, while for BZP (pKa 9.26) it was at pH 9.0, since as the pH increases, the solubility of these compounds decreases, allowing for a more significant interaction with the hydrophobic surface of the carbon electrode.

The measurements on screen-printed electrodes were performed in a drop of 50 μL on the electrode surface. Thus, the analyte contact with the working electrode depended on a diffusion mechanism similar to the

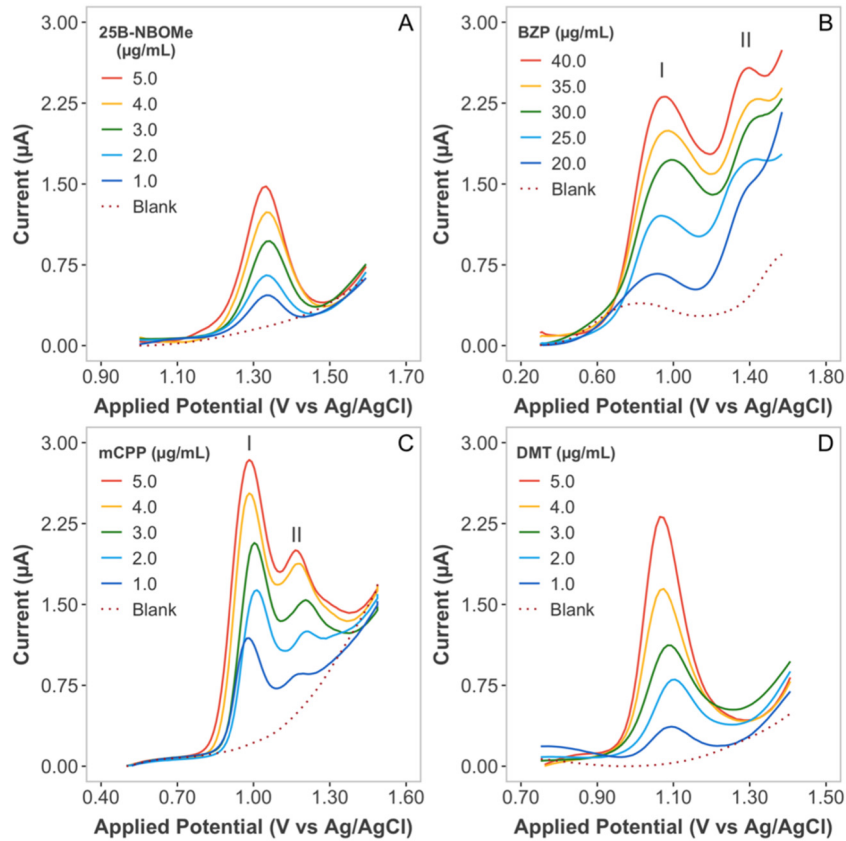


Fig. 3. DPV curve profiles for increasing analytes concentration in 0.02 M TEAP/CH₃CN solution recorded using BDD electrode. (A) 25B-NBOMe; (B) BZP; (C) mCPP; and (D) DMT. Scan rate: 50 mV/s.

Table 1

Analytical parameters for the five-point calibration curve of the analytes in TEAP/CH₃CN on BDD electrode assembled in the microcell by DPV. I_p = peak current (μA), C = concentration ($\mu\text{g/mL}$).

Parameter	25B-NBOMe	BZP	mCPP	DMT
Calibration range ($\mu\text{g/mL}$)	1.0–5.0	20.0–40.0	1.0–5.0	1.0–5.0
Oxidation potential (V)	1.30	0.92	1.05	1.06
Regression equation ($n = 5$)	$I_p = 0.215 \cdot C - 0.064$	$I_p = 0.048 \cdot C - 0.634$	$I_p = 0.320 \cdot C + 0.205$	$I_p = 0.371 \cdot C + 0.006$
Correlation coefficient (r^2)	0.998	0.999	0.996	0.998

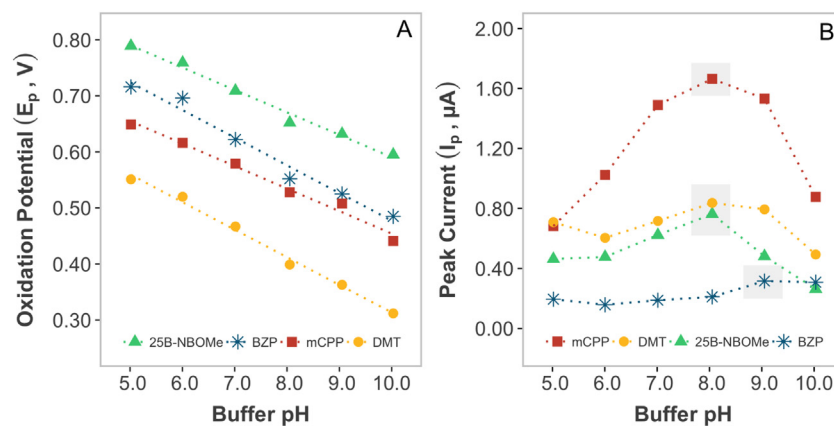


Fig. 4. Relationship between oxidation peak and pH of buffer solution at SP-C electrode. (A) Effect of pH on the oxidation potential (E_p , V) and (B) Effect of pH on the sensor response (I_p), the gray rectangles correspond to the highest peak current and the pH selected for each NPS. Conditions: DPV (scan rate: 50 mV/s), BRB solution and NPS concentration of 2.0 $\mu\text{g/mL}$.

homemade microcell. Notably, the advantage of the drop technique is that a smaller sample size is required than is needed to conduct the measurement at the BDD electrode, which is already a tiny volume (100 μL). Fig. 5 depicts the voltammograms of the curve profiles recorded by DPV at the same SP-C electrode in BRB solution for 25B-NBOMe, mCPP and DMT standards from 1.0 $\mu\text{g/mL}$ to 5.0 $\mu\text{g/mL}$ and BZP standard of 2.0 $\mu\text{g/mL}$ to 10.0 $\mu\text{g/mL}$, demonstrating a linear relationship between analytical response vs. concentration (see Fig. S4).

The electroanalytical determinations on carbon electrode in aqueous medium exhibited oxidation peaks shifted to less positive potentials that ranged from +0.39 V to +0.66 V (Table 2) compared to those recorded at the BDD electrode or those potentials previously reported in the literature for these same drugs using similar techniques or conditions [18,28,29,31]. The added advantage of working at higher pH values, as observed in Fig. 4, is that there is a lower probability of oxidizing interfering substances. The highest sensitivity of the method was obtained for mCPP, and the lowest was for BZP, as we observed on BDD electrode; for this reason, the concentration range for this analyte was increased for quantitative determinations. However, when comparing the general results of both electrodes, the carbon electrode method showed to be more sensitive and easier to carry out because, after measuring a calibration curve, the SP-C electrode is discarded. Additionally, this method is more versatile, allowing it to adapt better for future analysis in the field.

3.3. Sensing on the SP-Pt electrode

Electrochemical screening on SP-Pt electrode, as well as on the BDD electrode, was performed at 0.02 M TEAP/ CH_3CN but at higher concentrations than on BDD and SP-C electrodes. The corresponding voltammograms shown in Fig. 6 were obtained in the following ranges of increasing drug

concentrations: 25B-NBOMe 5.0 $\mu\text{g/mL}$ - 15.0 $\mu\text{g/mL}$, BZP 15.0 $\mu\text{g/mL}$ - 35.0 $\mu\text{g/mL}$, mCPP 7.5 $\mu\text{g/mL}$ - 20.0 $\mu\text{g/mL}$ and DMT 5 $\mu\text{g/mL}$ - 25 $\mu\text{g/mL}$. A double anodic oxidation peak was observed for DMT (Fig. 6D), therefore, for analytical determination, the highest peak was measured (II), which corresponds to the most positive potential. The same electrochemical appearance was slightly observed in the oxidation of mCPP and BZP but at low concentrations. The chemical structure of these three psychotropic substances share in common two amino groups which are prone to the oxidative applied potential. In this way, as previously explained, the oxidation mechanism could take place through two different routes generating two anodic waves. A platinum electrode SP-Pt per calibration curve (see Fig. S5) was used; it was rinsed with acetonitrile between measurements and verified that there were no absorbed residues on the surface electrode measuring blanks.

Compared with the results on the SP-C electrode, the slopes of the linear regression of the curves (Table 3) are smaller values, demonstrating that the electrochemical method based on the SP-Pt electrode is less sensitive for all the analytes than the method on the carbon electrode. Moreover, it is less sensitive for BZP, mCPP and DMT than on the BDD electrode. The oxidation peaks on platinum electrode are shown shifted to the most positive potentials (between +1.15 V and +1.44 V) compared to the records on BDD and SP-C electrodes as was observed in Tables 1 and 2.

Working and counter electrodes made of carbon ink or carbon are prone to substances' adsorption in different media because the analyte solution is not stirred; thus, the mass transfer is performed by a diffusion process. When the interface is reached, the concentration's analyte increases through adsorption on organic carbon film. This explains a higher current for SP-C than for SP-Pt, as well as a higher sensitivity. Oxidation potentials are higher for the SP-Pt electrode due to overpotential oxidation associated with non-aqueous solutions on the metallic platinum electrodes. Usually,

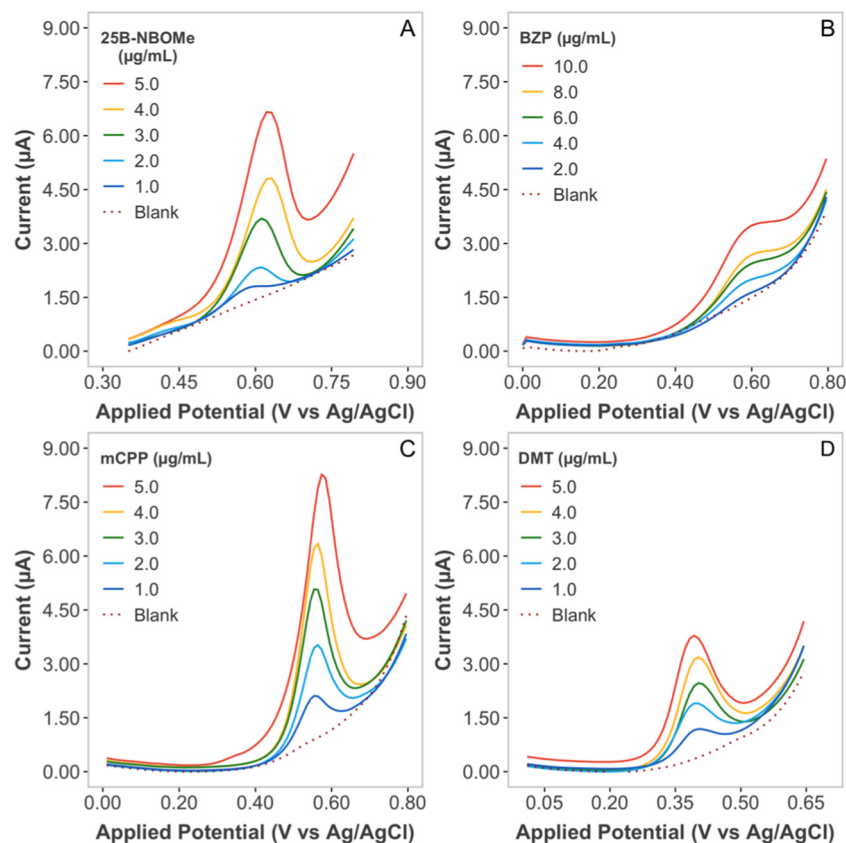
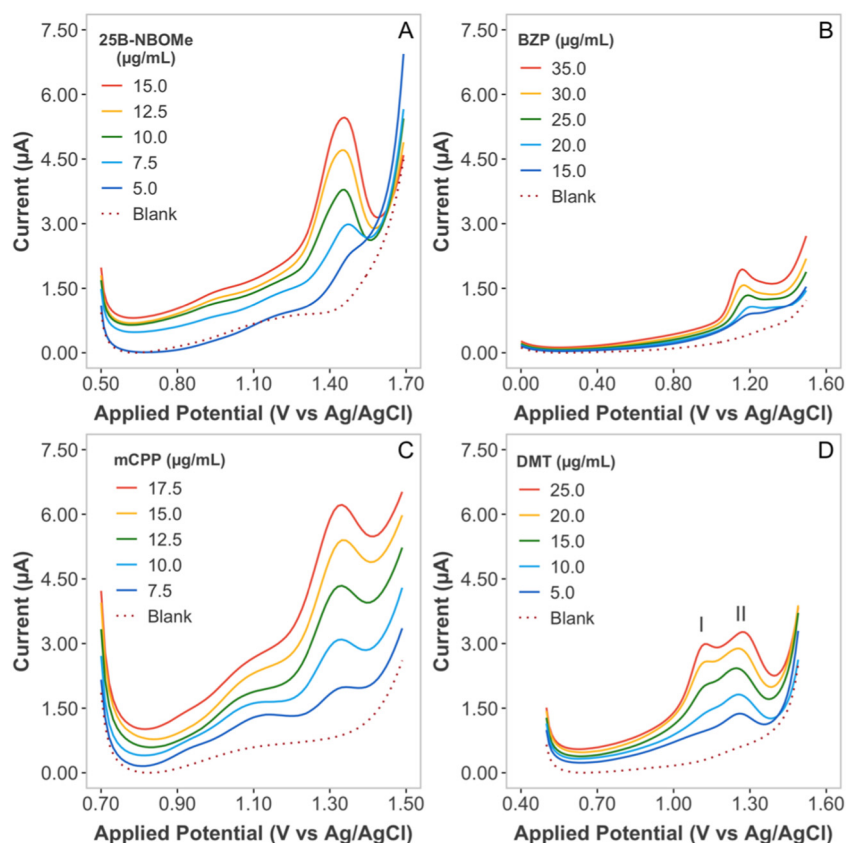


Fig. 5. DPV curve profiles for increasing analytes concentration in BRB solution recorded using a SP-C electrode. (A) 25B-NBOMe at pH 8.0; (B) BZP at pH 9.0; (C) mCPP at pH 8.0; and (D) DMT at pH 8.0. Scan rate: 50 mV/s.

Table 2Analytical parameters for the five-point calibration graph of the analytes in BRB on disposable SP-C electrodes by DPV. I_p = peak current (μA), C = concentration ($\mu\text{g/mL}$).

Parameter	25B-NBOMe	BZP	mCPP	DMT
Calibration range ($\mu\text{g/mL}$)	1.0–5.0	2.0–10.0	1.0–5.0	1.0–5.0
Oxidation potential (V)	0.66	0.58	0.51	0.39
Regression equation ($n = 5$)	$I_p = 0.317 \cdot C - 0.164$	$I_p = 0.133 \cdot C - 0.162$	$I_p = 0.774 \cdot C - 0.265$	$I_p = 0.565 \cdot C + 0.033$
Correlation coefficient (r^2)	0.994	0.999	1.000	0.998

**Fig. 6.** DPV curve profiles for increasing analyte concentration in 0.02 M TEAP/ CH_3CN solution recorded using a SP-Pt electrode. (A) 25B-NBOMe; (B) BZP; (C) mCPP; and (D) DMT. Scan rate: 35 mV/s.

potentials are lowered with binary or ternary alloys that increase the analyte coverage on platinum electrodes but not in the case of screen-printed electrodes.

3.4. Analytical evaluation parameters

The analytical performance of the method using three different electrodes for four analytes was assessed in terms of sensitivity, selectivity, limit of detection (LOD), quantification limit (LOQ), repeatability,

reproducibility, and recovery coefficient for SP-C electrode. The methods were validated in the lowest possible calibration range to detect analytes in samples of very low concentrations, while at the same time avoiding the electrodes saturation. The electroanalytical data for the methods with different electrodes were studied by statistical evaluation of the linear regression curves to obtain the parameters and analytical characteristics summarized in Table 4. Sensitivity was assessed by the electrochemical response factor as the peak current height divided by the concentration of the analyte. A solution standard in the middle of the calibration range

Table 3Analytical parameters for the five-point calibration graph of the analytes in TEAP/ CH_3CN on disposable SP-Pt electrodes by DPV. I_p = peak current (μA), C = concentration ($\mu\text{g/mL}$).

Parameter	25B-NBOMe	BZP	mCPP	DMT
Calibration range ($\mu\text{g/mL}$)	5.0–15.0	15.0–35.0	5.0–20.0	5.0–25.0
Oxidation potential (V)	1.44	1.15	1.30	1.27
Regression equation ($n = 5$)	$I_p = 0.210 \cdot C - 0.607$	$I_p = 0.029 \cdot C - 0.273$	$I_p = 0.158 \cdot C + 0.861$	$I_p = 0.050 \cdot C + 0.044$
Correlation coefficient (r^2)	0.995	0.995	0.995	0.995

Table 4
Comparison of analytical parameters for the electrochemical determination of NPS on three different working electrodes by differential pulse voltammetry, $n = 3$.

NPS	Analytical parameter	BDD (TEAP/CH ₃ CN)	SP-C (BRB)	SP-Pt (TEAP/CH ₃ CN)
25B-NBOMe	Response factor ($\mu\text{A}\cdot\text{mL}/\mu\text{g}$)	0.21	0.25	0.17
	LOD ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.24	0.44	0.76
	LOQ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.81	1.5	2.5
	Repeatability (S_r)	2.0%	5.0%	8.2%
	Within-lab reproducibility (S_{RW})	3.6%	8.8%	17%
BZP	Response factor ($\mu\text{A}\cdot\text{mL}/\mu\text{g}$)	0.03	0.11	0.02
	LOD ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.77	0.61	1.3
	LOQ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	2.6	2.0	4.4
	Repeatability (S_r)	3.6%	2.7%	3.6%
	Within-lab reproducibility (S_{RW})	8.3%	8.1%	14%
mCPP	Response factor ($\mu\text{A}\cdot\text{mL}/\mu\text{g}$)	0.37	0.82	0.13
	LOD ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.27	0.15	1.1
	LOQ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.91	0.49	3.8
	Repeatability (S_r)	1.7%	7.4%	3.9%
	Within-lab reproducibility (S_r)	1.3%	8.4%	6.0%
DMT	Response factor ($\mu\text{A}\cdot\text{mL}/\mu\text{g}$)	0.35	0.56	0.06
	LOD ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.38	0.33	1.8
	LOQ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	1.3	1.1	5.9
	Repeatability (S_r)	2.8%	6.4%	9.0%
	Within-lab reproducibility (S_{RW})	4.7%	4.5%	16%

was used for this measurement. The method based on SP-C electrode exhibited the highest sensitivity (from 0.11 $\mu\text{A}\cdot\text{mL}/\mu\text{g}$ to 0.82 $\mu\text{A}\cdot\text{mL}/\mu\text{g}$) toward all target analytes while platinum electrode showed the lower sensitivity (SP-C > BDD > SP-Pt) under optimized analysis conditions.

The LOD was estimated at three times the standard deviation of the linear regression divided by the slope of the linear curve ($3\sigma/S$, $n = 3$) and the LOQ was calculated as ten times the standard deviation over the slope of the linear curve ($10\sigma/S$, $n = 3$). The method based on carbon electrode SP-C exhibited the lowest LOD range of 0.15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to 0.61 $\mu\text{g}/\text{mL}$ followed by the BDD electrode with LOD from 0.24 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to 0.77 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and finally

the platinum electrode SP-Pt with the highest values (0.76 $\mu\text{g}/\text{mL}$ - 1.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

The precision of the method was assessed in terms of repeatability (S_r) and intermediate precision (within-lab reproducibility, S_{RW}) reported as standard relative deviation (RSD, %). The S_r was calculated from the RSD of the slopes of three five-point analytical curves measured on the same electrode, within the same day of analysis and under the same optimal measurement conditions. In comparison, the S_{RW} was estimated from the RSD of three analytical curves measured on different electrodes (for SP-C and SP-Pt electrodes) at different measurement days. The data in Table 4 show that the developed methods have a reliable precision, BDD ($S_r \leq 3.6\%$), SP-C ($S_r \leq 7.4\%$) and SP-Pt ($S_r \leq 9.0\%$); however, to obtain better results in periods of analysis of several days, the use of BDD ($S_{RW} \leq 8.3\%$) and SP-C ($S_{RW} \leq 8.8\%$) over SP-Pt ($S_{RW} 17\%$) is recommended.

The average detection limits found in this work are in the same order or even lower than the limits of other similar electrochemical methods, as shown in Table 5. The combination of these methods with the lower LOD values, could be sufficient to analyze some of these substances in urine samples based on the range of concentration reported previously in the literature (BZP 4.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ - 429 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [35,36], mCPP 0.22 $\mu\text{g}/\text{mL}$ - 0.78 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [37,38] and DMT 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ - 7.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [28]) or even in other matrix such oral fluid which demonstrates a potential value in clinical and forensic toxicology procedures.

3.5. Influence of interference

For the purpose of conducting this study, mixtures of the same analytes were considered as possible interferents since it is common to find these mixed drugs for human consumption [40], and could be difficult to identify the right substance because of the oxidation potentials of secondary amines could overlap.

Table 6 summarizes the results of interference studies per method considering one potential interferent at a time. The electrochemical technique based on BDD electrode was selective for detecting mCPP in the presence of all three interferents. This is possible because this substance has two oxidation peaks and one of them is always detected. In contrast, BZP was detected only in the binary solution with DMT, probably because the technique is less sensitive for this compound and at 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ it was either not detected or it overlapped with the interferent signal. DMT was detected in the presence of 25B-NBOMe and BZP, but with mCPP, the signal is

Table 5

Comparison of limit of detection (LOD) estimated in this study to other electrochemical methods recently reported in the literature. SWV: square wave voltammetry, DPV: differential pulse voltammetry, BDD: boron-doped diamond, SP-C: screen-printed carbon, SP-Pt: screen-printed platinum, CPE: carbon paste electrode, PMBS: Polymeric membrane-based sensor, GC/BMIMNTF₂/ZnTRP: glassy carbon electrode modified with ionic liquid and tetra-ruthenated zinc porphyrin, PBS: phosphate buffer solution, BRB: Britton Robinson buffer and TEAP: tetraethylammonium perchlorate.

NPS	Method	Working electrode	Medium	LOD ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Reference
25B-NBOMe	SWV	BDD	Acetate buffer pH 9.5	0.04	[31]
	DPV	SP-C	PBS pH 7.0	11	[27]
	DPV	BDD	CH ₃ CN/TEAP	0.24	This work
	DPV	SP-C	BRB pH 8.0	0.44	This work
	DPV	SP-Pt	CH ₃ CN/TEAP	0.76	This work
BZP	SWV	CPE	BRB pH 9.5	1.0	[18]
	DPV	BDD	CH ₃ CN/TEAP	0.77	This work
	DPV	SP-C	BRB pH 9.0	0.61	This work
	DPV	SP-Pt	CH ₃ CN/TEAP	1.3	This work
	DPV	BDD	BRB pH 10	0.22	[29]
mCPP	Potentiometric	PMBS	Tris-HCl pH 7.0	0.10	[39]
	DPV	BDD	CH ₃ CN/TEAP	0.27	This work
	DPV	SP-C	BRB pH 8.0	0.15	This work
	DPV	SP-Pt	CH ₃ CN/TEAP	1.1	This work
	DMT	DPV	GC/BMIMNTF ₂ /ZnTRP	NaClO ₄ pH 6.0	0.33
DPV		BDD	CH ₃ CN/TEAP	0.38	This work
DPV		SP-C	BRB pH 8.0	0.33	This work
DPV		SP-Pt	CH ₃ CN/TEAP	1.8	This work

Table 6

Interference study based on the detection of the NPS oxidation signal at concentration ratio 1:1 for the three optimized electrochemical methods. (+) = detected, (–) = undetected and (*) = merged.

NPS	Interferent	NPS electrochemical signal		
		BDD (5.0 µg/mL)	SP-C (5.0 µg/mL)	SP-Pt (15.0 µg/mL)
25B-NBOMe	BZP	+	+	+
	mCPP	–	+	–
	DMT	–	+	–
BZP	25B-NBOMe	–	–	–
	mCPP	–	–	–
	DMT	+	–	*
mCPP	25B-NBOMe	+	+	+
	BZP	Peak II +	+	+
	DMT	Peak I +	+	*
DMT	25B-NBOMe	+	+	+
	BZP	+	+	Peak I +
	mCPP	*	+	*

overlapped with peak II of the interferent. In the case of 25B-NBOMe, it was detected only in the presence of BZP.

For the platinum electrode, as observed on the BDD electrode, BZP did not interfere in the other substance's determination at a concentration ratio of 1:1 (15 g/mL). Using this method, the highest number of overlapping peaks was found for oxidation signals. As such, peak II of DMT overlapped with the BZP signal and analysis of the DMT and mCPP showed a single oxidation signal for the two compounds.

The results in Table 6 for SP-C electrode demonstrated the lack of interference between 25B-NBOMe, mCPP and DMT. For BZP determination, it was found that this compound cannot be identified in a mixed solution with one of the other three drugs. Still, in a mixture of two or three substances of 25B-NBOMe, mCPP or DMT the method at SP-C electrode is selective enough to identify and quantify all the compounds individually (Fig. 7).

Consequently, whereas electrochemical techniques can simultaneously achieve the distinction of three NPS, it is not possible to differentiate the oxidation peak for BZP in binary solution; a single peak is observed in the voltammogram due to the oxidation of the two analytes. However, this method based on SP-C electrode is a very useful tool for detection purposes before the laboratory's confirmatory analysis.

A mixed solution of the four standards studied was prepared at 3.0 µg/mL and 5.0 µg/mL in BRB at pH 8.0 to be screened by DPV in order to study possible interfering effects between these compounds in a mixture and assess the selectivity of the method. Since the oxidation potentials recorded on this type of electrode are more separated from each other and also shifted toward less positive potentials as observed in Table 2,

analytes are more likely to be identified and quantified due to minimal interference problems. Fig. 7 shows the electrochemical profile of the voltammogram obtained by DPV in which the oxidation peaks for 25B-NBOMe, mCPP and DMT are clearly distinguished.

The mixed solutions of the four NPS were also analyzed by the other two methods. A single oxidation signal was recorded at SP-Pt electrode and it was not possible to observe an oxidation peak using the BDD electrode due to the saturation at the working electrode surface. The results of these voltammograms provide evidence that the electrochemical technique at SP-C electrode is the most selective of the three methods proposed in this work.

3.6. NPS determination in spiked oral fluid samples

In order to check the method's efficacy and applicability in real samples, the method using the SP-C electrode was chosen to test the simulated samples in oral fluid based on the performance parameters for the analytical methods. Drug analysis in this promising matrix could be applied in on-site tests to provide quick, accurate, and reliable information as has been done so far in urine or serum [41].

Spiked saliva samples were treated to crush the proteins and then were tested by the standard addition quantitative technique using the optimized DPV method for the four target analytes. An aliquot of the oral fluid matrix at 10 µg/mL was placed into five microtubes for a diluted concentration of 1.0 µg/mL for 25B-NBOMe, mCPP and DMT and 2.0 µg/mL for BZP. Subsequently, a standard curve was generated by adding successive additions of the target analyte into each sample followed by diluting to a final volume of 50 µL with BRB at pH 8.0. The measure of the increasing response resulting from DMT is shown in Fig. 8. The voltammograms and calibration curves for the other NPS are shown in the supplementary information (Fig. S6).

In the resulted voltammograms of the tested spiked samples, a slight positive shift in the oxidation potential (approximately 0.1 V) was observed due to the matrix' effects, however, to identify and quantify the analytes, these effects are minimized by conducting the standardization in the samples.

The analysis of simulated samples was performed in triplicate for each analyte under optimized conditions. The accuracy achieved by this method was good and satisfactory as shown in Table 7, where recoveries ranged from 98% to 103% and the precision (RSD) of these determinations was ≤ 9%.

The results obtained in spiked samples, using the proposed analysis method, demonstrate both the applicability and the feasibility of this method in the determination of NPS. It proves to be an effective and rapid screening test of clinical samples of oral fluid and could be applied to future research in the analysis of urine samples.

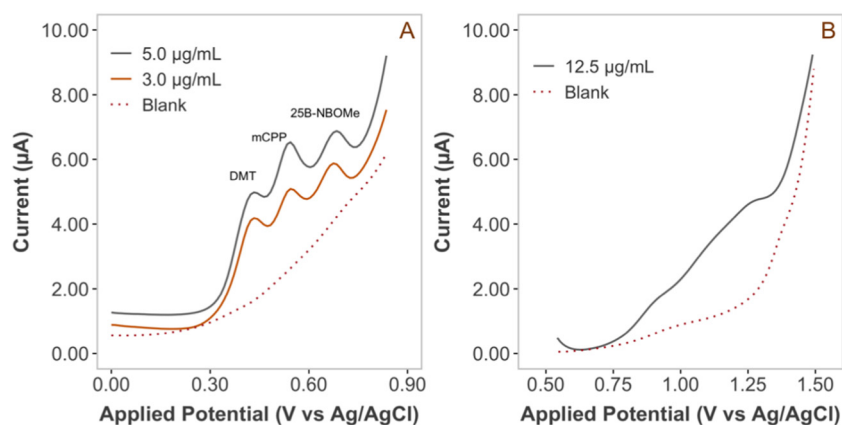


Fig. 7. DPV profile for a mixed solution of 25B-NBOMe, BZP, mCPP and DMT. (A) Voltammogram at 3.0 µg/mL (brown line) and 5.0 µg/mL (gray line) in BRB solution at pH 8.0 using a SP-C electrode, scan rate: 50 mV/s, and (B) Voltammogram at 12.5 µg/mL in 0.02 M TEAP/CH₃CN solution using a SP-Pt electrode, scan rate: 35 mV/s.

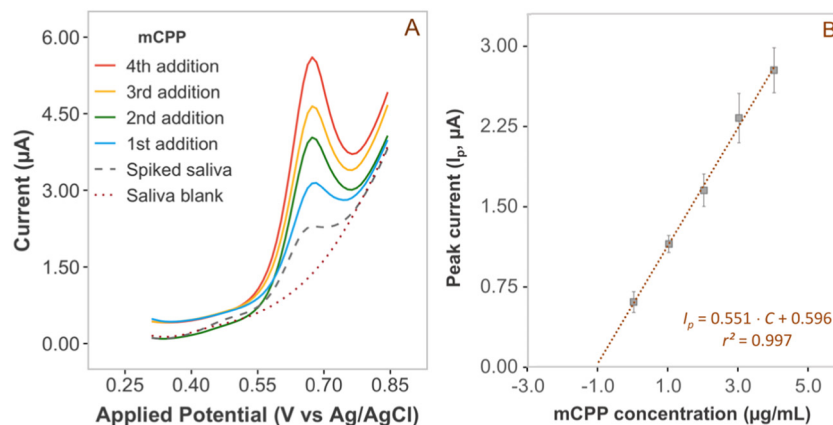


Fig. 8. Determination of mCPP in spiked oral fluid sample. (A) DPV curve profile for increasing standard additions recorded using a SP-C electrode, and (B) Standard additions calibration curve in the form of oxidation peak current vs analyte concentration.

Table 7

Analysis of spiked oral fluid samples by DPV on SP-C using the standard addition method. Calculated concentrations are reported as mean \pm SD ($n = 3$).

NPS	Concentration added (µg/mL)	Oxidation potential (V)	Measured concentration (µg/mL)	RSD (%)	Recovery coefficient (%)
25B-NBOMe	1.00	0.75	1.005 \pm 0.030	3	100
BZP	2.00	0.68	1.99 \pm 0.16	8	100
mCPP	1.00	0.62	0.979 \pm 0.092	9	98
DMT	1.00	0.53	1.03 \pm 0.10	9	103

4. Conclusions

The electrochemical micro-method developed to analyze new psychotropic substances (NPS) by three different working electrodes, BDD, SP-C and SP-Pt, is cost-effective, requires minimal sample preparation and generates fewer chemical residues.

The results revealed a satisfactory precision and high sensitivity for the three methods that translate into low detection and quantification limits, enhancing the application of this electrochemical analysis technique as a complementary tool for the conventional analytical methods in the screening of seized drugs.

It is possible to identify and quantify three of the psychotropic substances studied (25B-NBOMe, mCPP, and DMT) simultaneously in a mixed solution on an SP-C electrode as a rapid screening technique due to the high selectivity of this method.

For the first time, these three methods are compared for 25B-NBOMe, BZP, mCPP, and DMT. Although reliable results were obtained for the three types of electrodes, the SP-C electrode is recommended for several reasons: the oxidation potentials are shifted to less positive values, allowing it to work in an aqueous medium; it has the lowest range of LOD; it is highly selective even in the presence of other similar drugs, and the electrodes are disposable, making the procedure much easier to be applied. Finally, the method based on the carbon electrode is more sensitive, precise, selective, and cheaper than the other two electrodes.

Because of the demonstrated feasibility and applicability of the electrochemical method in spiked oral fluid samples, this method could be very useful in the determination of NPS in biological samples, both in the field and in the lab.

Declaration of Competing Interest

There are no conflicts of interest to declare that could have influenced the work reported in this paper.

Acknowledgements

The authors would like to thank Laboratorio de Química Supramolecular, Escuela de Química, Universidad de Costa Rica for the synthesis and characterization of BZP, Mario Molina for designing and assembling the microcell for measurements on boron-doped diamond electrode and Guillermo Moya for his valuable work in the laboratory.

Also, the authors thankfully acknowledge the financial support of the Centro de Investigación en Electroquímica y Energía Química (CELEQ) and Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica (project N° 804-B8-263).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2021.114994>.

References

- [1] UNODC, World Drug Report 2019, 2019. doi:10.18356/bdc264f4-en.
- [2] UNODC, Current NPS Threats, https://www.unodc.org/documents/scientific/Current_NPS_Threats_Volume_II_Web.pdf 2020.
- [3] S. Castiglioni, Assessing illicit drugs in wastewater: advances in wastewater-based drug, epidemiology (2016) <https://doi.org/10.2810/017397>.
- [4] R. Gittins, A. Guirgis, F. Schifano, I. Maidment, Exploration of the use of new psychoactive substances by individuals in treatment for substance misuse in the UK, *Brain Sci.* 8 (2018) 1–20, <https://doi.org/10.3390/brainsci8040058>.
- [5] O. Carmichael, S. Lockhart, The growing problem of new psychoactive substances (NPS), *Brain Imaging Behav. Neurosci.* (2017) 289–320, <https://doi.org/10.1007/7854>.
- [6] M. Mignone, O. Ingrassi, A. Colombo, A. Robins, Recognizing and identifying NPS for enforcement and forensic purposes, *Torri di Quartesolo*, 2016 https://www.npsproject.eu/wp-content/uploads/2017/03/NPS_Final_Forensic_web.pdf.
- [7] O. Cottencin, B. Rolland, L. Karila, New designer drugs (synthetic cannabinoids and synthetic Cathinones): review of literature, *Curr. Pharm. Des.* 20 (2014) 4106–4111, <https://doi.org/10.2174/13816128113199990622>.
- [8] EMCDDA, European Drug Report, Trends and developments, 2019, 2019 <https://doi.org/10.1097/JSM.0b013e31802b4fda>.
- [9] L. Harper, J. Powell, E.M. Pijl, An overview of forensic drug testing methods and their suitability for harm reduction point-of-care services, *Harm Reduct. J.* 14 (2017) <https://doi.org/10.1186/s12954-017-0179-5>.
- [10] C.A. Bartlett, S. Taylor, C. Fernandez, C. Wanklyn, D. Burton, E. Enston, A. Raniczkowska, M. Black, L. Murphy, Disposable screen printed sensor for the electrochemical detection of methamphetamine in undiluted saliva, *Chem. Cent. J.* 10 (2016) 1–11, <https://doi.org/10.1186/s13065-016-0147-2>.
- [11] S.A. Goodchild, L.J. Hubble, R.K. Mishra, Z. Li, K.Y. Goud, A. Barfidokht, R. Shah, K.S. Bagot, A.J.S. McIntosh, J. Wang, Ionic Liquid-Modified Disposable Electrochemical Sensor Strip for Analysis of Fentanyl, *Anal. Chem.* 91 (2019) 3747–3753, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b00176>.
- [12] H.M. Elbardsy, C.W. Foster, L. Cumba, L.H. Antonides, N. Gilbert, C.J. Schofield, T.S. Belal, W. Talaat, O.B. Sutcliffe, H.G. Daabees, C.E. Banks, Analytical determination of heroin, fentanyl and fentalogues using high-performance liquid chromatography with

- diode array and amperometric detection, *Anal. Methods* 11 (2019) 1053–1063, <https://doi.org/10.1039/c9ay00009g>.
- [13] Q. Xu, A. Yuan, R. Zhang, X. Bian, D. Chen, X. Hu, Application of electrochemical methods for pharmaceutical and drug analysis, *Curr. Pharm. Anal.* 5 (2009) 144–155, <https://doi.org/10.2174/157341209788172889>.
- [14] M. Dronova, E. Smolianitski, O. Lev, Electrooxidation of new synthetic cannabinoids: Voltammetric determination of drugs in seized street samples and artificial saliva, *Anal. Chem.* 88 (2016) 4487–4494, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b00368>.
- [15] C.E. Ott, H. Cunha-Silva, S.L. Kuberski, J.A. Cox, M.J. Arcos-Martínez, L.E. Arroyo-Mora, Electrochemical detection of fentanyl with screen-printed carbon electrodes using square-wave adsorptive stripping voltammetry for forensic applications, *J. Electroanal. Chem.* 873 (2020) 114425, <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2020.114425>.
- [16] M. Akutsu, K. Ichi Sugie, K. Saito, analysis of 62 synthetic cannabinoids by gas chromatography–mass spectrometry with photoionization, *Forensic Toxicol.* 35 (2016) 1–10, <https://doi.org/10.1007/s11419-016-0342-9>.
- [17] J.P. Smith, O.B. Sutcliffe, C.E. Banks, An overview of recent developments in the analytical detection of new psychoactive substances (NPSs), *Analyst.* 140 (2015) 4932–4948, <https://doi.org/10.1039/c5an00797f>.
- [18] S.A. Waddell, C. Fernandez, C.C. Inverarity, R. Prabhu, Extending the capability of forensic electrochemistry to the novel psychoactive substance benzylpiperazine, *Sens. Bio-Sensing Res.* 13 (2017) 28–39, <https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2016.12.001>.
- [19] Z. Taleat, A. Khoshroo, M. Mazloum-Ardakani, Screen-printed electrodes for biosensing: a review (2008–2013), *Microchim. Acta* 181 (2014) 865–891, <https://doi.org/10.1007/s00604-014-1181-1>.
- [20] J. Garoz-Ruiz, J.V. Perales-Rondon, A. Heras, A. Colina, Spectroelectrochemical Sensing: Current Trends and Challenges, *Electroanalysis* 31 (2019) 1254–1278, <https://doi.org/10.1002/elan.201900075>.
- [21] A.N. Lad, A. Pandya, Y.K. Agrawal, Overview of nano-enabled screening of drug-facilitated crime: a promising tool in forensic investigation, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 80 (2016) 458–470, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.07.016>.
- [22] D. Antuña-Jiménez, M.B. González-García, D. Hernández-Santos, P. Fanjul-Bolado, Screen-printed electrodes modified with metal nanoparticles for small molecule sensing, *Biosensors* 10 (2020) 1–22, <https://doi.org/10.3390/bios10020009>.
- [23] G.B. Slepchenko, T.M. Gindullina, S.V. Nekhoroshev, Capabilities of the electrochemical methods in the determination of narcotic and psychotropic drugs in forensic chemistry materials, *J. Anal. Chem.* 72 (2017) 703–709, <https://doi.org/10.1134/S1061934817070127>.
- [24] M. Klimuntowski, M.M. Alam, G. Singh, M.M.R. Howlader, Electrochemical Sensing of Cannabinoids in Biofluids: A Noninvasive Tool for Drug Detection, *ACS Sensors* (2020) <https://doi.org/10.1021/acssensors.9b02390>.
- [25] E.M. Richter, A.L. Squizzato, R.A.A. Munoz, C.E. Banks, An overview of recent electroanalytical applications of utilizing screen-printed electrodes within flow systems, *ChemElectroChem.* (2020) <https://doi.org/10.1002/celec.202000175>.
- [26] UNODC, Terminology and Information on Drugs, Third, United Nations Publication, New York, USA, 2016 <https://doi.org/10.18356/0f5bdc21-en>.
- [27] A.F.B. Andrade, S.K. Mamo, J. Gonzalez-Rodriguez, Rapid screening method for new psychoactive substances of forensic interest: electrochemistry and analytical determination of phenethylamines derivatives (NBOMe) via cyclic and differential pulse voltammetry, *Anal. Chem.* 89 (2016) 1445–1452, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b02426>.
- [28] G. Plaza, B. Piña, H. Herrera, K. Calfuman, Electrochemical determination of N,N-dimethyltryptamine in water based on tetraethenated porphyrins and ionic liquid modified electrodes, *J. Chil. Chem. Soc.* 65 (2020) 4668–4671, <https://doi.org/10.4067/S0717-97072020000104668>.
- [29] L.R. Rocha, J. de Cássica Mendonça, T. Boareto Capelari, R. Antigo Medeiros, C.R. Teixeira Tarley, Development of a reliable and selective voltammetric method for determination of designer drug 1-(3-chlorophenyl)piperazine (mCPP) using boron-doped diamond electrode and exploiting surfactant-mediated measurements, *Sensors Actuators, B Chem.* 310 (2020) <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.127812>.
- [30] A. Adenier, M.M. Chehimi, I. Gallardo, J. Pinson, N. Vilà, Electrochemical oxidation of aliphatic amines and their attachment to carbon and metal surfaces, *Langmuir* 20 (2004) 8243–8253, <https://doi.org/10.1021/la049194c>.
- [31] G.A. Souza, D.M. Pimentel, A.B. Lima, T.J. Guedes, L.C. Arantes, A.C. De Oliveira, R.M.F. Sousa, R.A.A. Muñoz, W.T.P. Dos Santos, Electrochemical sensing of NBOMes and other new psychoactive substances in blotting paper by square-wave voltammetry on a boron-doped diamond electrode, *Anal. Methods* 10 (2018) 2411–2418, <https://doi.org/10.1039/c8ay00385h>.
- [32] E.T. Smith, Examination of n = 2 reaction mechanisms that reproduce pH-dependent reduction potentials, *Anal. Chim. Acta* 572 (2006) 259–264, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.05.025>.
- [33] A.F.B. De Andrade, J. Gonzalez-Rodriguez, Electroanalytical identification of 25I-NBOH and 2C-I via differential pulse voltammetry: A rapid and sensitive screening method to avoid misidentification, *Analyst.* 144 (2019) 2965–2972, <https://doi.org/10.1039/c9an00062c>.
- [34] ChemAxon, Online platform for chemical calculations, <https://chemicalize.com/app/calculation> 2021 (accessed July 7, 2020).
- [35] S.P. Vorce, J.M. Holler, B. Levine, M.R. Past, Detection of 1-benzylpiperazine and 1-(3-trifluoromethylphenyl)-piperazine in urine analysis specimens using GC-MS and LC-ESI-MS, *J. Anal. Toxicol.* 32 (2008) 444–450, <https://doi.org/10.1093/jat/32.6.444>.
- [36] S. Elliott, C. Smith, Investigation of the first deaths in the United Kingdom involving the detection and quantitation of the piperazines BZP and 3-TFMPP, *J. Anal. Toxicol.* 32 (2008) 172–177, <https://doi.org/10.1093/jat/32.2.172>.
- [37] I.E.D. Moreno, B.M. da Fonseca, M. Barroso, S. Costa, J.A. Queiroz, E. Gallardo, Determination of piperazine-type stimulants in human urine by means of microextraction in packed sorbent and high performance liquid chromatography-diode array detection, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 61 (2012) 93–99, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2011.12.004>.
- [38] I.E.D. Moreno, B.M. da Fonseca, A.R. Magalhães, V.S. Gerales, J.A. Queiroz, M. Barroso, S. Costa, E. Gallardo, Rapid determination of piperazine-type stimulants in human urine by microextraction in packed sorbent after method optimization using a multivariate approach, *J. Chromatogr. A* 1222 (2012) 116–120, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.12.016>.
- [39] E. El-Naby, Potentiometric Signal Transduction for Selective Determination of 1-(3-Chlorophenyl)piperazine “Legal Ecstasy” Through Biomimetic Interaction Mechanism, *Chemosensors* 7 (2019) 46. doi:10.3390/chemosensors7030046.
- [40] A.J. Dickson, S.P. Vorce, J.M. Holler, T.P. Lyons, Detection of 1-Benzylpiperazine, urine samples, *J. Anal. Toxicol.* 34 (2010) 464–469.
- [41] M.A. Huestis, A. Verstraete, T.C. Kwong, J. Morland, M.J. Vincent, R. de la Torre, Oral fluid testing: promises and pitfalls, *Clin. Chem.* 57 (2011) 805–810, <https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.152124>.

Supplementary information

Electrochemical determination of novel psychoactive substances by differential pulse voltammetry using a microcell for boron-doped diamond electrode and screen-printed electrodes based on carbon and platinum

Jerson González-Hernández^{a,b,*}, Ana Lorena Alvarado-Gómez^{a,b}, Luis E. Arroyo-Mora^c and Miriam Barquero-Quirós^{a,b,*}

^a Centro de Investigación en Electroquímica y Energía Química (CELEQ), Universidad de Costa Rica, San José, 11501-2060, Costa Rica.

^b Escuela de Química, Universidad de Costa Rica, San José, 11501-2060, Costa Rica.

^c Department of Forensic and Investigative Science, West Virginia University (WVU), Morgantown, WV, 26506, USA.

Corresponding authors: Jerson González-Hernández and Miriam Barquero-Quirós

Contact: jerson.gonzalez@ucr.ac.cr and miriam.barquero@ucr.ac.cr

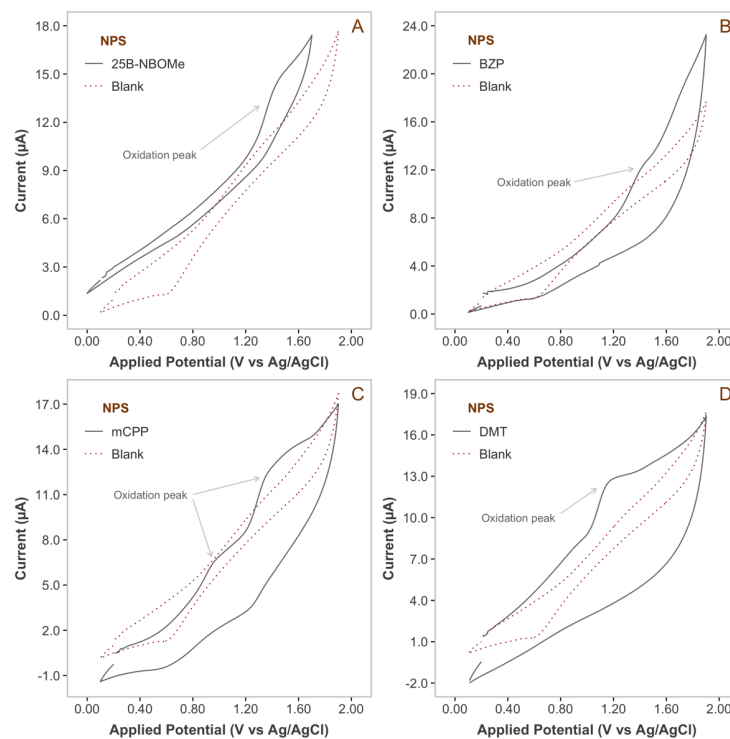


Fig. S1. Cyclic voltammety profiles for the analytes at 25.0 $\mu\text{g/mL}$ in 0.02 M TEAP/ CH_3CN solution recorded, using a BDD electrode. (A) 25B-NBOME; (B) BZP; (C) mCPP; and (D) DMT. Scan rate: 100 mV/s.

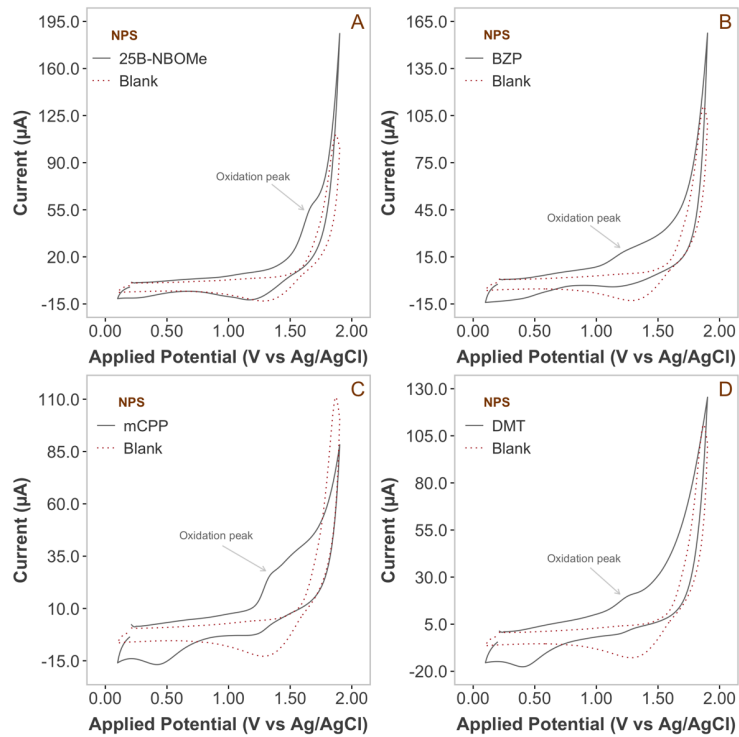


Fig. S2. Cyclic voltammetry profiles for the analytes at 25.0 µg/mL in 0.02 M TEAP/CH₃CN solution, recorded using a SP-Pt electrode. (A) 25B-NBOMe; (B) BZP; (C) mCPP; and (D) DMT. Scan rate: 100 mV/s.

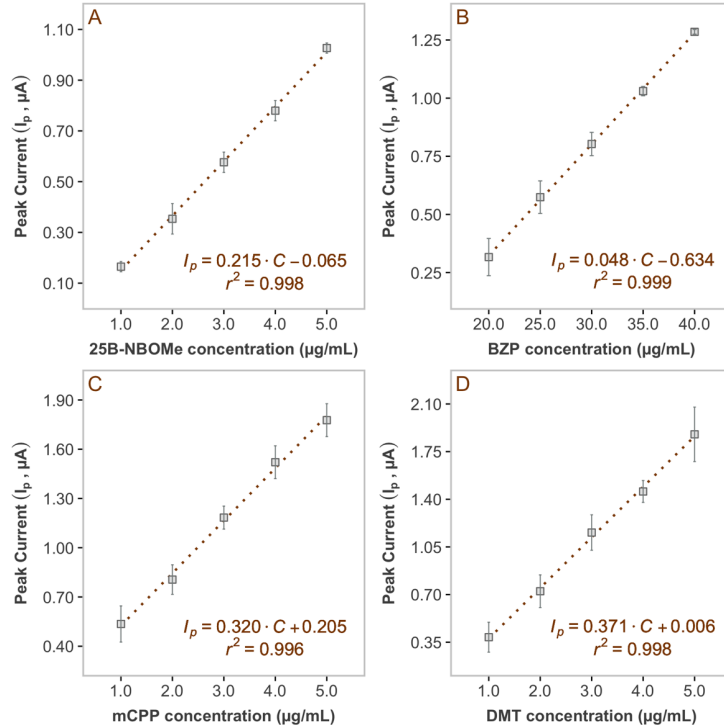


Fig. S3. Calibration curves in the form of oxidation peak current vs analyte concentration in 0.02 M TEAP/CH₃CN solution, recorded by DPV on BDD electrode. **A.** 25B-NBOMe; **B.** BZP; **C.** mCPP; and **D.** DMT.

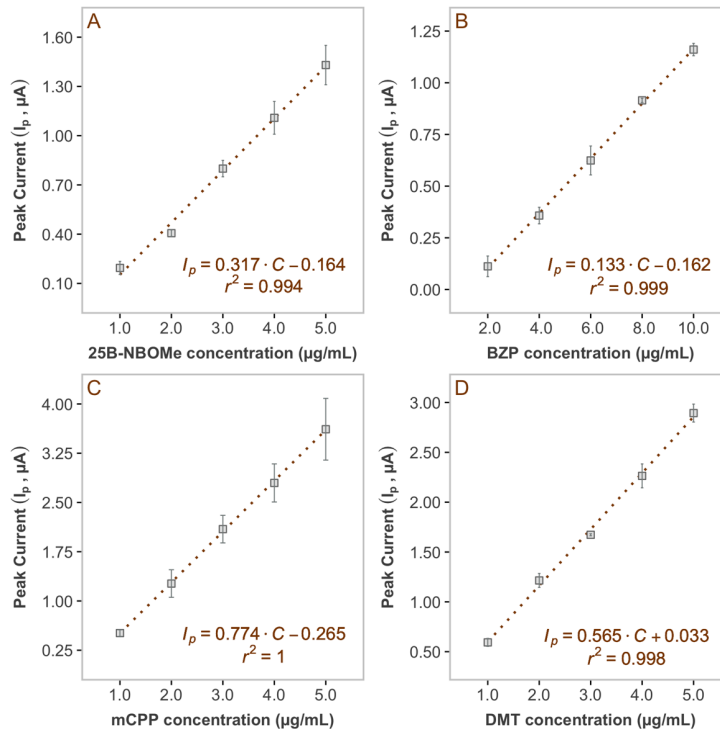


Fig. S4. Calibration curves in the form of oxidation peak current vs analyte concentration in BRB solution, recorded by DPV on SP-C electrode. **A.** 25B-NBOME at pH 8.0; **B.** BZP at pH 9.0; **C.** mCPP at pH 8.0; and **D.** DMT at pH 8.0.

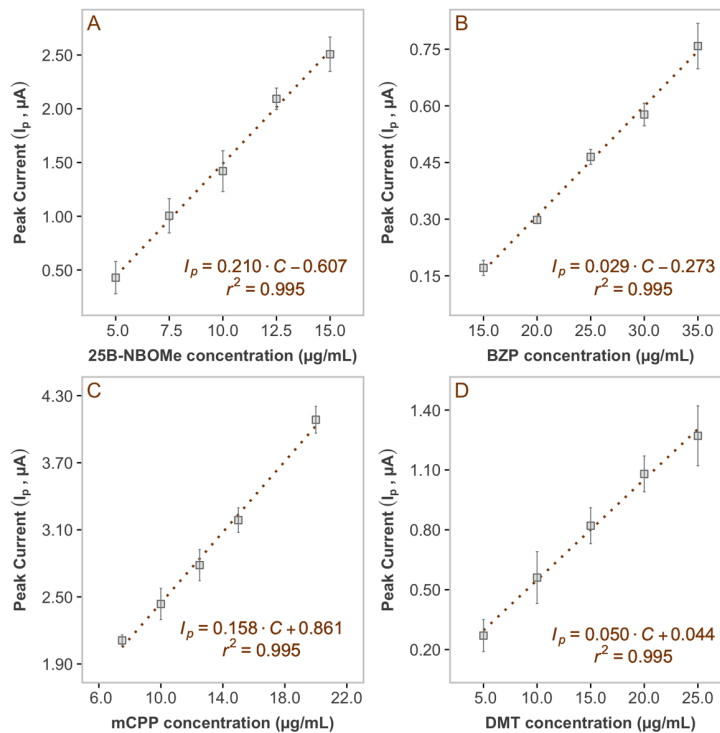


Fig. S5. Calibration curves in the form of oxidation peak current vs increasing analytes concentration in 0.02 M TEAP/CH₃CN solution, recorded by DPV on SP-Pt electrode. **A.** 25B-NBOMe; **B.** BZP; **C.** mCPP; and **D.** DMT.

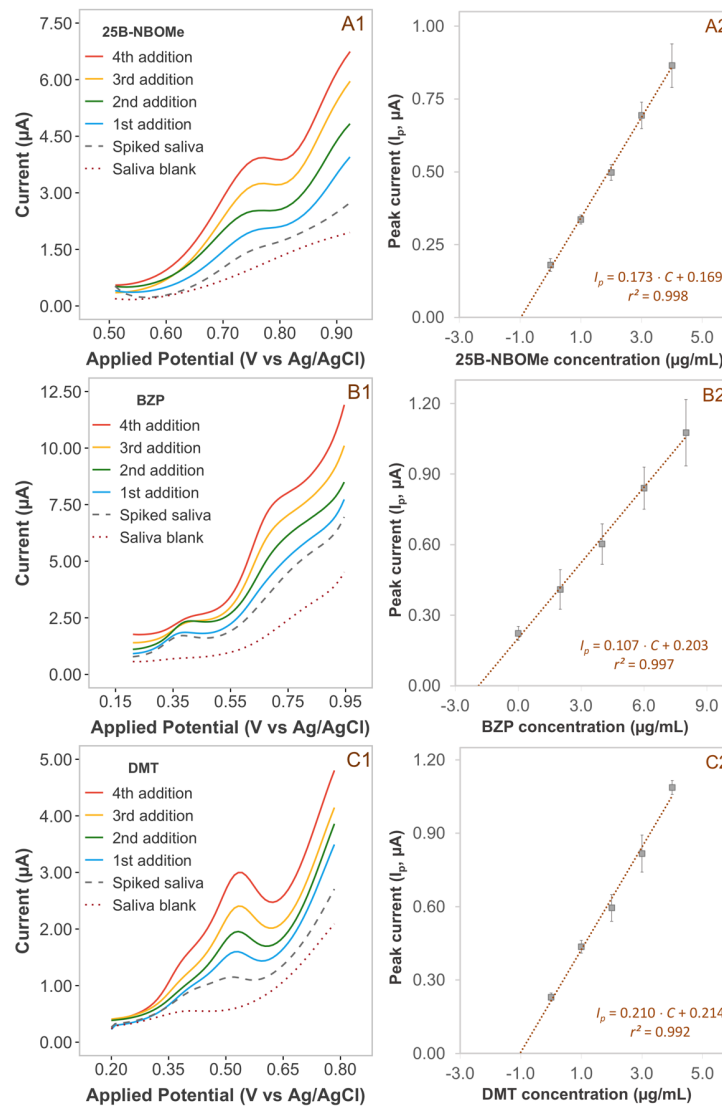


Fig. S6. Determination of the analytes in spiked oral fluid samples using the method based on SP-C electrode. (A1, B1 and C1) DPV curve profile for increasing standard additions of 25B-NBOMe, BZP and DMT respectively, and (A2, A3 and A3) Standard additions calibration curve in the form of oxidation peak current vs analyte concentration for the respective NPS.

6.2 Apartado II: Sensor espectroelectroquímico

Sensor espectroelectroquímico para la determinación de las catinonas sintéticas 4-MMC y 4-MEC en muestras de incautación y de orina

6.2.1 Resumen

La creciente cantidad de catinonas sintéticas –como la mefedrona (4-MMC) y 4-metilecatinona (4-MEC)– en varios países del mundo, refleja la naturaleza dinámica del mercado de nuevas sustancias psicoactivas categorizadas por sus efectos psicotrópicos como estimulantes. El uso y abuso de estas sustancias puras o mezcladas que suelen venderse como “euforizantes legales”, ponen de manifiesto el interés por desarrollar nuevas metodologías para el análisis cualitativo y cuantitativo en distintas matrices. En este trabajo se exploró, por primera vez, la respuesta espectroelectroquímica de estas dos catinonas sintéticas por medio de la voltamperometría cíclica (CV) acoplada con la espectroscopia Raman en un instrumento portátil.

Se observó que los estimulantes exhiben una señal de corriente anódica sobre un electrodo serigrafiado de oro, entretanto la superficie se electroactiva simultáneamente para generar un sustrato óptimo para la espectroscopia Raman de superficie mejorada (SERS) con alta reproducibilidad. El estudio de las ondas de oxidación de las moléculas y de las bandas características de los espectros SERS electroquímico, evidenció la rápida y fiable respuesta del sensor espectroelectroquímico para el análisis selectivo de ambas sustancias. Se evaluó la viabilidad y la aplicabilidad de la metodología híbrida para analizar las drogas en muestras simuladas de incautación y de orina sintética. El dispositivo basado en la técnica espectroelectroquímica de resolución temporal, ofrece una herramienta de bajo costo y fácil de emplear para la determinación *in situ* de psicoestimulantes sintéticos en materiales incautados y en matrices biológicas con baja concentración de analitos.

6.2.2 Introducción

La ONUDD estima que el 5.4% de la población adulta mundial ha consumido algún tipo de droga, al menos, una vez durante el año 2018, entretanto un 0.7% se ven afectados al punto de sufrir dependencia o de requerir tratamiento médico [185]. El control de las sustancias psicoactivas es un problema recurrente, principalmente, por las devastadoras consecuencias del mal uso, abuso y la adicción.

En la última década ha habido una expansión sin precedentes del mercado de NSP. El número total de psicotrópicos y estupefacientes fiscalizados a nivel internacional aumentó de 230 en 1990 a 282 en el 2018 [148,186]. En muchas regiones del mundo, principalmente en Asia Central y Europa Oriental, las drogas sintéticas están reemplazando a los opiáceos. La evidencia sugiere que las metanfetaminas y las catinonas están globalmente difundidas y disponibles en la actualidad [185].

El OEDT supervisa aproximadamente 138 tipos de catinonas sintéticas, un grupo de drogas cada vez mayor que encabeza las listas de incautaciones de NSP en el continente europeo [187]. La mefedrona (4-MMC) y la 4-metiletcatinona (4-MEC) son sustancias sintéticas similares a las anfetaminas –*e. g.* MDMA o éxtasis–, tanto en la estructura como en el mecanismo de acción, el cual se caracterizan por estimular el sistema nervioso central [188,189]. Estas drogas emergentes generalmente se encuentran en el mercado como productos químicos para la investigación, comestibles a base de plantas, sales de baño o limpiadores de vidrio y se venden en forma de polvo, píldoras o cápsulas [190].

La mefedrona y sus derivados son de las catinonas sintéticas más consumidas y de las sustancias que se encuentran con mayor frecuencia en incautaciones [191]. Por tanto, es fundamental obtener una respuesta inmediata a partir de métodos analíticos que se puedan aplicar en el campo para tomar medidas oportunas. En esta línea, se han sugerido e implementado varios métodos alternativos de análisis de drogas con el fin de responder rápidamente a dicha necesidad [141,176]; por ejemplo, los procedimientos electroquímicos como la voltamperometría y la amperometría aplicados a través de sensores químicos [192,193].

En algunas situaciones se requieren herramientas analíticas adicionales para discriminar adecuadamente entre analitos electroactivos. Las limitaciones de selectividad en la exploración electroquímica es un desafío importante, principalmente, cuando se trabaja con drogas que contienen adulterantes químicos o cuando es necesario distinguir entre moléculas con estructuras químicas muy similares [194]. En tales circunstancias, una prueba confirmatoria como la espectroscopia Raman puede ser la clave en la solución analítica [195].

Hay varios mecanismos disponibles para potenciar la señal Raman, entre ellos el fenómeno SERS mediante el uso de nanoestructuras en el sustrato como nanoestrellas [196,197], nanopartículas [198], nanopilares [199] o nanotubos [200] que propician la superficie adecuada para generar espectros de moléculas en bajas concentraciones o incluso de moléculas individuales [201–203]. Nuestro grupo de investigación ha reportado previamente el estudio de los centros de cobre en enzimas por medio de oro nanoestructurado como sustratos para SERS [204].

Durante un experimento combinado de SEC-SERS, la activación de la superficie metálica del sustrato se produce *in situ* de forma controlada y directa. Para ello se hace un pretratamiento electroquímico en la superficie del electrodo que genera las nanoestructuras requeridas [205–207]. El aumento en la rugosidad de la superficie electródica, principalmente en los materiales de oro y plata, se consigue de forma reproducible en la generación del sustrato SERS [125,208–210].

La evidencia indica que los electrodos serigrafados son sustratos promisorios para experimentos relacionados con SERS [211–213]. Varios sensores miniaturizados SEC-SERS se han descrito en una revisión reciente que involucra los campos de control de calidad, diagnóstico médico, química ambiental y seguridad alimentaria [126]. Este tipo de ensayos combina las ventajas de la espectroscopia Raman con los atributos del análisis electroquímico, lo que ofrece capacidades tanto de identificación como de cuantificación [214].

El estudio que se muestra a continuación presenta un método electroquímico de resolución temporal para la detección de dos cationas

sintéticas (4-MMC y 4-MEC) con un electrodo serigrafiado de oro como sustrato SERS. Las dos moléculas analizadas son estructuralmente muy similares –difieren solo por un grupo $-CH_2$ como se observa en la Figura 20– por tanto, es muy difícil identificarlas basada en la electroactividad, aún más cuando están presentes en mezclas con agentes cortantes o con otras drogas. Asimismo, se describen algunas de las ventajas y limitaciones del enfoque SEC-SERS y se discute el uso de la técnica CV para generar nanoestructuras *in situ* y a la vez funcionar como una herramienta semicuantitativa de análisis químico.

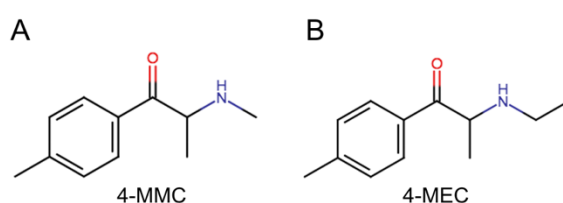


Figura 20 Estructuras químicas de las cationas sintéticas 4-MMC y 4-MEC.

(a) (R/S)-2-(metilamino)-1-(4 metilfenil)propan-1-ona (4-MMC). (b) (R/S)-2-(etilamino)-1-(4 metilfenil)propan-1-ona (4-MEC).

6.2.3 Publicación científica

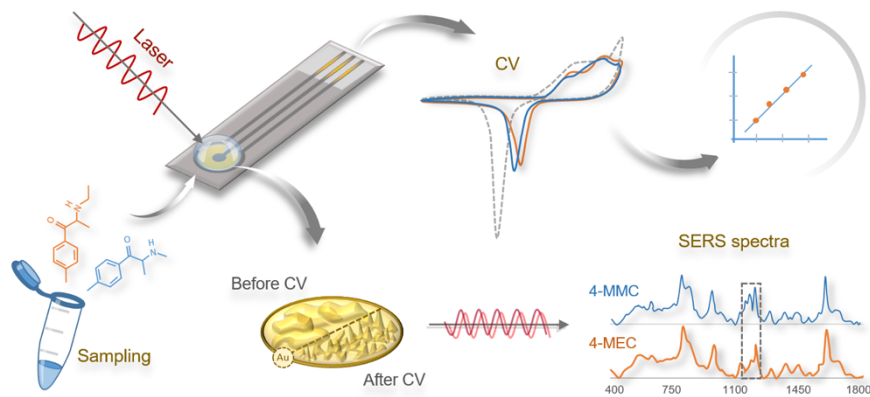


Article

Rapid Determination of the 'Legal Highs' 4-MMC and 4-MEC by Spectroelectrochemistry: Simultaneous Cyclic Voltammetry and In Situ Surface-Enhanced Raman Spectroscopy

Jerson González-Hernández ^{1,2}, Colby Edward Ott ³, María Julia Arcos-Martínez ⁴, Álvaro Colina ⁴, Aránzazu Heras ⁴, Ana Lorena Alvarado-Gámez ¹, Roberto Urcuyo ^{1,2,5} and Luis E. Arroyo-Mora ^{3,*}

Graphical abstract



Research highlights

1. Spectroelectrochemical sensing of mephedrone and 4-methylethcathinone.
2. A time-resolved technique based on Raman spectroscopy and cyclic voltammetry.
3. *In situ* electroactivation of the gold substrate for Raman SERS effect.
4. A cost-effective and user-friendly tool for onsite drugs screening.
5. Rapid detection of 'legal highs' in simulated seized drugs and synthetic urine.

Article

Rapid Determination of the ‘Legal Highs’ 4-MMC and 4-MEC by Spectroelectrochemistry: Simultaneous Cyclic Voltammetry and In Situ Surface-Enhanced Raman Spectroscopy

Jerson González-Hernández ^{1,2}, Colby Edward Ott ³, María Julia Arcos-Martínez ⁴, Álvaro Colina ⁴, Aránzazu Heras ⁴, Ana Lorena Alvarado-Gómez ¹, Roberto Urcuyo ^{1,2,5} and Luis E. Arroyo-Mora ^{3,*}

¹ Centro de Investigación en Electroquímica y Energía Química (CELEQ), Universidad de Costa Rica, San José 11501-2060, Costa Rica; jerson.gonzalez@ucr.ac.cr (J.G.-H.); alagamez@yahoo.com (A.L.A.-G.); Robertourcuyo@gmail.com (R.U.)

² Escuela de Química, Universidad de Costa Rica, San José 11501-2060, Costa Rica

³ Department of Forensic and Investigative Science, West Virginia University, Morgantown, WV 26506, USA; ceo0009@mix.wvu.edu

⁴ Departamento de Química, Universidad de Burgos, Pza. Misael Bañuelos s/n, E-09001 Burgos, Spain; jarcos@ubu.es (M.J.A.-M.); acolina@ubu.es (Á.C.); maheras@ubu.es (A.H.)

⁵ Centro de Investigación en Ciencias e Ingeniería de Materiales (CICIMA), Universidad de Costa Rica, San José 11501-2060, Costa Rica

* Correspondence: luis.arroyo@mail.wvu.edu; Tel.: +1-(304)-293-6976



Citation: González-Hernández, J.; Ott, C.E.; Arcos-Martínez, M.J.; Colina, Á.; Heras, A.; Alvarado-Gómez, A.L.; Urcuyo, R.; Arroyo-Mora, L.E. Rapid Determination of the ‘Legal Highs’ 4-MMC and 4-MEC by Spectroelectrochemistry: Simultaneous Cyclic Voltammetry and In Situ Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Sensors* **2022**, *22*, 295. <https://doi.org/10.3390/s22010295>

Academic Editor: Anna Chiara De Luca

Received: 24 November 2021

Accepted: 27 December 2021

Published: 31 December 2021

Publisher’s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The synthetic cathinones mephedrone (4-MMC) and 4-methylethcathinone (4-MEC) are two designer drugs that represent the rise and fall effect of this drug category within the stimulants market and are still available in several countries around the world. As a result, the qualitative and quantitative determination of ‘legal highs’, and their mixtures, are of great interest. This work explores for the first time the spectroelectrochemical response of these substances by coupling cyclic voltammetry (CV) with Raman spectroscopy in a portable instrument. It was found that the stimulants exhibit a voltammetric response on a gold screen-printed electrode while the surface is simultaneously electro-activated to achieve a periodic surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) substrate with high reproducibility. The proposed method enables a rapid and reliable determination in which both substances can be selectively analyzed through the oxidation waves of the molecules and the characteristic bands of the electrochemical SERS (EC-SERS) spectra. The feasibility and applicability of the method were assessed in simulated seized drug samples and spiked synthetic urine. This time-resolved spectroelectrochemical technique provides a cost-effective and user-friendly tool for onsite screening of synthetic stimulants in matrices with low concentration analytes for forensic applications.

Keywords: spectroelectrochemistry; synthetic cathinones; Raman SERS; 4-MMC; 4-MEC

1. Introduction

The United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC) estimates that 5.4% of the world’s adult population has used drugs at least once in the previous year. Even more serious, around 0.7% are affected to the point of suffering dependence or requiring treatment [1]. Considering the devastating consequences of drug misuse, abuse and addiction, the control of these drugs continues to be a recurrent problem.

In the last decade, there has been a dramatic expansion of the novel psychoactive substances (NPS) market. According to UNODC’s annual report of 2020, the number of NPS increased from 166 between 2005–2009 to 950 by the end of 2019, while the total number of psychoactive substances under schedule was 230 in 1990 and increased to 282 in 2018. These chemical compounds are commonly referred to as ‘legal highs’ because they may be bought without legal restrictions through head shops and online websites; however,

they pose a growing threat to public health similar to those illegal drugs listed in the Convention on Narcotic Drugs or Psychotropic Substances [2,3].

The stimulants market appears to be continuously growing and changing. In many regions of the world, mainly in Central Asia and Eastern Europe, synthetic drugs are replacing opiates. Evidence suggests that methamphetamines and cathinones are widely available today [1]. The European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA) currently monitors at least 138 synthetic cathinones, an increasing group of stimulants that dominate the seizures of novel psychoactive substances in the continent [4].

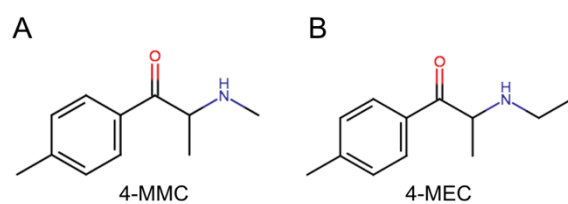
Mephedrone (4-MMC) and 4-methylethcathinone (4-MEC) are synthetic cathinones that are similar to amphetamine, methamphetamine, and ecstasy in structure and mechanism of action, predominantly as central nervous system stimulants [5,6]. These designer drugs are usually encountered as research chemicals, plant food, bath salts or glass cleaner and are sold in powder, pill, or capsule forms [7]. Mephedrone and its derivatives are some of the more commonly seized synthetic cathinones. Therefore, it is crucial to obtain an immediate response from analytical methods that can be applied in the field to take timely actions in seizure situations and provide investigative leads.

In an effort to quickly respond to a growing need to streamline the delivery of results, several alternative drug testing approaches have been recently suggested [8,9]. For example, electrochemical techniques such as voltammetry [10–13] and amperometry have been utilized as novel forensic tools for the detection of drugs [14,15]. These electrochemical techniques adapt well to the required field conditions [16], offering screening opportunities that can provide on-site decisions to law enforcement before sending evidence to the forensic lab for later analysis and processing [17].

In order to overcome limitations in discriminating between electro-active analytes, additional analytical tools are needed to increase the selectivity of the electrochemical examination. This is especially true when working with drugs that may have been mixed with cutting agents and chemical adulterants, and to distinguish between drugs with similar chemical structures [18]. Under these circumstances, a parallel and more confirmatory test such as Raman spectroscopy can resolve this limitation [19]. Several strategies are available to boost the Raman signal including SERS through the use of nanostructures such as nanostars [20,21], nanoparticles [22], nanopillars [23] or nanotubes [24] that induce surface-enhanced scattering [25,26], allowing the collection of spectra for molecules at low concentrations or even of individual molecules [27]. Our group has reported the behavior of Cu centers of enzymes using nanostructured Au as SERS substrates [28].

During a combined EC-SERS experiment, the metal surface activation occurs in situ in a controlled and straightforward way. The voltammetric pretreatment at the electrode surface allowed an efficient and reproducible development of roughened nanostructures [29–31]. The advantage of this procedure is that it combines Raman spectroscopy with electrochemical analysis, thus offering both identification and quantification capabilities [32]. Several EC-SERS miniaturized sensors have been described in a recent review, covering quality control, diagnosis, biomedical, environmental and food safety fields [33]. A novel electrochemical roughening technique of commercial disposable electrodes of metallic surfaces such as gold and silver has been used to improve the reproducibility of the SERS substrate based on the deposition of nanostructures [34–37]. Additionally, screen-printed electrodes (SPE) have been recently reported as excellent substrates for SERS experiments [38–40].

This manuscript presents a time-resolved spectroelectrochemical method for detecting two synthetic cathinones -4-MMC and 4-MEC- using a gold SPE electrode as SERS substrate (AuSPE). These two cathinones (Scheme 1) are structurally similar, differing only by a CH₂ group, which challenges their identification when they are present as mixtures in diluents or other drugs. Some of the advantages and limitations of the EC-SERS approach are described. The purpose of using the CV technique to generate onsite nanostructures and as a semi-quantitative tool is also discussed.



Scheme 1. Chemical structures of synthetic stimulant drugs. (A) (R/S)-2-(methylamino)-1-(4-methylphenyl)propan-1-one (4-MMC) and (B) (R/S)-2-(ethylamino)-1-(4-methylphenyl)propan-1-one (4-MEC).

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals

The Analytical Reference Standards of 4-MMC hydrochloride in the form of crystalline powder and 4-MEC hydrochloride in methanolic solution and crystalline powder were supplied by Cayman Chemical Company. The standards were reconstituted in methanol 99.99% purchased from Fisher Scientific (Optima[®] Grade) at different concentrations. Sulfuric acid (H₂SO₄) was supplied by Fisher Scientific and D-(+)-maltose monohydrate by MP Biomedicals LLC. All solutions were prepared with deionized water of resistivity 18.2 MΩ-cm supplied by the system Millipore Direct-Q[®].

2.2. Instrumentation for Electrochemistry and Raman Spectroscopy

The portable SPELEC Raman instrument from Metrohm DropSens was used to perform the spectroelectrochemical experiments. The compact unit combines a Raman spectrometer, a bipotentiostat/galvanostat and a LASER Class 3B (785 nm). It includes an adapter for disposable SPE and an opaque cell for Raman spectroscopy analysis. This instrument uses DropView SPELEC 1.2 interface to control the hardware and analyze the data obtained.

Confirmatory voltammetric measurements were carried out using a potentiostat Autolab PGSTAT Echo Chemie 128 N (Utrecht, The Netherlands) controlled by the electrochemistry software Nova v2.1.4.

2.3. Substrate Characterization

Characterization of the gold electrode surface before and after in situ SERS generation was achieved using scanning electron microscopy (SEM) and atomic force microscopy (AFM). Analysis was carried out on a new electrode (pristine electrode) and after in situ electro-activation of the substrate through a positive sweep from +0.6 to +1.4 V and then returning to +0.1 V. To this end, a JEOL SEM JSM7600 operating at 5.0 keV was used to obtain images of the surface at magnification from 40× to 30,000×. A Denton Desk V Sputter coater with Carbon Rod Accessory for carbon evaporation was used to lightly coat the samples for SEM analysis.

Surface morphology of the AuSPE was studied using an Asylum Research MFP-3D[™] AFM. WSXM free software was used for AFM data processing [41].

The SEM images were processed and analyzed using ImageJ. The scale was set to define the pixels in terms of SEM scale. A fast Fourier transformation (FFT) and a band-pass filter were used. The threshold was adjusted to analyze particles of size larger than 0.1 μm².

2.4. Spectroelectrochemical Determinations

The chemical standards in methanol were evaporated using a continuous flow of nitrogen from Matheson Tri-Gas, Inc. and reconstituted in H₂SO₄ 0.01 M. Screen-printed electrodes (EC-SERS platform) were purchased from DropSens (220BT cured at low temperature). The SPE system included a gold working electrode, a silver pseudo-reference electrode (AgSPE) and a gold counter electrode. These electrodes were selected to evaluate the reproducibility of the SERS substrate.

Raman detection was performed using an infrared 785 nm laser wavelength. The Raman probe focus was optimized using O-rings as spacers (0.5–1.5 mm) in the cell to adjust the focal distance. The laser power was optimized between 36.3 and 550.5 mW and integration time between 100 and 5000 ms. Cyclic voltammetry screening was carried out at the best instrumental conditions: the potentials were stepped in 2 mV increments from +0.1 to +1.2 or +1.4 V starting at 0.6 or 1.0 V and a scan rate of 50 mV/s. The electrochemical measurements and Raman spectroscopy were performed simultaneously on a drop of 50–70 μL solution pipetted on the electrode placed into the cell.

2.5. Raman Measurements

Raman data in the solid-state were acquired using the SPELEC instrument in the mode for Raman spectroscopy only using a spacer of 0.5 mm. A small amount of each sample was deposited onto aluminum foil placed inside the Raman cell forming a small powder film. The spectra were recorded with an integration time of 10 s and a laser power of 464.8 mW.

2.6. Interference Study

For the interference effect assessment, simulated seized drug samples were prepared from solid powdered drugs and cutting agents (maltose and lidocaine). Preparation of mixtures was performed by weight to provide a ratio of drug to cutting agent 1:4. Target drug and maltose or lidocaine were mixed into plastic baggies. The samples were analyzed by placing approximately 1 mg of the seized mixture sample into a microcentrifuge tube and dissolving in 1000 μL of 0.01 M sulfuric acid. Analysis occurred in the following order to obtain EC SERS data (all CV and Raman parameters were set as detailed previously, laser power of 379.1 mW and integration time of 5000 ms):

1.0→1.4→0.1→1.0 V

0.6→1.4→0.1→0.6 V (using the same drop on the electrode)

This procedure was performed for both 4-MMC and 4-MEC simulated sample detection.

2.7. Reproducibility of the EC-SERS Substrate

Simulated seized samples of 4-MMC and 4-MEC cut with maltose in a ratio of solid drug to cutting agent 1:4 was tested by the simultaneous technique. The measurements were performed in triplicate on different electrode sensors to assess the Raman intensity of the two principal bands in the EC-SERS spectrum (Section 3.3).

2.8. Urine Analysis

Synthetic urine (Ricca Chemical Company, Arlington, TX, USA) was selected as a biological specimen to expand the scope of applicability of the method. Drug stocks were prepared at 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ from standard chemical solutions by drying down the required amount and reconstituting in 0.1 M KCl ACS reagent $\geq 99\%$ purchased from Sigma-Aldrich. Two milliliters of synthetic urine was spiked using 20 μL of the drug stocks for a final cathinone concentration of 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

The spiked samples and blank were placed into separate 15 mL conical tubes. An aliquot of 400 μL of 10% ammonium hydroxide ACS Plus grade from Fisher Scientific was added to raise the pH to approximately 11.5. The tubes were vortexed for 30 s before and after adding 2.0 mL of methyl tert-butyl ether (MTBE) HPLC grade supplied by Fisher Scientific. They were centrifuged for one minute to ensure phase separation. The top organic layer was removed into a separate microcentrifuge tube and dried down under nitrogen flow. Finally, the chemical residues were reconstituted in 50 μL of 0.01 M sulfuric acid.

Spectroelectrochemical analyses were performed in a homemade black box prepared for Raman and conditions were set as described in Sections 2.4 and 2.6.

3. Results and Discussion

The two synthetic stimulant drugs studied are classified as secondary amines with a calculated pKa around 8.1 [42]. The electrochemical potential of these weak bases is influenced by the pH of the medium in which the measurement is performed. Sulfuric acid at a pH of 1.8 made it possible to work with a wider electrochemical window when gold electrodes were used [43]. These conditions enabled the separation of the two oxidation waves corresponding to the analyte and the substrate.

3.1. Determination of the Electro-Activity

The electro-activity of the target drugs was determined via cyclic voltammetry (CV). The experiment was conducted in the positive direction, starting the sweep at +0.60 V, which allowed the resolution of the peaks to the gold's oxidation wave used as the working electrode. The electrochemical process of 4-MMC and 4-MEC using AuSPE is outlined in Figure 1, where the average of the three measurements for each concentration is plotted. The electro-oxidation of both substances occurs at a potential of around +0.91 V (peak I) as suggested by the growth of the current peak when increasing the concentration from 50 to 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, while gold oxidizes around +1.1 V (peak II). The prominent cathodic peak at +0.62 V for drug samples (peak III) or +0.52 V for the blank, corresponds to the reduction of the gold compounds previously formed in the positive scan. Both oxidation and reduction peaks are shifted towards less positive potentials for the blank. The voltammograms demonstrate the common hysteresis of the oxide formation–reduction behavior that some metals such as gold undergo in the electron transfer reactions [44].

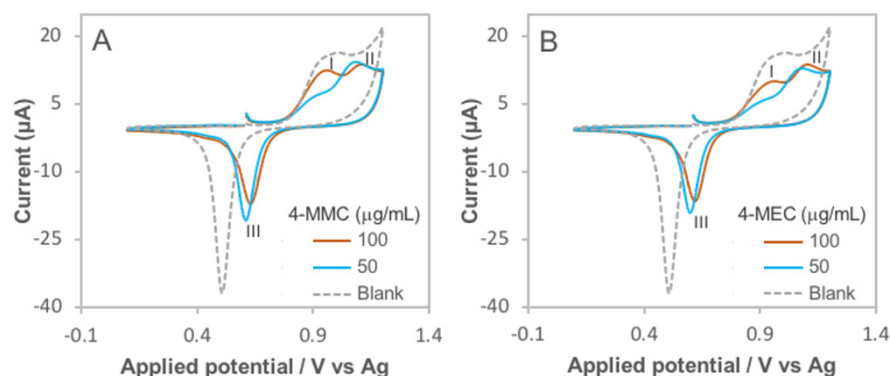


Figure 1. Cyclic voltammograms of the target drugs. (A) 4-MMC and (B) 4-MEC, both in 0.01 M H_2SO_4 at a AuSPE starting at +0.6 V in the positive direction. Scan rate: 50 mV/s.

In the spectroelectrochemical analysis, voltammetric scanning has the dual role of tentatively determining the amount of analyte in the sample while performing in situ pretreatment on the electrode surface, which serves as a substrate for the acquisition of Raman spectra. Attention is now turned toward the quantitative application of this technique (see Figure 2). Calibration curves of peak height vs. analyte concentration were obtained using cyclic voltammetry (CV) on the AuSPE. The generation of these curves opened the possibility to utilize the method for quantitative purposes, which is desirable in forensic and other analytical fields. One of the limitations of using CV is the overall low sensitivity offered mainly due to the susceptibility to residual currents encountered [45]. Therefore, at low concentrations, the shape of the analyte peaks is more difficult to recognize from the gold oxidation peak as shown in Figure 2B. The corresponding calibration plots show a linear response: $I_p = 0.064 \cdot C - 0.532$ for 4-MMC (Figure 2A) and $I_p = 0.119 \cdot C - 3.92$ for 4-MEC (Figure 2B) with regression coefficients (R^2) of 0.997 and 0.999, respectively. The limit of detection (LOD) was estimated at three times the standard deviation of the linear regression divided by the slope of the linear curve ($3\sigma/S$). The method for 4-MMC exhibited a LOD of 6.6 and 2.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 4-MEC.

Finally, time-resolved electrochemical and spectroscopic information provides the necessary methodology to perform the selective determination of these two designer drugs.

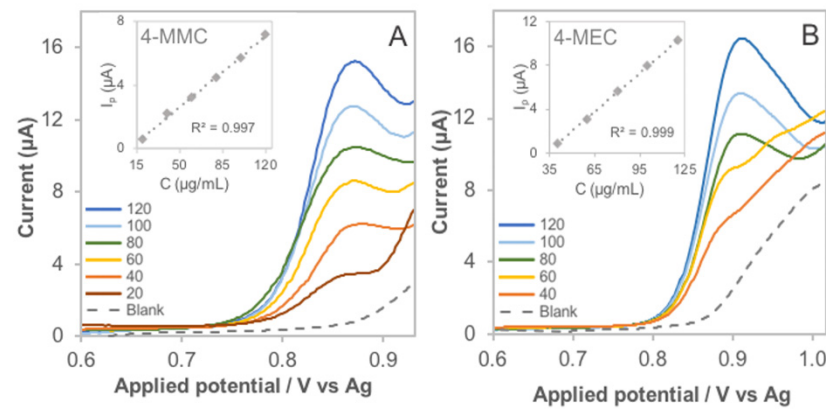


Figure 2. Partial CV profile recorded on a AuSPE for different concentrations of the drugs in 0.01 M H_2SO_4 . (A) 4-MMC (20–120) $\mu\text{g}/\text{mL}$. (B) 4-MEC (40–120) $\mu\text{g}/\text{mL}$. Insert shows the calibration curve: peak height vs. analyte concentration. Scan rate: 50 mV/s.

3.2. Substrate Characterization

The dynamic electrochemical process in the SPE allows the surface of the gold to become SERS-active by roughening the metal surface through the oxide formation-removal reaction. The substrates were characterized with SEM images, as shown in Figure 3. Au microparticles form the surface of the pristine SPE; however, this rough surface with some cavities is not sufficient to induce the SERS response, as will be shown below. In Figure 3A,B, a slight alteration is noted in the morphology of the electro-reduced substrate to the unaltered electrode. Au nanoparticles are electrochemically deposited on the surface of the Au microparticles, obtaining a high density of the nanoparticle aggregates [46]. The particle-size distribution analysis demonstrated an increase of 17% for nanoparticles with a size of 0.1 μm and 50% for nanoparticles with a size around 0.3 μm after voltammetric treatment. If the images are analyzed at a higher magnification ratio (Figure 3C,D), it is observed that the nanoparticles of the in situ electro-activated substrate are aggregated, yielding a homogeneous distribution of metallic particles that are rougher and with greater surface area, increasing the probability of generating the excitation of the surface plasmon [47].

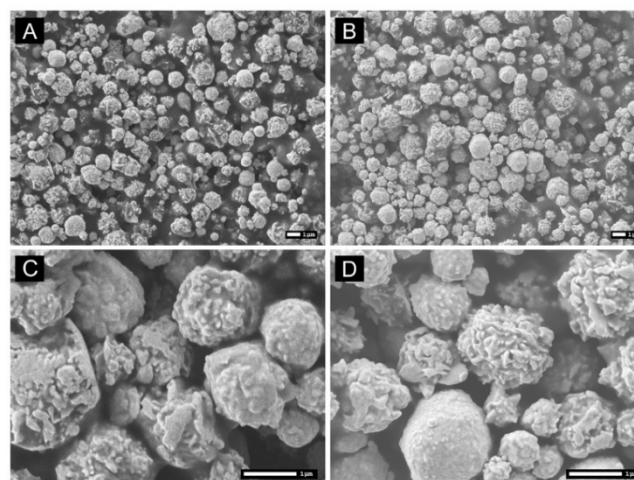


Figure 3. Structural characterization of the AuSPE surface with SEM. (A) Image at 5000 \times magnification of the pristine AuSPE. (B) Image at 5000 \times magnification of the in situ electro-activated substrate by CV scanning. (C) Image at 20,000 \times magnification of the pristine AuSPE. (D) Image at 20,000 \times magnification of the in situ electro-activated substrate by CV scanning.

In the SERS mechanism, the long-range effect produces a much stronger electric field close to the substrate surface, which increases the relative SERS intensity. According to the short-range effect, the polarizability tensor of the ligand is perturbed by chemical bond formation with the metal or by charge-transfer, giving a redistribution of the electron density between the molecular states and the energy levels of the metal conduction band [48]. These two effects result in improved resolution of the spectra for the identification of the molecule. Nonetheless, SERS electromagnetic theory requires that the size of the metal particles be much smaller than the wavelength of the exciting radiation (Rayleigh approximation). The primary enhancement derives from the resonance between the incident radiation and the electronic excitation wave on the metal surface, called the surface plasmon band [49]. As such, a face roughness on a nanometer length scale is necessary. On the electrode surface, these conditions are obtained after in situ electro-deposition of AuNPs aggregates. The 3D AFM image of the pristine AuSPE substrate (Figure 4A) shows a microscopic roughness, as well as deep and micrometer-scale cavities. In contrast, a smoother and restructured surface is observed in Figure 4B. This electrochemical modification may change the size cavities to the desirable nanometer range and consequently promote SERS phenomena.

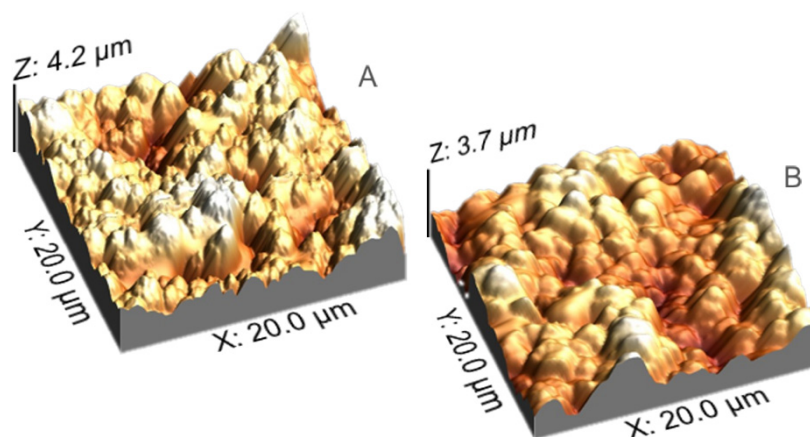


Figure 4. AFM study of the AuSPE surface morphology. (A) 3D AFM image of the pristine AuSPE substrate. (B) 3D AFM image of the in situ electro-activated substrate by CV scanning.

3.3. Spectroelectrochemical Sensing

Figure 5 depicts the voltammetric profile and the EC-SERS effect of a diluted 4-MMC solution on the AuSPE in a simultaneous measurement. The potential-dependent evolution of spectra—acquired at potentials marked with an asterisk—shows an active surface just after the electro-reduction of the gold oxides. This critical change suggests an increase in the adsorption of the target molecules on the electro-synthesized AuNPs and generates the overall SERS effect necessary to identify some characteristic bands.

The EC-SERS spectrum, which is shown in an orange color (Figure 5B), appears at 0.45 V in the negative direction when the substrate is chemically activated by electrochemical deposition of gold nanoparticles. It is noteworthy that neither the initial Raman spectrum at 1.0 V in the positive direction nor the spectra at 1.35 and 0.75 V during the cathodic scan show any band corresponding to the molecule, confirming that the pristine SPE does not demonstrate SERS properties. Raman spectra obtained at 1.0, 1.35 and 0.75 V can be related to the ink used in the fabrication of the SPE.

The vibrational spectral analysis is based on the most significant bands: the signal arising at 804 cm^{-1} is assigned to the p-disubstituted ring vibrational mode $\gamma(\text{CH})$ out-of-plane, the 975 cm^{-1} mode may be attributed to methyl rocking vibration $\rho(\text{CH}_3)$ coupled with $\nu(\text{CN})$ motion, the wavenumber at 1213 cm^{-1} results from aromatic $\delta(\text{CH})$ in-plane deformation vibrations, and the ring stretching mode $\nu(\text{CC})$ gives rise to the strong peak at 1605 cm^{-1} [50–52].

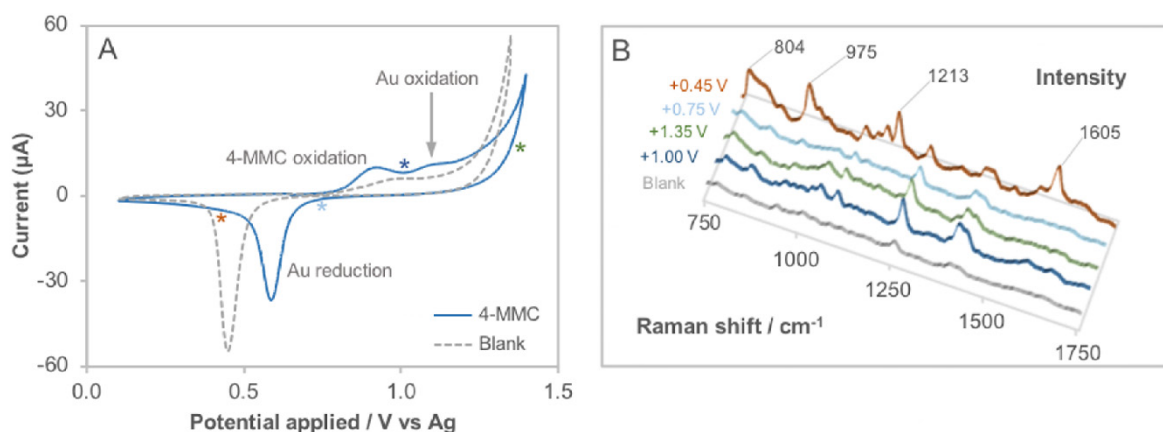


Figure 5. Raman spectroelectrochemical screening of 4-MMC 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in 0.01 M H_2SO_4 using the SPELEC instrument. (A) The sweep of the cyclic voltammogram recorded on a AuSPE starting at +1.0 V in the positive direction, scan rate: 50 mV/s. (B) Potential-dependent evolution of normalized Raman spectra marked with colored asterisks in the cyclic voltammogram. Laser power: 379.1 mW and integration time: 3 s.

Under the spectroelectrochemical conditions for both molecules individually tested, the electro-oxidation potentials of +0.88 V for 4-MMC and +0.90 V for 4-MEC were obtained at 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and the relative standard deviation (RSD, $n = 5$) was estimated at 1.0% and 2.3%, respectively. When comparing these values to the oxidation potentials previously recorded in the individual drug analysis, it was observed that in the data collected from the SPELEC instrument, there was minimal differentiation between the oxidation peaks of the two analytes. Furthermore, the peaks were slightly shifted towards lower potentials than the Autolab results.

Due to the structural similarity of both molecules (Scheme 1), these substances share a few physical and chemical properties that make it difficult to distinguish them by electrochemical techniques as a rapid screening because the peaks become wider as the concentration increases, causing slight shifts in the potential at which the current reaches a maximum (seen in Figure 6A).

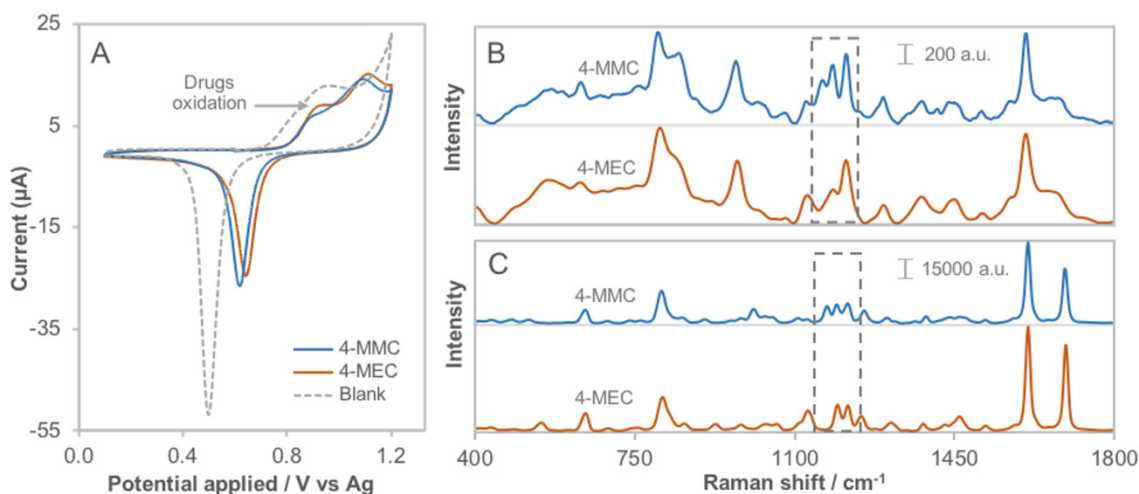


Figure 6. Comparison of the spectroelectrochemical results of 4-MMC and 4-MEC obtained in solution at 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in 0.01 M H_2SO_4 and the spectra from the crystalline powders using the SPELEC instrument. (A) Overlay of cyclic voltammetry recorded on a AuSPE at 50 mV/s starting at 0.6 V in the positive direction. (B) EC-SERS spectra, laser power of 379.1 mW and integration time of 3 s. (C) Raman spectra of the drugs as solid powders.

Electrochemical methods are useful for quantification because the characteristics of the oxidation wave depend on the concentration of the analyte; however, for a rapid and accurate identification, it is essential to use a more selective analytical tool that allows for the unequivocal characterization of the substance in solution [53,54]. Despite the mentioned similarity of the drugs studied, it is possible to discriminate the chemical structures accurately by EC-SERS in a quick and simple analysis that can even be applied in the field due to the portability of the SPELEC instrument. Figure 6B depicts EC-SERS spectra of both substances in acid solution. The most significant difference between the two spectra is in the region of the gray dashed rectangle ($1150\text{--}1225\text{ cm}^{-1}$). The spectrum of 4-MMC shows a triplet with signals at 1161 , 1185 and 1213 cm^{-1} , which could be attributed to aromatic $\delta(\text{CH})$ in-plane deformation vibrations [55,56], while for 4-MEC, only one doublet is distinguished with the signals at 1185 and 1213 cm^{-1} . The absence of the band at 1161 cm^{-1} in the 4-MEC EC-SERS spectrum agrees with the results in Figure 6C for the spectra acquired from substances in the form of crystalline powder, allowing for the correct identification of each of the stimulants studied, as it has been reported [57,58].

The advantage of activating an optimal surface morphology to induce the SERS effect is its ability to analyze a low concentration of the analyte, according to the results. In comparison, these low concentrations may not be detected using non-SERS Raman due to a decrease in sensitivity, and therefore a loss in peak resolution compared to SERS. The possibility to identify and quantify low concentrations of the target drugs gives the technique a potential use for testing both seizure samples and biological matrices [59] or even in instances where the fluorescence overwhelms the Raman signals [60]. Furthermore, in situ SERS substrate activation provides some benefits to overcoming a possible time-dependent decrease of the surface and plasmonic properties, which could affect the reproducibility and reliability of the measurements [29].

3.4. Interference Study

The interference effect was evaluated by testing simulated seized drugs cut with maltose and lidocaine, common cutting agents for this type of psychoactive substance [61]. The sensing of the seized sample, prepared at a ratio of drug to maltose or lidocaine 1:4, provides sufficient information to determine the presence or absence of the stimulants in the analyzed powder mixture. In this instance, the maltose, used as a cutting agent, is not electro-active under the test conditions; therefore, the oxidation signals correspond to synthetic cathinones (Figure 7A). This electrochemical technique (CV) may be applied to quantify the analyte in the mixture and determine the appropriate ratio. Additionally, the in situ EC-SERS spectrum allows the identification of drugs through the most relevant signals, which were marked in Figure 7B with dashed lines. This highlights one of the advantages of this method: the confirmation of the presence of the molecule by two techniques simultaneously in a single run. Although maltose represents 80 percent of the mixture, the characteristic bands of the drugs are prominent and easy to identify.

Regarding the synthetic cathinones cut with lidocaine, the electrochemical response is different because this cutting agent is electro-active as can be seen in Figure 8A, in which only the oxidation waves of lidocaine are distinguished under optimized working conditions for 4-MMC/lidocaine (the same results were observed for 4-MEC/lidocaine). Despite this substance does not allow the quantification of drugs by the CV technique, the simulated samples EC-SERS spectra show significant differences with respect to the spectrum of lidocaine dissolved in $0.01\text{ M H}_2\text{SO}_4$. The identification of some characteristic bands of the stimulants, mainly the Raman shift at 804 and 1213 cm^{-1} (Figure 8B, the dashed lines indicate the position of the drug bands in the spectra of cathinones solution) is evidence that the proposed method may be a useful screening tool in preliminary tests for drug samples cut with different substances, whether solid or in solution, even at low concentrations. These previous results demonstrate the potential on-site application of this method to investigate other common mixtures in seized drug samples by a rapid procedure.

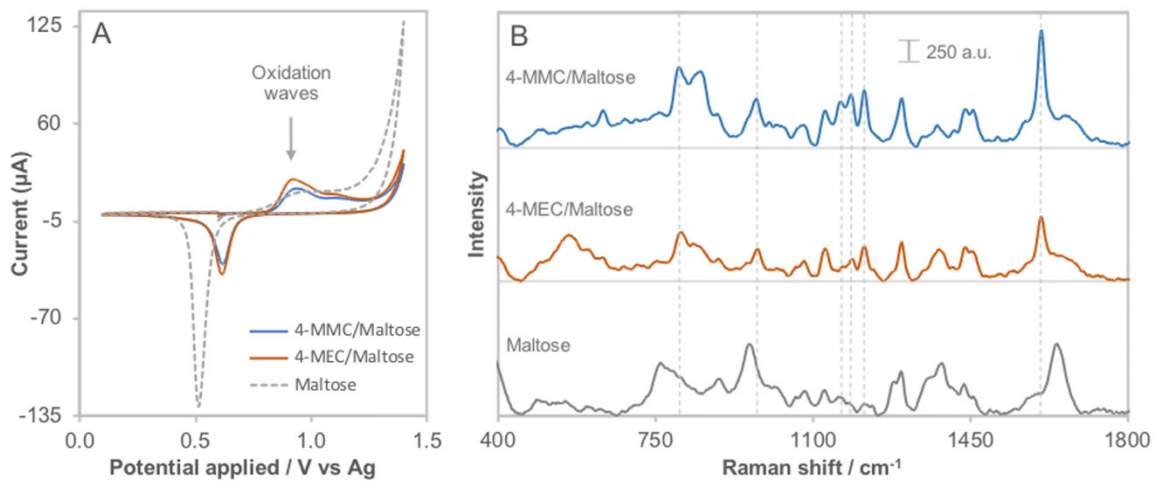


Figure 7. Application of spectroelectrochemistry to simulated seized drug samples cut with maltose and diluted at an approximate concentration of 1 mg/mL in 0.01 M H₂SO₄. (A) Overlay of cyclic voltammograms. (B) EC-SERS spectra—baseline corrected.

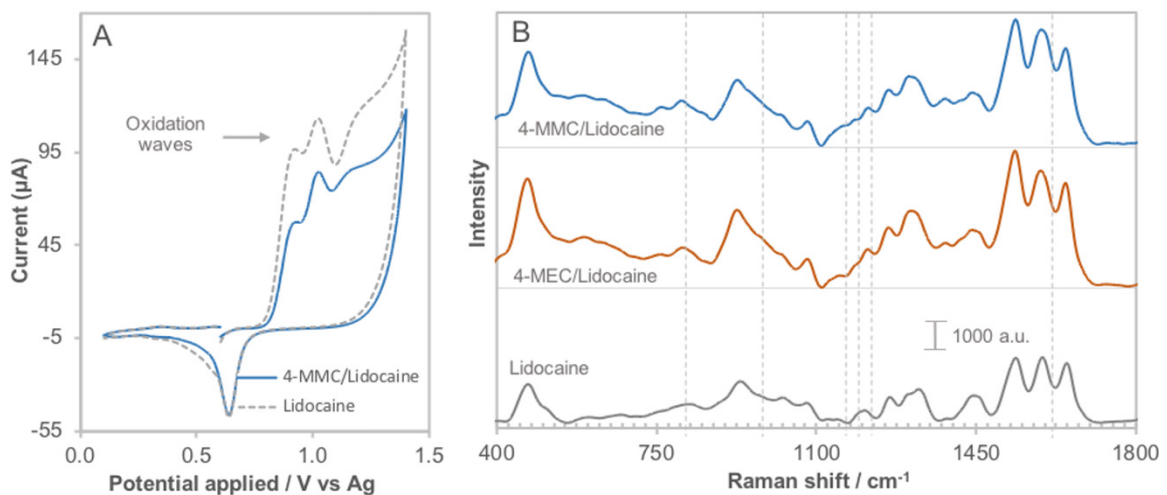


Figure 8. Application of spectroelectrochemistry to simulated seized drug samples cut with lidocaine and diluted at an approximate concentration of 1 mg/mL in 0.01 M H₂SO₄. (A) Overlay of cyclic voltammograms. (B) Normalized EC-SERS spectra.

The selectivity of the synchronous experiment can be evaluated independently. The electrochemical activity of the substances present in the mixture and the oxidation waves developed at the gold electrode caused limited selectivity on the target analyte peaks. When the EC-SERS was set, the selectivity improved. Several characteristic bands of the target molecules were enhanced and allowed the proper identification of each drug with contrasting responses when the mixture involved maltose and lidocaine. Adequate identification and quantification were possible in the seized drug cut with maltose only.

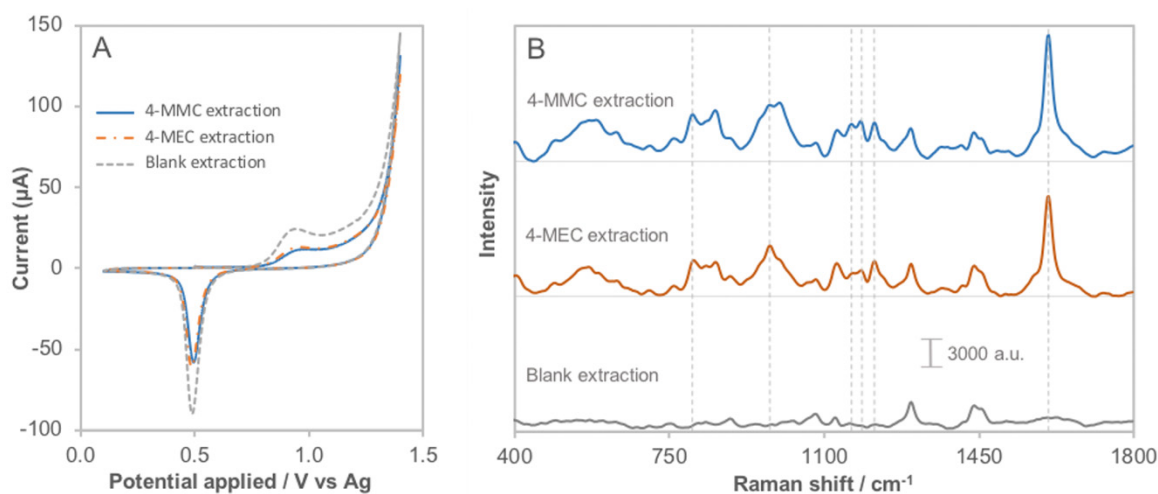
The EC-SERS substrate reproducibility was assessed by measuring drug samples cut with maltose. Here, high selectivity is required to improve the identification of studied analytes. The two main bands in the corrected EC-SERS spectrum by baseline subtraction were considered to determine the Raman intensity RSD ($n = 3$). Table 1 shows a low RSD for the most intense and significant band of 4-MMC and 4-MEC at 1605 cm⁻¹ (<2%). For the second band at 1213 cm⁻¹, RSD values are a little higher, probably because the signal intensity is lower and the interaction and overlay with the cutting agent bands are more likely. These preliminary determinations demonstrate a good reproducibility for the SERS platform and the values for this performance parameter are sufficient for this study in which the EC-SERS technique is used as an identification tool.

Table 1. Relative standard deviation (RSD) of the intensity-corrected EC-SERS spectrum of the simulated seized drug at 1 mg/mL in 0.01 M H₂SO₄.

Matrix.	EC-SERS Band	Raman Intensity RSD (<i>n</i> = 3)
4-MMC/Maltose ratio 1:4	1605 cm ⁻¹	1.7%
	1213 cm ⁻¹	14%
4-MEC/Maltose ratio 1:4	1605 cm ⁻¹	1.4%
	1213 cm ⁻¹	12%

3.5. Applicability of the Method

In order to demonstrate the feasibility and applicability of the method, synthetic urine samples were spiked with the target drugs and analyzed. Based on the possible concentration of free-mephedrone excreted in urine [62], synthetic urine samples were prepared at 1.0 µg/mL of 4-MMC and 4-MEC for testing. The drugs were extracted and reconstituted in H₂SO₄ 0.01 M. In the voltammetric profile of the cathinones an oxidation peak is observed that overlaps with the oxidation wave of gold required for the in situ EC-SERS effect (Figure 9A). If the goal goes beyond identification in biological samples, other more sensitive electrochemical techniques are recommended such as SWV or DPV. The characteristic bands of the analytes can be identified in the EC-SERS spectra (Figure 9B). The spectroelectrochemical data analysis demonstrates that it is possible to identify, quantify and even differentiate between 4-MMC and 4-MEC at low concentration in urine as described above, considering the discriminatory region in the spectrum from 1150 to 1225 cm⁻¹.

**Figure 9.** Analysis of spiked synthetic urine prepared in the laboratory at 1.0 µg/mL. (A) Voltammetric profile for the extracted analytes and concentrated in H₂SO₄ 0.01 M. (B) EC-SERS spectra—baseline corrected—for the extracted drugs.

An outstanding advantage of this method is the implementation of the SERS substrate electro-activation procedure for the quantification of the two drugs studied, either in samples mixed with their cutting agents or in biological matrices in which the analyte concentrations are low. The spectroelectrochemical approach of this work is based on the preliminary measurement of either 4-MMC or 4-MEC in its pure form or mixed with cutting agents. However, the data obtained from the same gold sensor demonstrates the feasibility of the coupled technique to be able to identify both drugs in a mixture. Efforts in this direction are important because the new generation of ‘legal highs’ are generally sold in combined with other controlled substances [63].

4. Conclusions

In the present work, the spectroelectrochemical sensing and comparison of the results for 4-MMC and 4-MEC were explored for the first time using a portable instrument. Both drugs were found to be electro-active on a gold electrode at pH 1.8 by the CV technique. This electrochemical sweep allows a simultaneous in situ activation of the SPE surface to induce the SERS effect. The CV vs. SERS spectroelectrochemical process enables a rapid and reliable analysis technique in which both synthetic cathinones can be selectively analyzed or detected through the characteristic bands of the EC-SERS spectrum that provide a real fingerprint of the molecule, even for molecules as similar as those studied in this work.

The time-resolved technique proposed in this study, in addition to being cost-effective and user-friendly, has a potential quantitative on-site application for samples from biological matrices with analytes in low concentration or for drug seizure samples. Further work for the evaluation of analytical performance parameters and the validation of this promising coupled technique is underway to extend the applicability of the method.

Author Contributions: Conceptualization, L.E.A.-M. and J.G.-H.; methodology, J.G.-H., C.E.O., A.L.A.-G. and R.U.; software, J.G.-H., C.E.O. and R.U.; validation, L.E.A.-M., R.U., Á.C. and M.J.A.-M.; formal analysis, J.G.-H. and C.E.O.; investigation, L.E.A.-M., J.G.-H., R.U. and C.E.O.; resources, L.E.A.-M. and A.L.A.-G.; data curation, J.G.-H. and R.U.; writing—original draft preparation, J.G.-H.; writing—review and editing, L.E.A.-M., J.G.-H., C.E.O., R.U., Á.C., A.H. and M.J.A.-M.; visualization, J.G.-H. and L.E.A.-M.; supervision, L.E.A.-M.; project administration, L.E.A.-M.; funding acquisition, L.E.A.-M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the National Institute of Justice Award #2019-DU-BX-0030. The opinions, findings, and conclusions are those of the authors and do not necessarily reflect those of the Department of Justice.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: J. González-Hernández would like to acknowledge CELEQ and Sistema de Estudios de Posgrado de la Universidad de Costa Rica for supporting and financing the internship at WVU and Jairo García for the processing of digital images. R. Urcuyo thankfully acknowledges BMBF-MICITT project. The authors would also like to thank Metrohm, USA for their support of this project and acknowledge the use of the WVU Shared Research Facility for collection of SEM and AFM images.

Conflicts of Interest: The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper.

References

1. United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC). *World Drug Report 2020*; United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC): Vienna, Austria, 2020. [CrossRef]
2. Smith, J.P.; Metters, J.P.; Irving, C.; Sutcliffe, O.B.; Banks, C.E. Forensic electrochemistry: The electroanalytical sensing of synthetic cathinone-derivatives and their accompanying adulterants in “legal high” products. *Analyst* **2014**, *139*, 389–400. [CrossRef]
3. Gibbons, S.; Zloh, M. An analysis of the ‘legal high’ mephedrone. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 4135–4139. [CrossRef]
4. The European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). *European Drug Report 2020: Trends and Developments*; The European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA): Lisbon, Portugal, 2020. [CrossRef]
5. Simmler, L.; Buser, T.; Donzelli, M.; Schramm, Y.; Dieu, L.-H.; Huwyler, J.; Chaboz, S.; Hoener, M.; Liechti, M. Pharmacological characterization of designer cathinones in vitro. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2013**, *168*, 458–470. [CrossRef] [PubMed]
6. Papaseit, E.; Pérez-Mañá, C.; de Sousa Fernandes Perna, E.B.; Olesti, E.; Mateus, J.; Kuypers, K.P.; Theunissen, E.L.; Fonseca, F.; Torrens, M.; Ramaekers, J.G.; et al. Mephedrone and Alcohol Interactions in Humans. *Front. Pharmacol.* **2020**, *10*, 1588. [CrossRef]
7. United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC). *Recommended Methods for the Identification and Analysis of Synthetic Cathinones in Seized Materials*; United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC): Vienna, Austria, 2020. Available online: https://www.unodc.org/documents/scientific/Recommended_methods_for_the_Identification_and_Analysis_of_Synthetic_Cathinones_in_Seized_Materials-Rev.pdf (accessed on 20 November 2021).

8. Bartlett, C.-A.; Taylor, S.; Fernandez, C.; Wanklyn, C.; Burton, D.; Enston, E.; Raniczkowska, A.; Black, M.; Murphy, L. Disposable screen printed sensor for the electrochemical detection of methamphetamine in undiluted saliva. *Chem. Cent. J.* **2016**, *10*, 3. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. González-Hernández, J.; Alvarado-Gómez, A.L.; Arroyo-Mora, L.E.; Barquero-Quirós, M. Electrochemical determination of novel psychoactive substances by differential pulse voltammetry using a microcell for boron-doped diamond electrode and screen-printed electrodes based on carbon and platinum. *J. Electroanal. Chem.* **2021**, *882*, 114994. [[CrossRef](#)]
10. Dronova, M.; Smolianitski, E.; Lev, O. Electrooxidation of New Synthetic Cannabinoids: Voltammetric Determination of Drugs in Seized Street Samples and Artificial Saliva. *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 4487–4494. [[CrossRef](#)]
11. Nissim, R.; Compton, R.G. Absorptive stripping voltammetry for cannabis detection. *Chem. Cent. J.* **2015**, *9*, 41. [[CrossRef](#)]
12. Goodchild, S.A.; Hubble, L.J.; Mishra, R.K.; Li, Z.H.; Goud, K.Y.; Barfidokht, A.; Shah, R.; Bagot, K.S.; McIntosh, A.J.S.; Wang, J. Ionic Liquid-Modified Disposable Electrochemical Sensor Strip for Analysis of Fentanyl. *Anal. Chem.* **2019**, *91*, 3747–3753. [[CrossRef](#)]
13. Ott, C.; Cunha-Silva, H.; Kuberski, S.L.; Cox, J.A.; Arcos-Martínez, M.J.; Arroyo-Mora, L.E. Electrochemical detection of fentanyl with screen-printed carbon electrodes using square-wave adsorptive stripping voltammetry for forensic applications. *J. Electroanal. Chem.* **2020**, *873*, 114425. [[CrossRef](#)]
14. Elbardisy, H.M.; Foster, C.W.; Cumba, L.; Antonides, L.H.; Gilbert, N.; Schofield, C.J.; Belal, T.S.; Talaat, W.; Sutcliffe, O.B.; Daabees, H.G.; et al. Analytical determination of heroin, fentanyl and fentalogues using high-performance liquid chromatography with diode array and amperometric detection. *Anal. Methods* **2019**, *11*, 1053–1063. [[CrossRef](#)]
15. Alvarado-Gómez, A.L.; Alonso-Lomillo, M.A.; Dominguez-Renedo, O.; Arcos-Martínez, M.J. A Chronoamperometric Screen Printed Carbon Biosensor Based on Alkaline Phosphatase Inhibition for W(VI) Determination in Water, Using 2-Phospho-L-Ascorbic Acid Trisodium Salt as a Substrate. *Sensors* **2015**, *15*, 2232–2243. [[CrossRef](#)]
16. Ferrari, A.G.-M.; Rowley-Neale, S.J.; Banks, C.E. Screen-printed electrodes: Transitioning the laboratory in-to-the field. *Talanta Open* **2021**, *3*, 100032. [[CrossRef](#)]
17. Waddell, S.; Fernandez, C.; Inverarity, C.; Prabhu, R. Extending the capability of forensic electrochemistry to the novel psychoactive substance benzylpiperazine. *Sens. Bio-Sens. Res.* **2017**, *13*, 28–39. [[CrossRef](#)]
18. Pinzaru, S.C.; Pavel, I.; Leopold, N.; Kiefer, W. Identification and characterization of pharmaceuticals using Raman and surface-enhanced Raman scattering. *J. Raman Spectrosc.* **2004**, *35*, 338–346. [[CrossRef](#)]
19. Omar, J.; Slowikowski, B.; Guillou, C.; Reniero, F.; Holland, M.; Boix, A. Identification of new psychoactive substances (NPS) by Raman spectroscopy. *J. Raman Spectrosc.* **2019**, *50*, 41–51. [[CrossRef](#)]
20. Fortuni, B.; Fujita, Y.; Ricci, M.; Inose, T.; Aubert, R.; Lu, G.; Hutchison, J.A.; Hofkens, J.; Latterini, L.; Uji-I, H. A novel method for in situ synthesis of SERS-active gold nanostars on polydimethylsiloxane film. *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 5121–5124. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Mahmoud, A.Y.F.; Rusin, C.J.; McDermott, M.T. Gold nanostars as a colloidal substrate for in-solution SERS measurements using a handheld Raman spectrometer. *Analyst* **2020**, *145*, 1396–1407. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Tian, F.; Bonnier, F.; Casey, A.; Shanahan, A.E.; Byrne, H.J. Surface enhanced Raman scattering with gold nanoparticles: Effect of particle shape. *Anal. Methods* **2014**, *6*, 9116–9123. [[CrossRef](#)]
23. Chen, K.-H.; Pan, M.-J.; Jargalsaikhan, Z.; Ishdorj, T.-O.; Tseng, F.-G. Development of Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS)-Based Surface-Corrugated Nanopillars for Biomolecular Detection of Colorectal Cancer. *Biosensors* **2020**, *10*, 163. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Herrera, G.M.; Padilla, A.C.; Hernandez-Rivera, S.P. Surface Enhanced Raman Scattering (SERS) Studies of Gold and Silver Nanoparticles Prepared by Laser Ablation. *Nanomaterials* **2013**, *3*, 158–172. [[CrossRef](#)]
25. Stevenson, H.; Bacon, A.; Joseph, K.M.; Gwandaru, W.R.W.; Bhide, A.; Sankhala, D.; Dhamu, V.N.; Prasad, S. A Rapid Response Electrochemical Biosensor for Detecting Thc In Saliva. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 12701. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Han, S.; Hong, S.; Li, X. Effects of cations and anions as aggregating agents on SERS detection of cotinine (COT) and trans-3'-hydroxycotinine (3HC). *J. Colloid Interface Sci.* **2013**, *410*, 74–80. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Sivashanmugan, K.; Squire, K.; Tan, A.; Zhao, Y.; Kraai, J.A.; Rorrer, G.L.; Wang, A.X. Trace Detection of Tetrahydrocannabinol in Body Fluid via Surface-Enhanced Raman Scattering and Principal Component Analysis. *ACS Sens.* **2019**, *4*, 1109–1117. [[CrossRef](#)]
28. Urcuyo, R.; Cortes, E.; Rubert, A.A.; Benitez, G.; Montero, M.L.; Tognalli, N.G.; Fainstein, A.; Vela, M.E.; Salvarezza, R.C. Aromatic and Aliphatic Thiol Self-Assembled Monolayers on Au: Anchoring and Delivering Copper Species. *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115*, 24707–24717. [[CrossRef](#)]
29. Martín-Yerga, D.; Pérez-Junquera, A.; González-García, M.B.; Perales-Rondon, J.V.; Heras, A.; Colina, A.; Hernández-Santos, D.; Fanjul-Bolado, P. Quantitative Raman spectroelectrochemistry using silver screen-printed electrodes. *Electrochim. Acta* **2018**, *264*, 183–190. [[CrossRef](#)]
30. Zhao, L.; Blackburn, J.; Brosseau, C.L. Quantitative Detection of Uric Acid by Electrochemical-Surface Enhanced Raman Spectroscopy Using a Multilayered Au/Ag Substrate. *Anal. Chem.* **2014**, *87*, 441–447. [[CrossRef](#)]
31. Ibáñez, D.; Pérez-Junquera, A.; González-García, M.B.; Hernández-Santos, D.; Fanjul-Bolado, P. Spectroelectrochemical elucidation of B vitamins present in multivitamin complexes by EC-SERS. *Talanta* **2020**, *206*, 120190. [[CrossRef](#)]

32. Martín-Yerga, D.; Pérez-Junquera, A.; Hernández-Santos, D.; Fanjul-Bolado, P. In situ Activation of Thick-film Disposable Copper Electrodes for Sensitive Detection of Malachite Green Using Electrochemical Surface-enhanced Raman Scattering (EC-SERS). *Electroanalysis* **2018**, *30*, 1095–1099. [CrossRef]
33. Moldovan, R.; Vereshchagina, E.; Milenko, K.; Iacob, B.-C.; Bodoki, A.E.; Falamas, A.; Tosa, N.; Muntean, C.M.; Farcău, C.; Bodoki, E. Review on combining surface-enhanced Raman spectroscopy and electrochemistry for analytical applications. *Anal. Chim. Acta* **2021**, 339250. [CrossRef]
34. Hernández, S.; Perales-Rondon, J.V.; Heras, A.; Colina, A. Electrochemical SERS and SOERS in a single experiment: A new methodology for quantitative analysis. *Electrochim. Acta* **2020**, *334*, 135561. [CrossRef]
35. Wu, D.-Y.; Li, J.-F.; Ren, B.; Tian, Z.-Q. Electrochemical surface-enhanced Raman spectroscopy of nanostructures. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 1025–1041. [CrossRef]
36. Wu, W.; Liu, L.; Dai, Z.; Liu, J.; Yang, S.; Zhou, L.; Xiao, X.; Jiang, C.; Roy, V.A. Low-Cost, Disposable, Flexible and Highly Reproducible Screen Printed SERS Substrates for the Detection of Various Chemicals. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, srep10208. [CrossRef] [PubMed]
37. Dendisová, M.; Němečková, Z.; Člupek, M.; Prokopec, V. EC-SERS study of phenolic acids sorption behavior on Au, Ag and Cu substrates—Effect of applied potential and metal used. *Appl. Surf. Sci.* **2019**, *470*, 716–723. [CrossRef]
38. Li, D.; Li, D.-W.; Fossey, J.S.; Long, Y.-T. Portable Surface-Enhanced Raman Scattering Sensor for Rapid Detection of Aniline and Phenol Derivatives by On-Site Electrostatic Preconcentration. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 9299–9305. [CrossRef]
39. Robinson, A.M.; Harroun, S.G.; Bergman, J.; Brosseau, C.L. Portable Electrochemical Surface-Enhanced Raman Spectroscopy System for Routine Spectroelectrochemical Analysis. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 1760–1764. [CrossRef]
40. Bindesri, S.D.; Jebailey, R.; Albarghouthi, N.; Pye, C.C.; Brosseau, C.L. Spectroelectrochemical and computational studies of tetrahydrocannabinol (THC) and carboxy-tetrahydrocannabinol (THC-COOH). *Analyst* **2020**, *145*, 1849–1857. [CrossRef]
41. Horcas, I.; Fernández, R.; Gómez-Rodríguez, J.M.; Colchero, J.; Gomez-Herrero, J.; Baro, A.M. WSXM: A software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology. *Rev. Sci. Instrum.* **2007**, *78*, 013705. [CrossRef]
42. ChemAxon. Online Platform for Chemical Calculations. 2021. Available online: <https://chemicalize.com/app/calculation> (accessed on 1 March 2021).
43. Zhang, W.; Bas, A.D.; Ghali, E.; Choi, Y. Passive behavior of gold in sulfuric acid medium. *Trans. Nonferrous Met. Soc. China* **2015**, *25*, 2037–2046. [CrossRef]
44. Burke, L.D.; Nugent, P.F. The electrochemistry of gold: I the redox behaviour of the metal in aqueous media. *Gold Bull.* **1997**, *30*, 43–53. [CrossRef]
45. Vilas-Boas, Â.; Valderrama, P.; Fontes, N.; Geraldo, D.; Bento, F. Evaluation of total polyphenol content of wines by means of voltammetric techniques: Cyclic voltammetry vs. differential pulse voltammetry. *Food Chem.* **2019**, *276*, 719–725. [CrossRef] [PubMed]
46. Hernandez, S.; Perales-Rondon, J.V.; Arnaiz, A.; Perez-Estebanez, M.; Gomez, E.; Colina, A.; Heras, A. Determination of nicotinamide in a multivitamin complex by electrochemical-surface enhanced Raman spectroscopy. *J. Electroanal. Chem.* **2020**, *879*, 114743. [CrossRef]
47. Cortés, E.; Tognalli, N.G.; Fainstein, A.; Vela, M.E.; Salvarezza, R.C. Ag-modified Au nanocavity SERS substrates. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11*, 7469–7475. [CrossRef] [PubMed]
48. Pilot, R.; Signorini, R.; Durante, C.; Orian, L.; Bhamidipati, M.; Fabris, L. A Review on Surface-Enhanced Raman Scattering. *Biosensors* **2019**, *9*, 57. [CrossRef] [PubMed]
49. Moores, A.; Goettmann, F. The plasmon band in noble metal nanoparticles: An introduction to theory and applications. *New J. Chem.* **2006**, *30*, 1121–1132. [CrossRef]
50. Mabbott, S.; Correa, E.; Cowcher, D.P.; Allwood, J.W.; Goodacre, R. Optimization of Parameters for the Quantitative Surface-Enhanced Raman Scattering Detection of Mephedrone Using a Fractional Factorial Design and a Portable Raman Spectrometer. *Anal. Chem.* **2012**, *85*, 923–931. [CrossRef] [PubMed]
51. Christie, R.; Horan, E.; Fox, J.; O'Donnell, C.; Byrne, H.J.; McDermott, S.; Power, J.; Kavanagh, P. Discrimination of cathinone regioisomers, sold as 'legal highs', by Raman spectroscopy. *Drug Test. Anal.* **2014**, *6*, 651–657. [CrossRef]
52. Halouzka, V.; Halouzskova, B.; Jirovsky, D.; Hemzal, D.; Ondra, P.; Siranidi, E.; Kontos, A.G.; Falaras, P.; Hrbac, J. Copper nanowire coated carbon fibers as efficient substrates for detecting designer drugs using SERS. *Talanta* **2017**, *165*, 384–390. [CrossRef]
53. Lin, Y.K.; Leong, H.Y.; Ling, T.C.; Lin, D.-Q.; Yao, S.-J. Raman spectroscopy as process analytical tool in downstream processing of biotechnology. *Chin. J. Chem. Eng.* **2021**, *30*, 204–211. [CrossRef]
54. Wang, F.; Cao, S.; Yan, R.; Wang, Z.; Wang, D.; Yang, H. Selectivity/Specificity Improvement Strategies in Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Analysis. *Sensors* **2017**, *17*, 2689. [CrossRef] [PubMed]
55. Elie, L.; Elie, M.; Cave, G.; Vetter, M.; Croxton, R.; Baron, M. Microcrystalline testing used in combination with Raman microspectroscopy for absolute identification of novel psychoactive substances. *J. Raman Spectrosc.* **2016**, *47*, 1343–1350. [CrossRef]
56. Farquharson, S.; Brouillette, C.; Smith, W.; Shende, C. A Surface-Enhanced Raman Spectral Library of Important Drugs Associated With Point-of-Care and Field Applications. *Front. Chem.* **2019**, *7*, 706. [CrossRef]
57. Jones, L.E.; Stewart, A.; Peters, K.L.; McNaul, M.; Speers, S.J.; Fletcher, N.C.; Bell, S.E.J. Infrared and Raman screening of seized novel psychoactive substances: A large scale study of >200 samples. *Analyst* **2016**, *141*, 902–909. [CrossRef]

-
58. Stewart, S.P.; Bell, S.E.; Fletcher, N.; Bouazzaoui, S.; Ho, Y.C.; Speers, S.; Peters, K.L. Raman spectroscopy for forensic examination of β -ketophenethylamine “legal highs”: Reference and seized samples of cathinone derivatives. *Anal. Chim. Acta* **2012**, *711*, 1–6. [[CrossRef](#)]
 59. Szaniawska, A.; Kudelski, A. Applications of Surface-Enhanced Raman Scattering in Biochemical and Medical Analysis. *Front. Chem.* **2021**, *9*, 296. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 60. Chang, Y.-C.; Huang, B.-H.; Lin, T.-H. Surface-Enhanced Raman Scattering and Fluorescence on Gold Nanogratings. *Nanomaterials* **2020**, *10*, 776. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 61. de Jong, M.; Slegers, N.; Kim, J.; Van Durme, F.; Samyn, N.; Wang, J.; De Wael, K. Electrochemical fingerprint of street samples for fast on-site screening of cocaine in seized drug powders. *Chem. Sci.* **2016**, *7*, 2364–2370. [[CrossRef](#)]
 62. Olesti, E.; Pujadas, M.; Papaseit, E.; Pérez-Mañá, C.; Pozo, Ó.J.; Farré, M.; de la Torre, R. GC–MS Quantification Method for Mephedrone in Plasma and Urine: Application to Human Pharmacokinetics. *J. Anal. Toxicol.* **2016**, *41*, 100–106. [[CrossRef](#)]
 63. Ayres, T.C.; Bond, J.W. A chemical analysis examining the pharmacology of novel psychoactive substances freely available over the internet and their impact on public (ill)health. Legal highs or illegal highs? *BMJ Open* **2012**, *2*, e000977. [[CrossRef](#)]

6.3 Apartado III: Biosensor enzimático

Biosensor enzimático para la determinación de fentanilo en orina

6.3.1 Resumen

El fentanilo es un potente opioide sintético que se utiliza en medicina por sus propiedades analgésicas y anestésicas. No obstante, ciertas nuevas rutas de administración dirigidas al consumo ilegal con fines recreativos representan una amenaza importante para la salud pública, principalmente, por el creciente mal uso y abuso de esta sustancia y de sus derivados. Como respuesta a esta problemática, surge el interés de una rápida determinación cualitativa y cuantitativa de fentanilo en biofluidos.

En este estudio se propuso un nuevo biosensor enzimático basado en la técnica de voltamperometría cíclica de redisolución por adsorción como un dispositivo de bajo costo, fiable y eficiente para la determinación de fentanilo en muestras de orina. El prototipo del sensor se desarrolló con electrodos serigrafados desechables de carbono, cuya superficie fue modificada con nanotubos de carbono de pared múltiple y con la enzima monomérica citocromo *c*. El barrido electroquímico del fentanilo exhibió una onda anódica bien definida alrededor de 0.66 V con respecto al pseudoelectrodo de referencia de plata. Se optimizaron las condiciones experimentales para obtener la mejor respuesta analítica y se aplicó un análisis de regresión lineal con estándares de concentración crecientes para estimar los principales parámetros de desempeño.

El análisis de los resultados mostró un método simple con un amplio rango de linealidad, alta sensibilidad, bajos límites de detección (0.086 µg/mL) y de cuantificación y una precisión satisfactoria (RSD = 2.9%). La factibilidad y la aplicabilidad del método voltamperométrico se evaluaron en muestras de orina enriquecidas con fentanilo a dos niveles de concentración. Los datos obtenidos por las curvas de calibración de adiciones estándar indicaron recuperaciones del 92% y del 100%.

6.3.2 Introducción

El OEDT hace referencia a las drogas emergentes como NSP que se fabrican mediante un proceso químico en el que los principales componentes psicoactivos no se derivan de fuentes naturales [215]. En los últimos años, el número de NSP encontradas a nivel mundial se ha estabilizado en alrededor de 550 sustancias distintas. A pesar de esto, surgen continuamente nuevos compuestos químicos como los opioides sintéticos, lo que plantea serios problemas de salud para la sociedad en general [1].

La cantidad de NSP con efectos opioides ha aumentado significativamente; situación que agrava la crisis de los opioides que libran algunos países como los de América del Norte [9]. Una de las principales causas de este problema es el aumento de los medicamentos opioides recetados para aliviar el dolor crónico. La potencia analgésica y los bajos costos de producción de los opioides sintéticos, particularmente el fentanilo, los convierten en un negocio atractivo para los proveedores de drogas, quienes facilitan nuevas vías de administración para el consumo ilegal con fines recreativos [10].

El fentanilo farmacéutico es un agonista de los receptores opioides empleado para tratar el dolor. Posee efectos psicotrópicos muy potentes –hasta 100 veces más fuerte que la morfina– aptos para la comercialización y el uso ilegal [216–218]. Se ha visto una tendencia al aumento en los casos de sobredosis por la propagación de productos adulterados con fentanilo o con sus análogos, la mayoría de ellos sin información importante como el contenido y la concentración [219]. El fentanilo usualmente se mezcla con heroína, cocaína y metanfetaminas o se vende como heroína pura o incluso como medicamentos falsificados [10,220].

Los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos estiman que en el período de 12 meses que finalizó en octubre de 2021, más de ciento cinco mil personas murieron por sobredosis con drogas. El 66% de esas muertes se relacionaron directamente con el uso de opioides sintéticos como el fentanilo [221]. La razón principal del gran número de muertes atribuidas a esta

sustancia es que la dosis letal (aproximadamente 2 mg) es pequeña en comparación con otras drogas [222].

La espectrometría de masas (MS) junto con las técnicas de separación incluyendo GC-MS y LC-MS, son las técnicas de análisis más empleadas para determinar fentanilo y sus análogos en los laboratorios forenses [132,223–227]. Sin embargo, su falta de versatilidad para el análisis de campo ha motivado a la comunidad científica a emplear otras herramientas analíticas como las metodologías electroquímicas. Estos procedimientos se adaptan bien a las condiciones de campo y brindan resultados precisos con bajos límites de detección.

Investigaciones previas sugieren el uso de sensores electroquímicos para el análisis de fentanilo [160,162,228,229]; incluso algunos estudios proponen los posibles mecanismos de oxidación [161,230]. A pesar de esto –hasta donde tenemos conocimiento– aún no se han reportado biosensores catalíticos para la determinación de fentanilo. Estos dispositivos transducen eventos bioquímicos como mecanismos de inhibición, activación o catálisis enzimática, lo que permite una mayor selectividad analítica. Desde que se diseñó el primer biosensor para analizar oxígeno y dióxido de carbono en sangre [104], se han desarrollado varios tipos de biosensores para diferentes propósitos, incluido el análisis de sustancias psicoactivas [231–233].

El citocromo *c* (cyt *c*) es una hemoproteína con un centro de hierro de valencia intercambiable, funcionalmente involucrada en la cadena de transporte de electrones, ubicada en la membrana interna mitocondrial de las células [234,235]. Se encuentra entre las proteínas más investigadas debido a su pequeño tamaño (12.26 kDa), a la estructura simple y a la alta estabilidad en diferentes medios.

El grupo hemo catalítico del cyt *c* tiene capacidad para dirigir el transporte de electrones en metaloproteínas [236]. Las propiedades físicas y químicas de esta enzima han sido de considerable interés en el campo de la química electroanalítica para funcionalizar diferentes materiales para electrodos de trabajo o para mediar la transferencia de carga con otras proteínas redox [237,238].

Los biosensores basados en *cyt c* han tenido éxito en la determinación de analitos como peróxido de nitrógeno, óxido nítrico, oxianones de halógenos, ácido ascórbico y L-cisteína [239]. En este estudio, la enzima mencionada se utilizó en la construcción del biosensor voltamperométrico como un catalizador en la electrooxidación del fentanilo (ver Figura 21) a través de la técnica de CV de redisolución anódica por adsorción. Para ello se funcionalizó la superficie del electrodo de trabajo con nanotubos de carbono de pared múltiple [171,240], seguido de la inmovilización covalente de la enzima [108]. Una vez optimizadas las condiciones de medición, el dispositivo se utilizó para la determinación electroquímica de fentanilo en muestras de orina enriquecidas con fentanilo.

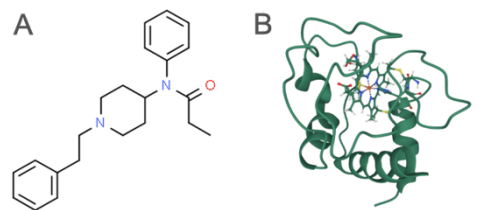


Figura 21 Estructura química del fentanilo y representación de la estructura proteica del citocromo *c*.

(a) N-fenil-N-[1-(2-feniletíl)piperidin-4-il]propenamida (fentanilo). (b) Cyt *c* (Protein Data Bank code 2N9), www.rcsb.org [241].

6.3.3 Publicación científica

Microchimica Acta (2022) 189:483
<https://doi.org/10.1007/s00604-022-05578-x>

ORIGINAL PAPER



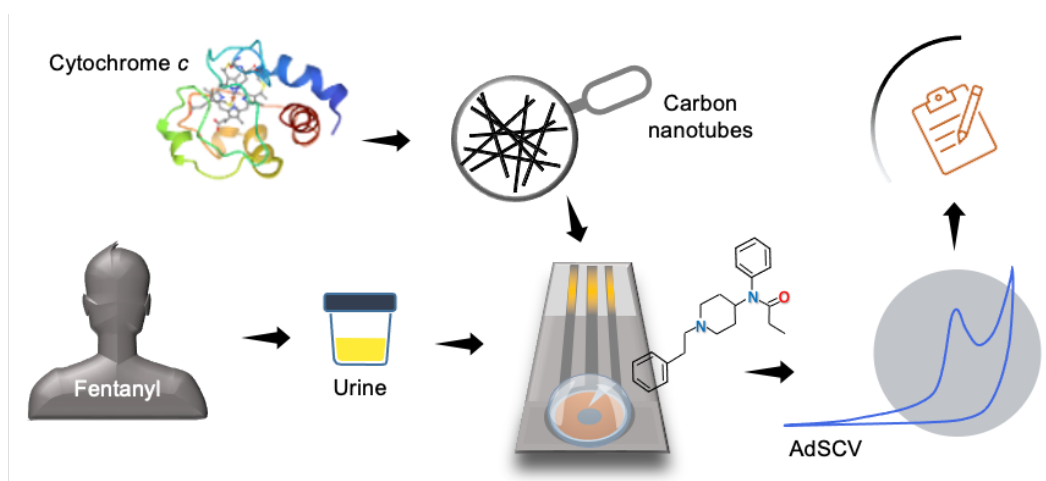
Electrochemical biosensor for quantitative determination of fentanyl based on immobilized cytochrome *c* on multi-walled carbon nanotubes modified screen-printed carbon electrodes

Jerson González-Hernández^{1,2} · Guillermo Moya-Alvarado² · Ana Lorena Alvarado-Gómez¹ · Roberto Urcuyo^{1,2} · Miriam Barquero-Quirós¹ · María Julia Arcos-Martínez³

Received: 22 September 2022 / Accepted: 14 November 2022

© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Austria, part of Springer Nature 2022

Graphical abstract





Electrochemical biosensor for quantitative determination of fentanyl based on immobilized cytochrome *c* on multi-walled carbon nanotubes modified screen-printed carbon electrodes

Jerson González-Hernández^{1,2} · Guillermo Moya-Alvarado² · Ana Lorena Alvarado-Gómez¹ · Roberto Urcuyo^{1,2} · Miriam Barquero-Quirós¹ · María Julia Arcos-Martínez³

Received: 22 September 2022 / Accepted: 14 November 2022

© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Austria, part of Springer Nature 2022

Abstract

Fentanyl is a powerful synthetic opioid used to treat severe pain. New administration routes toward its illegal consumption for recreational purposes pose a growing threat to public health, either due to misuse or abuse of this substance. As a result, the rapid qualitative and quantitative determination of fentanyl in biofluids is of great interest. A novel enzymatic biosensor based on adsorptive-stripping cyclic voltammetry is proposed as a cost-effective, reliable, and efficient device for fentanyl determination in urine samples. Disposable screen-printed carbon electrodes modified with multi-walled carbon nanotubes and cytochrome *c* were used to develop the testing platform. The electrochemical behavior of fentanyl exhibited a well-defined anodic wave around 0.66 V vs. pseudo reference electrode. The experimental conditions were optimized to obtain the best analytical response, and linear regression analysis of increasing concentration standards was applied to estimate the performance parameters. The results suggest a simple method with a wide linearity range, high sensitivity, low limits of detection (0.086 µg/mL) and quantification, and satisfactory precision (2.9% RSD). The feasibility and applicability of the voltammetric approach were assessed by fentanyl-spiked urine samples by standard additions calibration curves in two levels of enrichment with an accuracy of 92% and 100%.

Keywords Fentanyl · Cytochrome *c* · Enzymatic biosensor · Carbon nanotubes · Adsorptive-stripping cyclic voltammetry

Introduction

Synthetic drugs constitute one of the most significant drug problems worldwide. The European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA) strictly refers to these chemical compounds as new psychoactive substances (NPS) that are manufactured through a chemical process, in which the main psychoactive components are not derived from natural sources [1]. In recent years, the number of NPS

found globally has been stabilizing slightly at more than 500 substances. Despite this, potent new cannabinoids and new synthetic opioids are still emerging, posing health and social threats [2].

The amount of NPS with opioid effects has continued to grow in the last years, worsening the opioid crisis [3]. One of the main causes of the current overdose problem is the increase in prescription opioid drugs to relieve chronic pain. The analgesic potency and low production costs of synthetic opioids, particularly fentanyl, make them an attractive business for drug suppliers, facilitating new administration routes for their illegal consumption for recreational purposes [4].

The US Centers for Disease Control and Prevention (CDC) estimates that in the 12-month period ending in October 2021, more than 105,000 people died of drug overdoses, with 66% of those deaths related to synthetic opioids such as fentanyl [5]. The main reason for the large number of deaths attributed to this substance is because the lethal dose is small compared to other opioids. Pharmaceutical fentanyl is an opioid receptor agonist developed to treat severe

✉ Jerson González-Hernández
jerson.gonzalez@ucr.ac.cr

¹ Centro de Investigación en Electroquímica Y Energía Química (CELEQ), Universidad de Costa Rica, San José 11501-2060, Costa Rica

² Escuela de Química, Universidad de Costa Rica, San José 11501-2060, Costa Rica

³ Departamento de Química, Universidad de Burgos, Pza. Misael Bañuelos S/N, 09001 Burgos, Spain

pain (Scheme 1A); however, due to its high potency—up to 100 times stronger than morphine—it is also made and used illegally [6–8].

The accidental overdose crisis is aggravated by the rapid emergence of products containing fentanyl and its analogs in street drug markets because of the variable quantity and potency of the active components [9]. Many users and dealers are unaware of what they are handling because fentanyl and other opioids are frequently mixed with heroin, cocaine, and methamphetamines, or they are sold as heroin or even as counterfeit prescription drugs [4, 10]. This ongoing fentanyl outbreak poses new challenges for authorities, such as international controls involving efficient analysis methods that can be applied in the laboratory or in the field in order to take timely actions.

Typically, mass spectrometry (MS) coupled with separative techniques, including gas (GC–MS) and liquid chromatography (LC–MS), is the most common fentanyl and its analogs analysis techniques in forensic laboratories [11–15]. The high sensitivity, selectivity, and accuracy make possible to identify a large number of target substances and their derivatives with a reliable confirmation capacity [16]. The main disadvantage of these powerful analytical platforms is that they are restricted to a laboratory environment due to the lack of portability features. In addition, multi-stage sample preparation requires time-consuming analysis, and the maintenance costs are relatively high [17].

Recently, several alternative drug testing approaches, such as electrochemical screening technologies, have been suggested to quickly respond to a growing need to streamline the delivery of results [18, 19]. New low-cost miniaturized sensing devices capable of real-time monitoring, analyzing microquantities of testing material, and with minimum waste generation have opened new opportunities within the forensic and toxicology communities through electrochemical techniques, as we have reported in previous studies [20, 21]. These procedures adapt well to the required field conditions, offering accurate screening opportunities with low detection

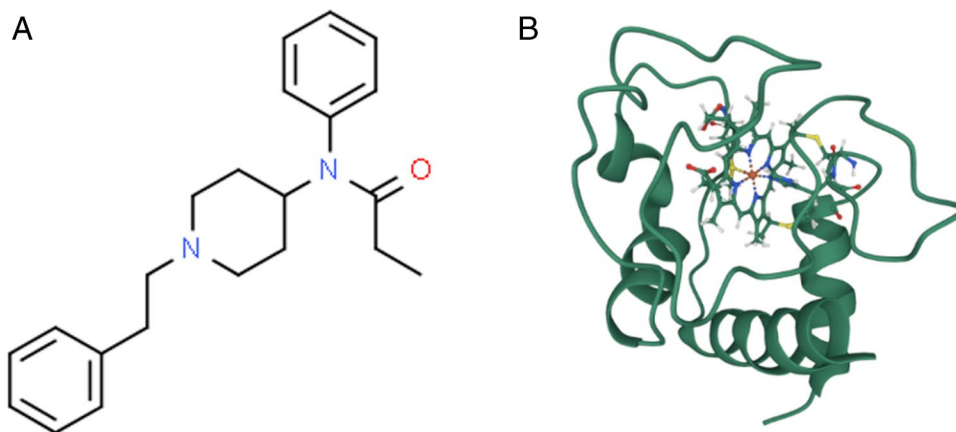
limits to provide on-site decisions to law enforcement before sending evidence to the forensic lab for later analysis and processing.

Electrochemical sensors based on screen-printed electrodes are designed from functionalizable working electrodes that can be modified with materials such as biomolecules, metallic nanoparticles, and carbon-base nanomaterials in order to improve sensitivity by increasing the surface area of the working electrodes [22]. For example, multi-wall carbon nanotubes have been extensively studied as a multifunctional scaffold on enzymatic biosensors due to their excellent conduction and electrocatalytic properties [23].

Previous research suggests the use of electrochemical sensors for the analysis of fentanyl [24–27]; some studies even propose the possible oxidation mechanisms [28, 29]. However, catalytic biosensors for fentanyl determination have not yet been reported to the best of our knowledge. These devices transduce biochemical events as mechanisms of inhibition, activation, or enzymatic catalysis, allowing greater analytical selectivity which is considered a challenge in electrochemical methods. Since the first biosensor was designed to analyze oxygen and carbon dioxide blood [30], various types of biosensors have been developed for different purposes, including drug analysis [31–33].

Cytochrome *c* (cyt *c*) is a heme protein in interconvertible oxidized and reduced forms (Scheme 1B), functionally involved in the respiratory electron transport chain, located in healthy cells in the mitochondrial inner membrane [34, 35]. It is among the most investigated proteins due to its small size (12.26 kDa), simple structure, and high stability. Its catalytic heme group has been widely studied for its ability to direct electron transport in typical metalloproteins [36]. This enzyme's physical and chemical properties have been of considerable interest in the field of electroanalytical chemistry to functionalize different materials for working electrodes or to mediate other redox proteins [37, 38]. Cyt *c*-based biosensors are considered a promising tool in analytical chemistry. Their applications have been successful

Scheme 1 Chemical structures of the target synthetic opioid and the biological molecule used to design the biosensor. **A** N-phenyl-N-[1-(2-phenylethyl)piperidin-4-yl]propanamide ($C_{22}H_{28}N_2O$, fentanyl). **B** Cytochrome *c* (Protein Data Bank code 2N9J, www.rcsb.org) [42]



in the determination of analytes such as nitrogen peroxide, nitric oxide, halogen oxyanion, ascorbic acid, and l-cysteine [39]. In this study, *cyt c* has been utilized as a catalyst in the electrooxidation of fentanyl.

A voltammetric biosensor is presented for the first time herein to provide a new analytical tool for forensic cases in addressing the challenging global opioid crisis. This work aimed to develop a new rapid and low-cost method for determining fentanyl in biological samples, using the catalytic effect of the *cyt c* through the adsorptive-stripping cyclic voltammetry (AdSCV) technique. The enzymatic biosensor was built by a known functionalization of the working electrode surface of the SPE with multi-walled carbon nanotubes [40], followed by the covalent immobilization of the water-soluble enzyme *cyt c* [41]. The catalytic biosensor was further applied for selective and sensitive electrochemical determination of fentanyl in simulated urine samples.

Experimental

Reagents and materials

The Analytical Reference Standard of fentanyl ($C_{22}H_{28}N_2O$) solution in methanol was purchased from Sigma-Aldrich (Cerilliant®). The solution in methanol was evaporated using a continuous flow of nitrogen (N_2 , ultra-high purity). Fentanyl citrate ($C_{22}H_{28}N_2O \cdot C_6H_8O_7$) in the form of crystalline powder was supplied by Kern Pharma (99.86%). Both standards of fentanyl were reconstituted in phosphate buffer 0.1 M at pH 7.5 as supporting electrolyte.

Phosphate buffer solution at 0.1 M was prepared using sodium phosphate monobasic dihydrate ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, 99.5%, Merck) and sodium phosphate dibasic dihydrate ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, 99.1%, Fisher Scientific), and the pH was adjusted with micro-pearls of sodium hydroxide for analysis (NaOH, Acros Organics).

Britton Robinson buffer solution was prepared at 0.1 M with boric acid (H_3BO_3 , $\geq 99.5\%$), phosphoric acid (H_3PO_4 , 85%, ACS reagent), and acetic acid Suprapur® (CH_3COOH , 99.8%), and the pH was adjusted with NaOH Suprapur® solution 1 M. These reagents were purchased from Merck.

Tris-HCl buffer solution at 0.1 M was formed by tris(hydroxymethyl)aminomethane ($NH_2C(CH_2OH)_3$, 99.8%, Sigma-Aldrich) and adjusted to the desired pH value with hydrochloric acid (HCl, 37%, VWR Chemicals, AnalaR® NORMAPUR®).

Cytochrome *c* from bovine heart (*cyt c*, $\geq 95\%$), bovine serum albumin (BSA, fraction V, $\geq 95\%$), and glutaraldehyde solution (grade II, 25% in H_2O) were obtained from Sigma-Aldrich.

Cyt c stock solution at 1.2% weight by volume was made by dissolving 10 mg of the enzyme in 830 μ L of phosphate buffer 0.1 M at pH 7.0, BSA at 0.75% weight by volume was prepared with 75 mg of BSA in 10 mL of deionized water, and glutaraldehyde was diluted at 2.5% by volume in deionized water.

Multi-walled carbon nanotubes (MWCNT, diameter 110–170 nm, length 7–9 μ m, $> 90\%$) were purchased from Sigma-Aldrich.

The diluted suspension of MWCNT was carried out using the nitric acid oxidation technique. The appropriated amount of MWCNT was weighed and added into 25 mL of HNO_3 (69%, Merck) 2.5 M in a flask. The mixture solution at 0.01% was placed in an ultrasonic bath at 50 °C for 3 h [40].

Stock standard solutions of cocaine hydrochloride ($C_{17}H_{21}NO_4 \cdot HCl$, Sigma-Aldrich), pseudoephedrine ($C_{10}H_{15}NO$, Sigma-Aldrich), and caffeine ($C_8H_{10}N_4O_2$, Sigma-Aldrich) were prepared by dissolving the adequate amount of each compound in Milli-Q water and diluting it with phosphate buffer solution at pH 7.0.

All solutions were prepared with deionized water of resistivity 18.2 $M\Omega$ -cm supplied by TKA (inverse osmosis with a UV lamp irradiation system).

All the materials were directly used as received without further purification.

Screen-printed carbon (SPC) electrodes were purchased from DropSens (DRP-110 Metrohm, WE carbon, CE carbon, and RE silver pseudo-reference electrode).

Instrumentation

Voltammetric measurements were conducted using a Metrohm Autolab potentiostat/galvanostat PGSTAT Echo Chemie128 N and PGSTAT 204 (Utrecht, The Netherlands), both instruments controlled by the electrochemistry software package Nova v2.1.4.

The pH values were adjusted with pH-meters Mettler Toledo™ (Schwerzenbach, Switzerland) and sensION™ (CO, USA).

Field emission scanning electron microscopy (FE-SEM) surface images were acquired on a ZEISS Sigma 300 operating at 15 kV (Oberkochen, Germany). The biosensor assembling process was imaged by FE-SEM to examine the surfaces at magnification from 40 \times to 7650 \times .

Biosensor preparation

The chemically modified electrodes to form MWCNT/SPC were prepared by dropping 10 μ L of MWCNT dispersion on the working carbon electrode. The drop was allowed to dry out completely at room temperature. Immobilization of *cyt c* over the modified MWCNT/SPC electrode was done by drop-casting 10 μ L of *cyt c*/BSA/glutaraldehyde at a dilution

ratio of 2:1:1 [41, 43]. Subsequently, the sensor was incubated for 2 h at room temperature to produce cross-linked enzyme aggregates on the working electrode. The Cyt c /MWCNT/SPC biosensor was washed with deionized water several times to remove the non-immobilized excess of enzyme and glutaraldehyde and was kept in the refrigerator at 4 °C in phosphate buffer solution at pH 7.5.

Electrochemical measurements

The Cyt c /MWCNT/SPC biosensor was cleaned and activated by cyclic voltammetry screening (two cycles) recorded in PB buffer at these conditions: the potentials were stepped in 10 mV increments from 0.0 to +1.0 V and at a scan rate of 50 mV/s. This treatment was conducted before any measurement.

Cyclic voltammetric measurements for parameters optimization and fentanyl determinations were performed between 0.0 and 1.0 V, with a step potential of 10 mV and at a scan rate of 100 mV/s.

All electrochemical determinations were performed in a drop of 50 μ L over the enzymatic biofilm, counter electrode, and pseudo-reference electrode at room temperature.

Interference study

The interference effect was assessed in binary solutions considering cocaine, caffeine, and pseudoephedrine as possible interferents. Simulated drug samples were prepared at three different concentration ratios of drug to interferent 1:1, 1:5, and 1:10. Target drug and interferent were mixed into a centrifuge tube in PB buffer solution at pH 7.5 to obtain a fentanyl concentration of 2.0 μ g/mL.

Spiked samples

Urine samples were self-collected from healthy volunteers into a sterile tube. The simulated sample was prepared by spiking drug-free urine to evidence the potential application of a new electrochemical method to determine fentanyl in biological fluids. A micro-aliquot of urine of 150 μ L was spiked with 150 μ L of fentanyl standard solution at 10 μ g/mL (Cerilliant®). A blank sample was prepared by spiking urine with PB buffer at pH 7.5. Standard addition calibration curves were prepared with fentanyl citrate standard solution (Kern Pharma) to assess by triplicate the recovery of the analyte at low and intermediate concentrations of the optimized range.

Results and discussion

Previous studies suggest an electro-oxidation process of fentanyl to norfentanyl which exhibits a voltammogram with two anodic peaks, offering the hypothesis that the second

signal corresponds to the oxidation of the newly secondary amine formed [29, 44]. In this work, a single well-defined peak was observed, likely because there is a selective catalytic effect on the fentanyl oxidation reaction. The voltammogram in Fig. 1 evidenced an electrochemical non-reversible behavior with an anodic peak around 0.66 V on the biomodified working electrode.

Optimization of the analysis conditions

In order to obtain a very sensitive electrochemical response, experimental variables affecting the peak height and definition, such as supporting electrolyte, pH, cyt c concentration, accumulating time, and scan rate, were optimized.

Influence of the adsorption time

The adsorption behavior of the analyte on the Cyt c /MWCNT/SPC biosensor was assessed by an accumulation study at 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 14, 21, and 30 min. Figure 2 shows the relation between the adsorption time of fentanyl and the peak current as an analytical response. A linear increase in the anodic current was found for Cyt c /MWCNT/SPC in the tested range with a change in direction at 10 min. From this accumulation time chosen as the optimum time for the analysis, the slope is slightly lower though saturation is not yet observed. The response for Bare-SPC on this comparative scale was almost constant. The current reached values up to 30 μ A for the longest accumulation time on the enzymatic biosensor, while the same experiment for the Bare-SPC showed a maximum peak current of barely

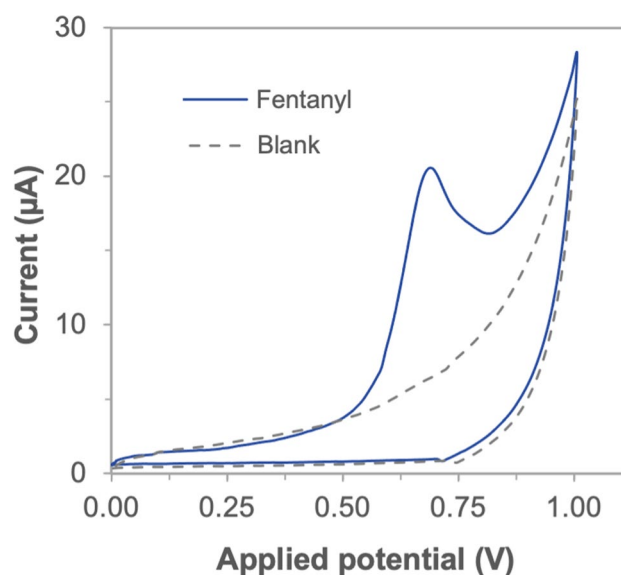


Fig. 1 Cyclic voltammetry profile for fentanyl at 10.0 μ g/mL in PB solution at pH 7.5 recorded using a Cyt c /SPC biosensor. Scan rate 50 mV/s in the positive direction

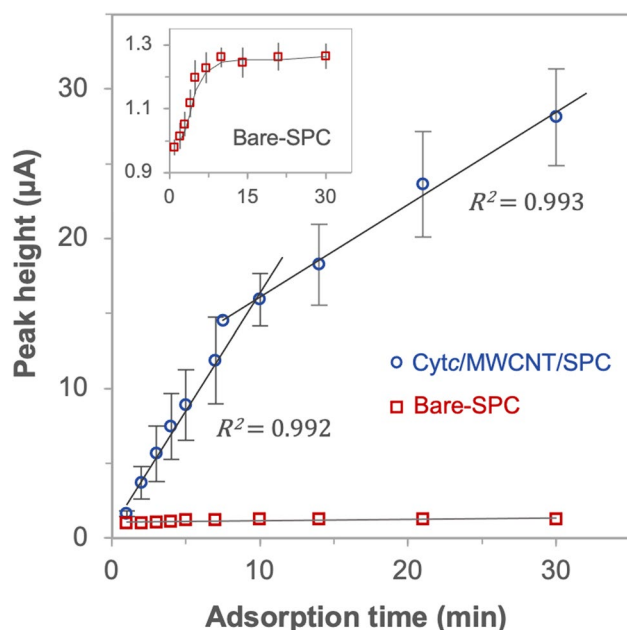


Fig. 2 Influence of the accumulation time on the analytical response for fentanyl at 10.0 $\mu\text{g/mL}$ in PB at pH 7.0 by AdSCV at Cyt *c*/MWCNT/SPC biosensor and Bare-SPC electrode ($n=3$, scan rate: 50 mV/s). Inset plot shows the amplification of the peak current for Bare-SCP electrode

1.25 μA after which the signal was saturated as shown in the inset graph of Fig. 2.

The analytical method is conducted using a drop of 50 μL ; hence, after 30 min of accumulation is not recommendable for sensing on the biosensor since the evaporation is very significant. The abundant fentanyl enrichment on the biosensor surface, driven by an adsorption process, indicates a strong adhesion of the analyte to the cross-linked enzyme matrix and MWCNT likely by hydrophobic interaction at neutral pH [44].

Optimization of the supporting electrolyte

Britton Robinson, Tris-HCl, and phosphate (PB) buffer solutions at pH 7.5 were tested in quintuplicate as supporting electrolyte at room temperature. No statistically significant difference was found for the anodic peak current of fentanyl electro-oxidation at 10.0 $\mu\text{g/mL}$ using different supporting electrolytes. One-way ANOVA reports a P value ≥ 0.05 . Phosphate buffer was chosen to reconstitute the enzyme and conduct the experiments because it is the simplest. Figure S1A shows the analytical response of the biosensor for a 10.0 $\mu\text{g/mL}$ standard screened at different pH values of PB close to the fentanyl pKa reported slightly above 8 at room temperature [45]. The highest current peaks were obtained at pH 7.5 and pH 8.0. Other studies have demonstrated that cyt *c* is thermodynamically stable at least between pH 7.0

and pH 10.0, but at extreme pH values, the structure can undergo conformational changes by the denaturant-induced unfolding [35, 46, 47].

Figure S1B demonstrates a linear relationship between oxidation potential and pH of the electrolyte, in which the potential is inversely proportional to the pH in the range of 7.5 to 8.5 using AdSCV. The slope of the linear regression line tested in triplicate (29 mV by pH unit) suggests an electro-oxidation process based on two electron transfers by the analogy of the Nernst equation [48]. This pH-dependent reduction potential profile is consistent with a redox process governed by the tertiary amine through the N-dealkylation of the piperidine nitrogen in the electro-oxidation of the molecule [29, 49, 50].

Effect of the cyt *c* concentration and stability of the electrochemical response

The amount of cyt *c* enzyme immobilized onto MWCNT/SPC electrodes also influences the recorded anodic peak intensity. Voltammetric measurements were made to evaluate the optimum concentration of drop-casted cyt *c* between 6.0 and 0.8 mg/mL and the stability of the enzymatic biosensor at 4, 24, 48, and 72 h after preparation.

The biosensors tested after 4 h exhibited biofilm detachment during the first measurements. Considering both the stability over time and the intensity of the anodic peak, in Fig. S2, it was observed that biosensors prepared at 3.0 mg/mL of cyt *c* recorded relatively high peaks with a coefficient of variation of 14% for measurements over time. The biosensors at 1.5 mg/mL showed the highest current signals; however, the variability was 24%, which may affect the reproducibility of the method. Based on these results, it was proposed to prepare the disposal biosensors with the enzyme at 3.0 mg/mL and use them in an operational lifetime between 1 and a maximum of 3 days after their preparation.

Effect of the scan rate

The rate of voltage changing over time was explored from 20 to 250 mV/s. Figure 3A shows the voltammetric profile of the scan rate study. The corresponding relationship between peak height and scan rate is shown in Fig. 3B. The observed linear correlation up to 100 mV/s suggests a surface adsorption-controlled kinetic process as shown in previous accumulation experiments [51]. This observation was enough to make the decision to choose an adequate scan rate. In addition, above 100 mV/s the signals become wider, shifting the oxidation potentials toward more positive values.

Table 1 summarizes the optimum conditions for fentanyl analysis, which were selected from the studies described above. These conditions were used for the analysis of both

Fig. 3 **A** AdSCV profiles of fentanyl at 10.0 $\mu\text{g/mL}$ in PB solution at pH 7.5 recorded on Cyt c /MWCNT/SPC at scan rates ranging from 20 to 250 mV/s in the positive direction. **B** Plot of the linear relationship between the anodic peak current and scan rate

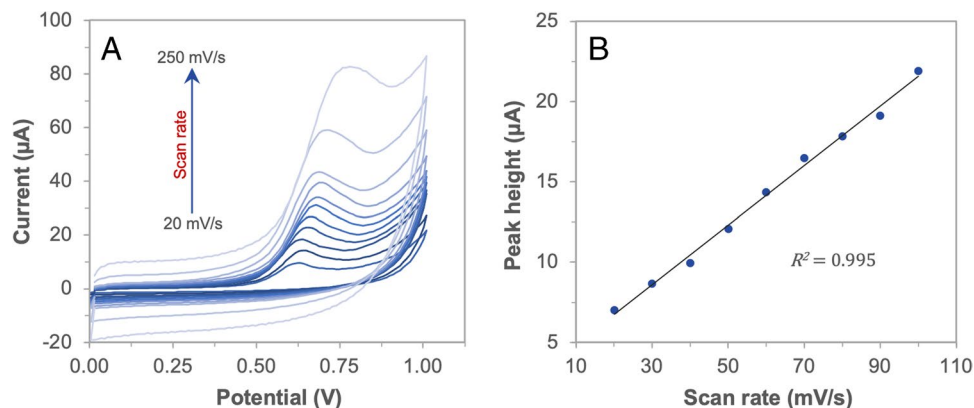


Table 1 Summary of parameter optimization for the electrochemical method based on sensing at Cyt c /MWCNT/SPC biosensor by adsorptive-stripping cyclic voltammetry

Assessment parameter	Optimum value
Accumulation time (min)	10
pH	7.5
Cyt c concentration (mg/mL)	3.0
Biosensor stability (h)	24–72
Scan rate (mV/s)	100

the analytical performance parameters and the simulated samples.

Biosensor characterization

The disposable device was constructed from the modification of an SPC electrode. The biosensor assembling was characterized by FE-SEM images. Analysis was carried out

on the bare screen-printed carbon (Bare-SPC) electrode surface and after drop-casting carbon nanotubes at 0.01% and cyt c enzyme solution at 0.30% weight by volume. Figure 4A depicts the rough surface of the pristine working electrode as a control. The surface modification was performed with MWCNT since they have been widely used in electrochemical sensors for their ability to improve the signal resolution by increasing the surface-active area [43–45]. In this work, the carbon nanotubes were used mainly because they significantly improved the anchoring of the enzyme, preventing the biofilm from detaching and providing greater stability to the biosensor. Figure 4B demonstrates that MWCNT aggregates were drop-casted on the carbon electrode. FE-SEM images at higher magnification are seen in the supplementary information (Fig. S3). Finally, a drop of cyt c solution was drop-casted on the modified MWCNT/SPC electrode, as an essential component in electron transfer through redox reactions. The immobilization of the enzyme to the solid matrix was done by cross-linking reaction with glutaraldehyde and BSA forming a homogeneous thin film as shown in Fig. 4C.

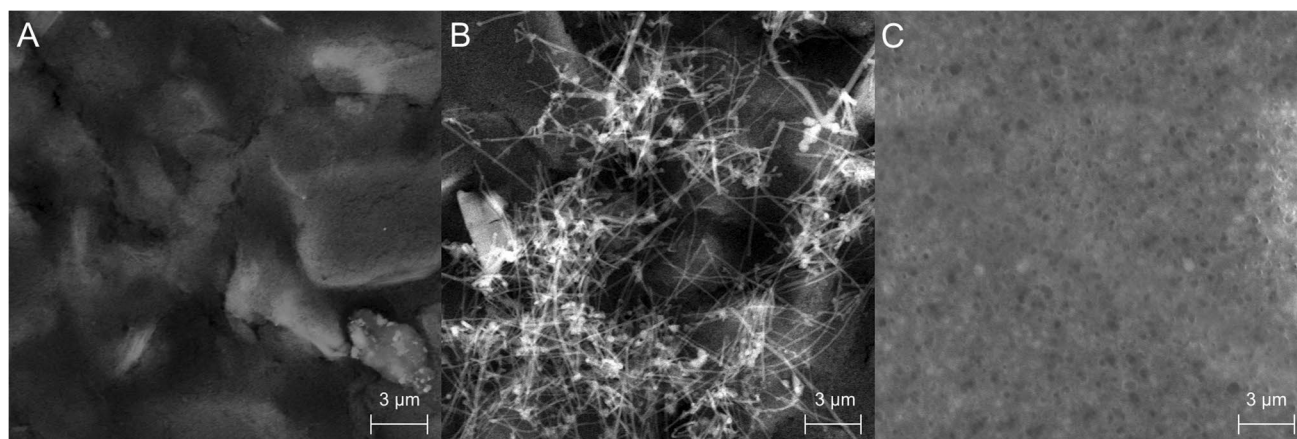


Fig. 4 Structural characterization of the working electrode in the biosensor assembling process by FE-SEM images at 2850 \times magnification. **A** Pristine screen-printed carbon electrode (Bare-SPC). **B**

MWCNT drop-casted on the screen-printed carbon electrode. **C** Cyt c /MWCNT/SPC biosensor surface prepared at optimum conditions

Comparison between Cyt c /MWCNT/SPC and Bare-SPC at optimal conditions

A fentanyl standard at 10 $\mu\text{g/mL}$ was analyzed under optimized conditions with both a pristine carbon electrode (Bare-SPC) and the biosensor (Cyt c /MWCNT/SPC) to demonstrate the amplification of the electrochemical signal using the cyt c enzyme, which ranges from 5 to 10 times the signal of the Bare-SPC sensor. Figure 5 is shown the voltammetric profiles recorded by screening on the two tested sensors. The enhancement in the current intensity is due not only to the accumulation effect, but also probably due to the enzymatic catalysis of the fentanyl electro-oxidation reaction. Therefore, further research is required to determine the contribution of enzymatic catalysis.

The biotransformation of opioids, such as codeine, methadone, tramadol, or fentanyl, takes place in the liver. Phase I metabolism of drugs consists of reactions mainly catalyzed by the cytochrome P450 (CYP) system, which contains various isoenzymes, including CYP-3A4, the primary metabolizer of fentanyl, through the metabolic route of the N-dealkylation to norfentanyl [52–55]. The ability of these enzymes to oxidize xenobiotics and their role in the electron transfer chain led us to propose a smaller enzyme containing a heme group as a cofactor. Cyt c showed very positive results in voltammetric procedures, improving the sensitivity of the techniques.

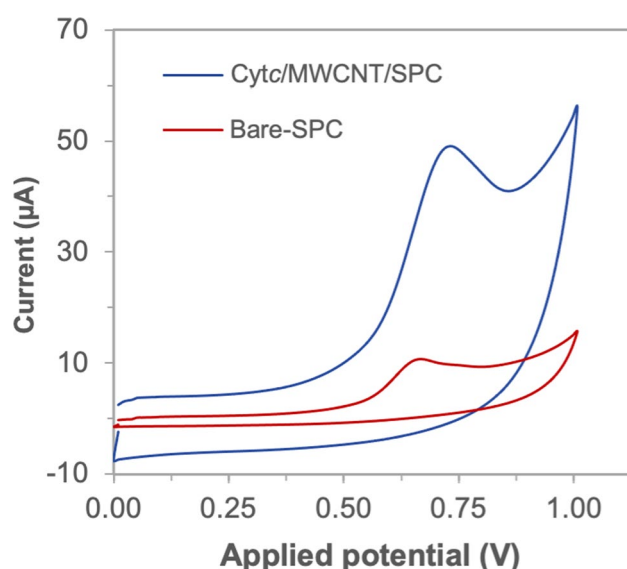


Fig. 5 Comparison of AdSCV profiles for fentanyl oxidation at 10.0 $\mu\text{g/mL}$ in PB solution at pH 7.5 using a Cyt c /MWCNT/SPC biosensor and a Bare-SPC electrode at optimum analysis conditions. Scan rate 100 mV/s in the positive direction

Sensing on the biosensor

In order to demonstrate that it can be a useful tool in forensic applications, analytical determinations such as performance parameters, interference study, and simulated sample analysis were carried out.

Analytical parameters

The analytical performance of the method using the enzymatic biosensor for fentanyl was assessed in terms of linearity, sensitivity, selectivity, limit of detection (LOD), quantification limit (LOQ), reproducibility, and recovery coefficient [56]. The evaluation was conducted in the lowest possible calibration range to detect fentanyl in biofluids of very low concentrations. Figure S4A depicts the curve profile of the voltammograms recorded by AdSCV at increasing concentrations of fentanyl (0.5–5.0 $\mu\text{g/mL}$). These measurements performed in a drop of 50 μL placed on the biosensor surface demonstrate a linear relationship between anodic peak current (I_p) vs the standard concentration (C) (see Fig. S4B), and they were statistically studied to determine the analytical parameters of the electrochemical method.

Linearity was determined by sensing a series of fentanyl standards ranging from 0.5 $\mu\text{g/mL}$ to five-fold the expected calibration range (25 $\mu\text{g/mL}$). The criteria to define acceptable linearity were $R^2 \geq 0.995$. Figure S5 is shown the linearity graph obtained by triplicate, in which $R^2 = 0.9897$ considering the complete data set, while $R^2 = 0.9956$ plotting the data up to 20 $\mu\text{g/mL}$. The main figures of merit are summarized in Table 2. Sensitivity was assessed by the electrochemical response factor as the peak current height divided by the concentration of the analyte. The slope of the seven-point calibration curve was used for this measurement. The limits of detection and quantification were calculated based on the standard deviation of the linear regression divided by the slope of the linear curve according to the formulas $LOD = 3\sigma/S$ and $LOQ = 10\sigma/S$ ($n = 3$).

Table 2 Analytical parameters for the seven-point calibration graph of fentanyl on Cyt c /MWCNT/SPC biosensor by adsorptive-stripping cyclic voltammetry, $n = 3$

Analytical parameter	Cyt c /MWCNT/SPC
Oxidation potential (V)	0.66 ± 0.01
Linear range ($\mu\text{g/mL}$)	0.50–20.0
Calibration range ($\mu\text{g/mL}$)	0.50–5.00
Response factor ($\mu\text{A}/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	1.92 ± 0.06
LOD ($\mu\text{g/mL}$)	0.086 ± 0.008
LOQ ($\mu\text{g/mL}$)	0.29 ± 0.03
Within-lab reproducibility (RSD)	2.9%

For the electrochemical procedure, the precision was evaluated in terms of within-lab reproducibility (S_{RW}) estimated as relative standard deviation (RSD, %). The intermediate precision S_{RW} was calculated from the RSD of the slopes from three analytical curves measured on different enzymatic biosensors at different measurement days. The data in Table 2 show that the developed method has a reliable precision ($S_{RW} \leq 2.9\%$). Repeatability was not calculated because biosensors are discarded after measuring a calibration curve; therefore, reproducibility is a more suitable parameter to estimate precision.

The detection limit found in this work differs by one or two orders of magnitude lower than the limits from most similar electrochemical methods, as shown in Table 3. As can be seen in this table, some proposed methods show a lower LOD; however, they are not easily prepared sensors like the biosensor presented in this work.

CSWV cyclic square wave voltammetry, SWV square wave voltammetry, DPV differential pulse voltammetry, AdSDPV adsorptive stripping differential pulse voltammetry, SWAdSV square wave adsorptive-stripping voltammetry, RTLI room temperature ionic liquid, MWCNT multi-walled carbon nanotubes, CNOs carbon nano onions, LCE laser carbonized electrode, MOF metal-organic framework, SWCNT single-walled carbon nanotubes.

Interference study

The selectivity of the method was evaluated by testing spiked fentanyl solutions with caffeine, pseudoephedrine, and cocaine as possible fentanyl-laced substances for consumption [61–63]. The testing of the simulated samples, prepared at three different ratios of drug to interferent from 1:1 to 1:10, provides sufficient information to detect and quantify fentanyl in mixtures. Figure S6 depicts de voltammograms obtained from the interference study. The interferent substances were analyzed individually to determine the electro-activity of the molecules. In Fig. S6A and S6B, it is noted that caffeine and pseudoephedrine are not

electro-active species at the tested electrochemical window, while cocaine exhibits an anodic peak shifted around 0.85 V (Fig. S6C).

Table 4 summarizes the experimental results of the qualitative and quantitative study of interferents. The method enables quantifying the target analyte in a 1:1 ratio with cocaine. At a ratio of 1:5, the fentanyl signal is seen as a shoulder along with the oxidation wave of cocaine; thus, it is considered detectable, while at a 1:10 ratio, cocaine completely interferes with the fentanyl signal. In contrast, fentanyl can be analyzed with caffeine and pseudoephedrine present since these compounds do not significantly interfere with the analytical response of the analyte. The RSD of the fentanyl determinations was calculated considering the responses of three concentration ratios and the individual fentanyl. A precision of 3.8% was obtained when present with caffeine and 4.7% for the fentanyl-pseudoephedrine mixtures, coefficients of variation near the reproducibility of the method. The lack of interference between fentanyl and cocaine at a ratio of 1:1, caffeine, and pseudoephedrine allows selective sensing of fentanyl on Cytc/MWCNT/SPC biosensor.

Applicability of the method

Biological specimens such as urine, blood, or saliva can be used in forensic sciences to demonstrate previous or

Table 4 Interference study based on the quantification of fentanyl signal at 2.0 $\mu\text{g/mL}$ conducted in binary solution at three different concentrations of the interfering compound tested. FYL fentanyl, COC cocaine, CAFF caffeine, and PSE pseudoephedrine

Ratio FYL:interferent	FYL oxidation signal		
	COC	CAFF	PSE
1:0	Quantified	RSD 3.8%	RSD 4.7%
1:1	Quantified		
1:5	Detected		
1:10	Undetected		

Table 3 Comparison of the limit of detection (LOD) estimated in this study to values calculated in other electrochemical methods recently reported in the literature for fentanyl sensing

Method	Working electrode	Electrolyte	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	Reference
CSWV	RTLI-SPC	PB pH 7.4	1.68	[57]
SWV	MWCNT-RTIL-SPC	PBS pH 7.4	3.36	[58]
DPV	CNOs-GC	PB pH 7.0	0.101	[59]
SWV	LCE	PBS pH 7.4	0.336	[60]
DPV	MOF-SPC	PB pH 7.0	0.101	[25]
AdSDPV	MWCNT-GC	PB pH 7.4	0.034	[26]
DPV	SWCNT network	PBS pH 7.4	0.004	[44]
SWAdSV	Bare-SPC	Tris-HCl pH 8.5	0.233 (drop) 0.037 (cell)	[29]
AdSCV	Cytc/MWCNT/SPC	PB pH 7.5	0.086 (drop)	This work

historical drug exposure. Commonly, target drugs and drug metabolites are present in urine at higher concentrations than in the blood after consumption and absorption, increasing the possibility to detect drugs for a longer period of time [11]. In order to examine the effectiveness and applicability of the proposed method, a biofluid was prepared as simulated samples. To evaluate the method's performance in terms of trueness, drug-free urine was spiked with fentanyl at two different levels of the calibration range.

The first spiked sample was prepared at 1.0 $\mu\text{g/mL}$ and the second at 2.5 $\mu\text{g/mL}$ based on the concentration found in previous urine analyses [64, 65]. Both samples were tested in triplicate by five-point standard addition curves adding successive aliquots of fentanyl standard followed by diluting with buffer to a final volume of 50 μL . The increasing voltammetric response was recorded using the optimized AdSCV method on a Cyt c /MWCNT/SPC biosensor as depicted in Fig. 6A for the intermediate region of enrichment. A slight shift of the oxidation potential toward more positive values is observed compared to the results obtained in the buffer solution. This is probably due to matrix effects that infer mainly on the pH of the test solution. However, it does not affect the fentanyl determination since the standard addition minimizes these effects. Furthermore, it is important to note that the diluted urine blank does not interfere with the electrochemical signal of the analyte; therefore, it is not necessary to perform a drug extraction.

The measured peak current for the increasing oxidation waves was plotted against the corresponding fentanyl concentration with a very good linear correlation. The extrapolation in Fig. 6B represents the sample's concentration of which the average recovery was 100% and the estimated precision (RSD) at 3%, as shown in Table 5. The recovery for the low level of enrichment was 92% (see Fig. S7 presented in supplementary information), slightly lower than for the medium level, as expected. These results suggest that the accuracy achieved by the proposed method is good and satisfactory. It also demonstrates the applicability of a reliable and rapid screening that requires minimal sample volume

Table 5 Analysis of fentanyl-spiked urine samples by AdSCV on Cyt c /MWCNT/SPC biosensor using the standard addition method. Calculated concentrations are reported as mean \pm SD ($n=3$)

Concentration added ($\mu\text{g/mL}$)	Oxidation potential (V)	Measured concentration ($\mu\text{g/mL}$)	RSD (%)	Recovery coefficient (%)
1.00	0.74	0.92 ± 0.02	2	92
2.50	0.74	2.50 ± 0.08	3	100

and pretreatment, which could be applied in the future as a new forensic tool in drug sensing.

Conclusions

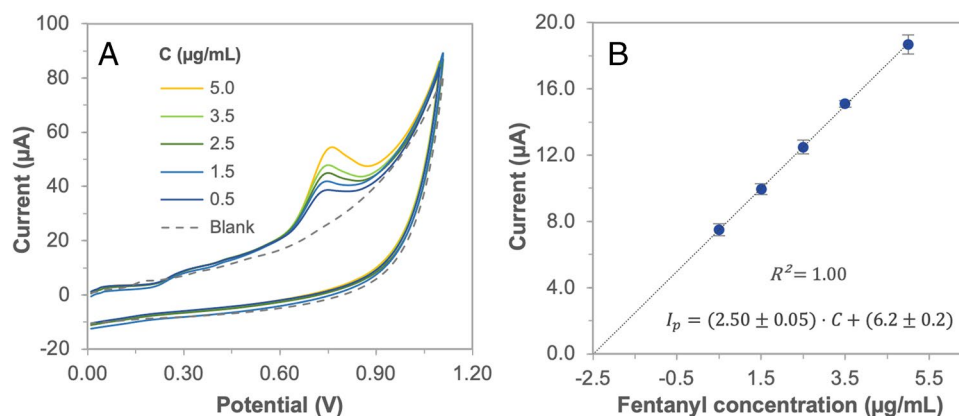
A voltammetric enzymatic biosensor for the determination of fentanyl in biological samples of urine was developed for the first time. The analysis method is based on the catalytic activity of cyt c enzyme which enhances the magnitude of the analytical response up to an order of magnitude compared to the signal from a Bare-SPC electrode. Further work to explain the phenomenon of enzyme catalysis involved in the electrochemical reactions is underway.

The optimal conditions for the electrochemical determination based on an adsorptive-stripping voltammetry technique were set at accumulation time of 10 min, pH of the electrolytic support at 7.5, cyt c concentration of 0.30% weight by volume, stability time ranging from 24 to 72 h, and a scan rate for the AdSCV of 100 mV/s.

Voltammetric biosensing is proposed as a selective approach toward mixtures of fentanyl and adulterants such as caffeine. It can be used to identify and quantify the target drug even when other substances, for example, pseudoephedrine or cocaine, have been consumed. Nonetheless, cocaine becomes an interferent for the analysis in larger proportions than 1:1 since it is an electro-active molecule.

The analysis results of fentanyl-spiked urine samples demonstrate that the biosensor elaborated and validated

Fig. 6 Determination of fentanyl in the spiked urine sample. **A** AdSCV curve profile for increasing standard additions recorded using Cyt c /MWCNT/SPC biosensor (scan rate 100 mV/s in the positive direction). **B** Average standard addition calibration curve in the form of anodic peak current vs fentanyl concentration to assess the trueness of the method (2.5 $\mu\text{g/mL}$, $n=3$)



in this study shows a satisfactory closeness of agreement between the experimental values and the expected concentrations for both levels of enrichment. Therefore, the accuracy achieved by this analysis method is acceptable.

Noticeably, an additional advantage of this method is that a small sample size is required—generating very few residues. This is important when sampling is limited, as is the case with biological fluids. Consequently, enzymatic biosensor provides a feasible analysis tool with potential application in forensic sciences as a rapid and reliable screening of biological samples from drug users.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00604-022-05578-x>.

Acknowledgements J. González-Hernández would like to thank CELEQ and Sistema de Estudios de Posgrado de la Universidad de Costa Rica for supporting and financing the internship at Universidad de Burgos and J. García for digital images processing.

Funding The work was funded by Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica (project N° 804-C2-070) and CELEQ.

Declarations

Conflict of interest The authors declare no competing interests.

References

- European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA), 2001 Annual report on the state of the drugs problem in the European Union, (2001) 1–6. https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/201/sel2001_3en_69551.pdf. Accessed 1 May 2022
- United Nations office on Drugs and Crime (UNODC), World Drug Report 2021, 2021. www.unodc.org/unodc/en/data-and-analysis/wdr2021.html. Accessed 3 May 2022
- Friesen EL, Kurdyak PA, Gomes T, Kolla G, Leece P, Zhu L, Toombs E, O'Neill B, Stall NM, Jüni P, Mushquash CJ, Mah L (2021) The impact of the COVID-19 pandemic on opioid-related harm in Ontario. <https://doi.org/10.47326/ocsat.2021.02.42.1.0>
- Pardo B, Reuter P (2020) Enforcement strategies for fentanyl and other synthetic opioids. Foreign Policy and Global Economy & Development Programs. Brookings
- The US Centers for Disease Control and Prevention (CDC), (2022). <https://www.cdc.gov/nchs/nvss/vsrr/drug-overdose-data.htm> (accessed May 3, 2022).
- Manirakiza A, Irakoze L, Manirakiza S, Bizimana P (2020) Efficacy and safety of fentanyl compared with morphine among adult patients with cancer: a meta-analysis, East African. Heal. Res J. 4:8–16. <https://doi.org/10.24248/eahrj.v4i1.617>
- Wolff RF, Aune D, Truyers C, Hernandez AV, Misso K, Riemsma R, Kleijnen J (2012) Systematic review of efficacy and safety of buprenorphine versus fentanyl or morphine in patients with chronic moderate to severe pain. *Curr Med Res Opin* 28:833–845. <https://doi.org/10.1185/03007995.2012.678938>
- National Institute on Drug Abuse, Fentanyl DrugFacts, (2021) 1–7. <https://nida.nih.gov/publications/drugfacts/fentanyl>. Accessed 1 May 2022
- United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC), Global smart update: fentanyl and its analogues - 50 years on, (2017) 3–12. https://www.unodc.org/documents/scientific/Global_SMART_Update_17_web.pdf. Accessed 4 May 2022
- United Nations office on Drugs and Crime (UNODC), Global smart update: understanding the global opioid crisis, 21 (2019). https://www.unodc.org/documents/scientific/Global_SMART_21_web_new.pdf. Accessed 4 May 2022
- United Nations office on Drugs and Crime (UNODC) (2018) Recommended methods for the identification and analysis of fentanyl and its analogues in biological specimens, <https://doi.org/10.18356/aca7aca5-en>
- Strano-Rossi S, Álvarez I, Tabernero MJ, Cabarcos P, Fernández P, Bermejo AM (2011) Determination of fentanyl, metabolite and analogs in urine by GC/MS. *J Appl Toxicol* 31:649–654. <https://doi.org/10.1002/jat.1613>
- Mochizuki A, Nakazawa H, Adachi N, Takekawa K, Shojo H (2018) Identification and quantification of mepirapim and acetyl fentanyl in authentic human whole blood and urine samples by GC–MS/MS and LC–MS/MS. *Forensic Toxicol* 36:81–87. <https://doi.org/10.1007/s11419-017-0384-7>
- Cummings OT, Enders JR, McIntire GL, Backer R, Poklis A (2016) Fentanyl-norfentanyl concentrations during transdermal patch application: LC-MS-MS urine analysis. *J Anal Toxicol* 40:595–600. <https://doi.org/10.1093/jat/bkw067>
- Palamar JJ, Salomone A, Barratt MJ (2020) Drug checking to detect fentanyl and new psychoactive substances. *Curr Opin Psychiatry* 33:301–305. <https://doi.org/10.1097/YCO.0000000000000607>
- Vincenti F, Montesano C, Gobbi S, Sergi M, Curini R, Compagnone D (2021) Quantitative analysis of fentanyl, several analogues and metabolites in urine by parallel artificial liquid membrane extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis. *J Chromatogr Open* 1:100006. <https://doi.org/10.1016/j.jcoa.2021.100006>
- Jornet-Martínez N, Moliner-Martínez Y, Molins-Legua C, Campíns-Falcó P (2017) Trends for the development of in situ analysis devices, *Encycl. Anal Chem.* 1–23. <https://doi.org/10.1002/9780470027318.a9593>
- Shaw L, Dennany L (2017) Applications of electrochemical sensors: forensic drug analysis. *Curr Opin Electrochem* 3:23–28. <https://doi.org/10.1016/j.coelec.2017.05.001>
- Anzar N, Suleman S, Parvez S, Narang J (2022) A review on Illicit drugs and biosensing advances for its rapid detection. *Process Biochem* 113:113–124. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2021.12.021>
- González-Hernández J, Alvarado-Gómez AL, Arroyo-Mora LE, Barquero-Quirós M (2021) Electrochemical determination of novel psychoactive substances by differential pulse voltammetry using a microcell for boron-doped diamond electrode and screen-printed electrodes based on carbon and platinum. *J Electroanal Chem* 882:114994. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2021.114994>
- González-Hernández J, Ott CE, Arcos-Martínez MJ, Colina Á, Heras A, Alvarado-Gómez AL, Urcuyo R, Arroyo-Mora LE (2022) Rapid determination of the ‘Legal Highs’ 4-MMC and 4-MEC by spectroelectrochemistry: simultaneous cyclic voltammetry and in situ surface-enhanced raman spectroscopy. *Sensors* . 22. <https://doi.org/10.3390/s22010295>
- Cho IH, Kim DH, Park S (2020) Electrochemical biosensors: perspective on functional nanomaterials for on-site analysis. *Biomater Res* 24:1–12. <https://doi.org/10.1186/s40824-019-0181-y>
- Viswanathan S, Rani C, Vijay Anand A, Ho JA (2009) Disposable electrochemical immunosensor for carcinoembryonic antigen using ferrocene liposomes and MWCNT screen-printed electrode.

- Biosens Bioelectron 24:1984–1989. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2008.10.006>
24. Choinška MK, Šestáková I, Hrdlička V, Skopalová J, Langmaier J, Maier V, Navrátil T (2022) Electroanalysis of fentanyl and its new analogs: a review, Biosensors. 12. <https://doi.org/10.3390/bios12010026>
 25. Naghian E, MarziKhosrowshahi E, Sohoulí E, Ahmadi F, Rahimi-Nasrabadi M, Safarifard V (2020) A new electrochemical sensor for the detection of fentanyl lethal drug by a screen-printed carbon electrode modified with the open-ended channels of Zn(ii)-MOF, New. J. Chem. 44:9271–9277. <https://doi.org/10.1039/d0nj01322f>
 26. MostafaNajafi E, Sohoulí F, Mousavi (2020) An electrochemical sensor for fentanyl detection based on multi-walled carbon nanotubes as electrocatalyst and the electrooxidation mechanism. J Anal Chem. 75:1209–1217. <https://doi.org/10.1134/S1061934820090130>
 27. Glasscott MW, Vannoy KJ, Iresh Fernando PUA, Kosgei GK, Moores LC, Dick JE (2020) Electrochemical sensors for the detection of fentanyl and its analogs: foundations and recent advances. TrAC - Trends Anal. Chem. 132:116037. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116037>
 28. Mishra RK, Goud KY, Li Z, Moonla C, Mohamed MA, Tehrani F, Teymourian H, Wang J (2020) Continuous opioid monitoring along with nerve agents on a wearable microneedle sensor array. J Am Chem Soc 142:5991–5995. <https://doi.org/10.1021/jacs.0c01883>
 29. Ott CE, Cunha-Silva H, Kuberski SL, Cox JA, Arcos-Martínez MJ, Arroyo-Mora LE (2020) Electrochemical detection of fentanyl with screen-printed carbon electrodes using square-wave adsorptive stripping voltammetry for forensic applications. J Electroanal Chem 873:114425. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2020.114425>
 30. Clark LC, Lyons C (1962) Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. Ann N Y Acad Sci 102:29–45. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x>
 31. Asturias-Arribas L, Alonso-Lomillo MA, Domínguez-Renedo O, Arcos-Martínez MJ (2011) CYP450 biosensors based on screen-printed carbon electrodes for the determination of cocaine. Anal Chim Acta 685:15–20. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.11.006>
 32. Asturias-Arribas L, Alonso-Lomillo MA, Domínguez-Renedo O, Arcos-Martínez MJ (2013) Electrochemical determination of cocaine using screen-printed cytochrome P450 2B4 based biosensors. Talanta 105:131–134. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.11.078>
 33. Ahmed SR, Chand R, Kumar S, Mittal N, Srinivasan S, Rajabzadeh AR (2020) Recent biosensing advances in the rapid detection of illicit drugs. TrAC - Trends Anal Chem 131:116006. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116006>
 34. Garrido C, Galluzzi L, Brunet M, Puig PE, Didelot C, Kroemer G (2006) Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. Cell Death Differ 13:1423–1433. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401950>
 35. Jain R, Kumar S, Chhabra R, Agarwal MC, Kumar R (2015) Analysis of the pH-dependent stability and millisecond folding kinetics of horse cytochrome c. Arch Biochem Biophys 585:52–63. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.09.011>
 36. Murgida DH, Hildebrandt P (2001) Proton-coupled electron transfer of cytochrome c. J Am Chem Soc 123:4062–4068. <https://doi.org/10.1021/ja004165j>
 37. Aghamiri ZS, Mohsennia M, Rafiee-Pour HA (2018) Immobilization of cytochrome c and its application as electrochemical biosensors. Talanta 176:195–207. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.08.039>
 38. Eguílaz M, Venegas CJ, Gutiérrez A, Rivas GA, Bollo S (2016) Carbon nanotubes non-covalently functionalized with cytochrome c: a new bioanalytical platform for building bienzymatic biosensors. Microchem J 128:161–165. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2016.04.018>
 39. Shie JW, Umasankar Y, Chen SM (2008) Electroanalytical properties of cytochrome c by direct electrochemistry on multi-walled carbon nanotubes incorporated with DNA biocomposite film. Talanta 74:1659–1669. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2007.10.034>
 40. Ba Hashwan SS, Fatin MF, Ruslinda AR, MdArshad MK, Hashim U, Ayub RM (2015) Functionalization of multi wall carbon nanotubes using nitric acid oxidation. Appl Mech Mater. 754–755:1156–1160. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/amm.754-755.1156>
 41. Walt DR, Agayn VI (1994) The chemistry of enzyme and protein immobilization with glutaraldehyde, TrAC -. Trends Anal Chem 13:425–430. [https://doi.org/10.1016/0165-9936\(94\)85023-2](https://doi.org/10.1016/0165-9936(94)85023-2)
 42. Imai M, Saio T, Kumeta H, Uchida T, Inagaki F, Ishimori K (2016) Investigation of the redox-dependent modulation of structure and dynamics in human cytochrome c. Biochem Biophys Res Commun 469:978–984. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.12.079>
 43. Brenes JP, Arroyo-Mora LE, Barquero-Quirós M (2022) Enzymatic inhibitive determination of AB-Fubinaca and AB-Pinaca on screen printed carbon tetratiofulvalene electrodes modified with nanoparticles and carbon nanotubes. Sens Bio-Sensing Res 38:100515. <https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2022.100515>
 44. Wester N, Mynttinen E, Etula J, Lilius T, Kalso E, Mikladal BF, Zhang Q, Jiang H, Sainio S, Nordlund D, Kauppinen EI, Laurila T, Koskinen J (2020) Single-walled carbon nanotube network electrodes for the detection of fentanyl citrate. ACS Appl Nano Mater 3:1203–1212. <https://doi.org/10.1021/acsnm.9b01951>
 45. Thurkill RL, Cross DA, Scholtz JM, Pace CN (2005) pKa of fentanyl varies with temperature: implications for acid-base management during extremes of body temperature. J Cardiothorac Vasc Anesth 19:759–762. <https://doi.org/10.1053/j.jvca.2004.11.039>
 46. Coletta M, Costa H, De Sanctis G, Neri F, Smulevich G, Turner DL, Santos H (1997) pH dependence of structural and functional properties of oxidized cytochrome c' from Methylophilus methylotrophus. J Biol Chem 272:24800–24804. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.40.24800>
 47. Segal MS, Beem E (2001) Effect of pH, ionic charge, and osmolality on cytochrome c-mediated caspase-3 activity. Am J Physiol - Cell Physiol 281:1196–1204. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.2001.281.4.c1196>
 48. Smith ET (2006) Examination of n = 2 reaction mechanisms that reproduce pH-dependent reduction potentials. Anal Chim Acta 572:259–264. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.05.025>
 49. Hegde RN, Hosamani RR, Nandibewoor ST (2009) Voltammetric oxidation and determination of cinnarizine at glassy carbon electrode modified with multi-walled carbon nanotubes. Colloids Surfaces B Biointerfaces 72:259–265. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.04.013>
 50. Garrido JMPJ, Delerue-Matos C, Borges F, Macedo TRA, Oliveira-Brett AM (2004) Voltammetric oxidation of drugs of abuse III. Heroin and metabolites, Electroanalysis 16:1497–1502. <https://doi.org/10.1002/elan.200302975>
 51. Elgrishi N, Rountree KJ, McCarthy BD, Rountree ES, Eisenhart TT, Dempsey JL (2018) A practical beginner's guide to cyclic voltammetry. J Chem Educ 95:197–206. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.7b00361>
 52. Smith HS (2009) Opioid metabolism. Mayo Clin Proc 84:613–624. <https://doi.org/10.4065/84.7.613>
 53. Kanamori T, Togawa-Iwata Y, Segawa H, Yamamuro T, Kuwayama K, Tsujikawa K, Inoue H (2018) Use of hepatocytes isolated from a liver-humanized mouse for studies on the metabolism of drugs: application to the metabolism of fentanyl and

- acetylfentanyl. *Forensic Toxicol* 36:467–475. <https://doi.org/10.1007/s11419-018-0425-x>
54. Holmquist GL (2009) Opioid metabolism and effects of cytochrome P450. *Pain Med* 10:20–29. <https://doi.org/10.1111/j.1526-4637.2009.00596.x>
55. Overholser BR, Foster DR (2011) Opioid pharmacokinetic drug-drug interactions. *Am J Manag Care*. 17 Suppl 1: S276–87. <http://europepmc.org/abstract/MED/21999760>. Accessed 10 May 2022
56. Nageswara Rao Tentu (2018) Validation of analytical methods, in: IntechOpen, Rijeka, p. Ch. 7. <https://doi.org/10.5772/intechopen.72087>
57. Goodchild SA, Hubble LJ, Mishra RK, Li Z, Goud KY, Barfidokht A, Shah R, Bagot KS, McIntosh AJS, Wang J (2019) Ionic liquid-modified disposable electrochemical sensor strip for analysis of fentanyl. *Anal Chem* 91:3747–3753. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b00176>
58. Barfidokht A, Mishra RK, Seenivasan R, Liu S, Hubble LJ, Wang J, Hall DA (2019) Wearable electrochemical glove-based sensor for rapid and on-site detection of fentanyl. *Sensors Actuators, B Chem* 296:126422. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.04.053>
59. Sohoul E, Keihan AH, Shahdost-fard F, Naghian E, Plonska-Brzezinska ME, Rahimi-Nasrabadi M, Ahmadi F (2020) A glassy carbon electrode modified with carbon nanooxions for electrochemical determination of fentanyl. *Mater Sci Eng C* 110:110684. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110684>
60. Mishra RK, Krishnakumar A, Zareei A, Heredia-Rivera U, Rahimi R (2022) Electrochemical sensor for rapid detection of fentanyl using laser-induced porous carbon-electrodes. *Microchim Acta*. 189. <https://doi.org/10.1007/s00604-022-05299-1>
61. Valeriy Z, Tregubenko P (2019) Using over-the-counter and other prescription medications to potentiate opiates in the USA: literature review. *Medical And Public Health Aspects Of OTC Medication Misuse. J Alcohol Drug Abus Subst Depend*. 5:1–15. <https://doi.org/10.24966/adsd-9594/100012>
62. Fiorentin TR, Krotulski AJ, Martin DM, Browne T, Triplett J, Conti T, Logan BK (2019) Detection of cutting agents in drug-positive seized exhibits within the United States. *J Forensic Sci* 64:888–896. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.13968>
63. Żubrycka A, Kwaśnica A, Haczkiwicz M, Sipa K, Rudnicki K, Skrzypek S, Poltorak L (2022) Illicit drugs street samples and their cutting agents. the result of the GC-MS based profiling define the guidelines for sensors development, *Talanta*. 237. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122904>
64. Dussy FE, Hangartner S, Hamberg C, Berchtold C, Scherer U, Schlotterbeck G, Wyler D, Briellmann TA (2016) An acute ocfentanil fatality: a case report with postmortem concentrations. *J Anal Toxicol* 40:761–766. <https://doi.org/10.1093/jat/bkw096>
65. Fort C, Curtis B, Nichols C, Niblo C (2016) Acetyl fentanyl toxicity: two case reports. *J Anal Toxicol* 40:754–757. <https://doi.org/10.1093/jat/bkw068>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.

Electronic Supplementary Information

Electrochemical biosensor for fentanyl quantitative detection based on immobilized cytochrome *c* on multi-walled carbon nanotubes modified screen-printed carbon electrodes

Jerson González-Hernández^{a,b,*}, Guillermo Moya-Alvarado^b, Ana Lorena Alvarado-Gómez^a, Roberto Urcuyo^{a,b}, Miriam Barquero-Quirós^a and María Julia Arcos-Martínez^c

^a Centro de Investigación en Electroquímica y Energía Química (CELEQ), Universidad de Costa Rica, San José, 11501-2060, Costa Rica.

^b Escuela de Química, Universidad de Costa Rica, San José, 11501-2060, Costa Rica.

^c Departamento de Química, Universidad de Burgos, Pza. Misael Bañuelos s/n, E-09001, Burgos, España.

Corresponding author: Jerson González-Hernández

Contact: jerson.gonzalez@ucr.ac.cr

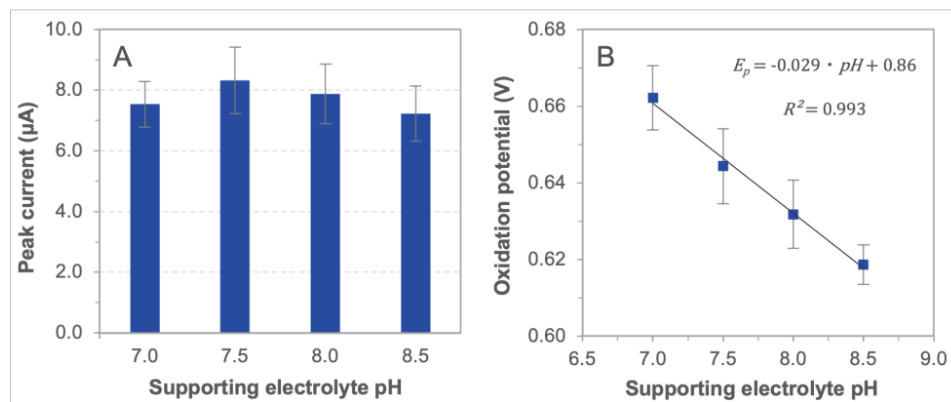
Results

Fig. S1 Relationship between oxidation parameters and pH of buffer solution at the CytC/MWCNT/SPC biosensor. **(A)** Effect of the pH on the biosensor response. **(B)** Effect of pH on the oxidation potential. Conditions: AdSCV ($n = 3$, scan rate: 50 mV/s), fentanyl at 10.0 µg/mL and PB solution.

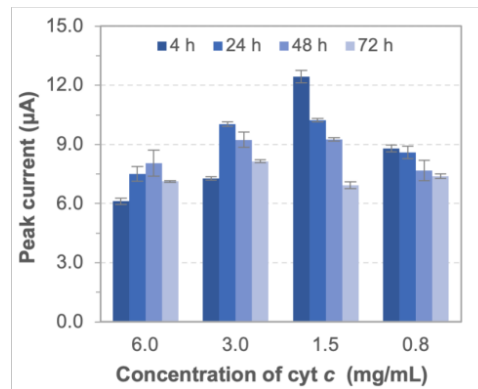


Fig. S2 Effect of cyt *c* amount in the Cyt*c*/MWCNT/SPC biosensor on the peak current and stability of the electrochemical response over time. The data was obtained by AdSCV for fentanyl at 10.0 µg/mL in PB solution at pH 7.5 ($n = 3$, scan rate: 50 mV/s).

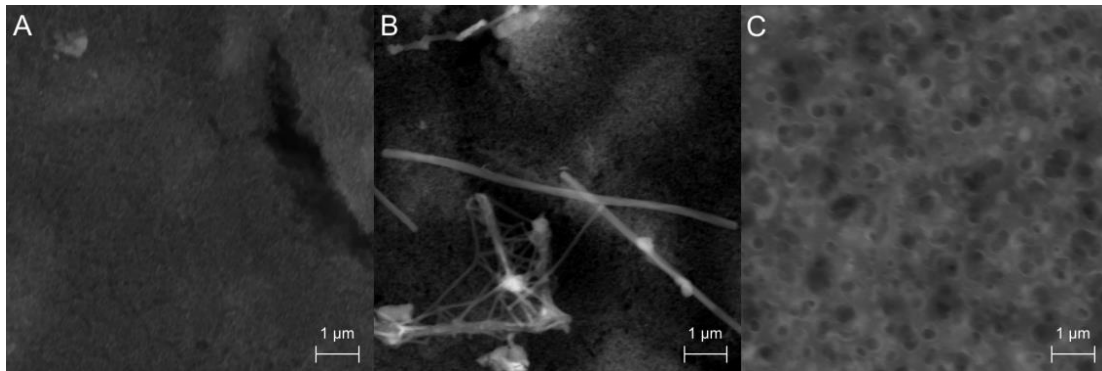


Fig. S3 Structural characterization of the working electrode in the biosensor assembling process by FE-SEM images at 7650x magnification. (A) Pristine screen-printed carbon electrode (Bare-SPC). (B) MWCNT drop-casted on the screen-printed carbon electrode. (C) Cyt*c*/MWCNT/SPC biosensor surface prepared at optimum conditions.

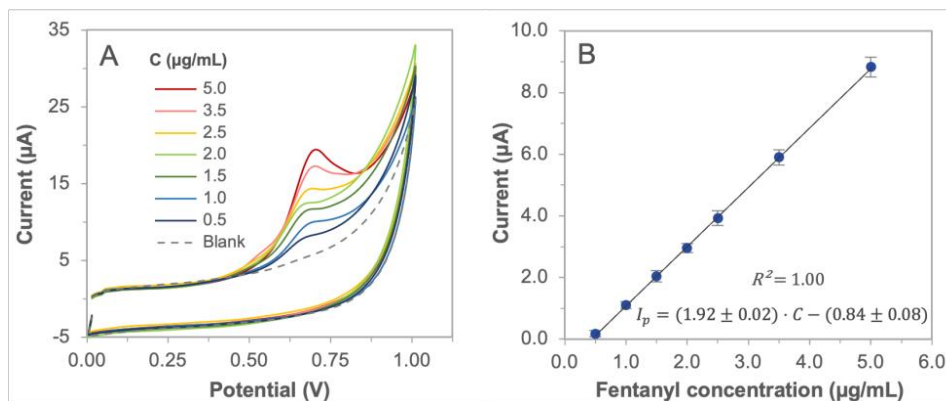


Fig. S4 AdSCV measurements for fentanyl at various concentration ranging from 0.5 to 5.0 µg/mL in PB solution at pH 7.5. (A) Voltammograms for increasing concentration recorded using Cyt*c*/MWCNT/SPC biosensor (Scan rate 100 mV/s in the positive direction). (B) Average calibration curve of the anodic peak current against fentanyl concentration ($n = 3$).

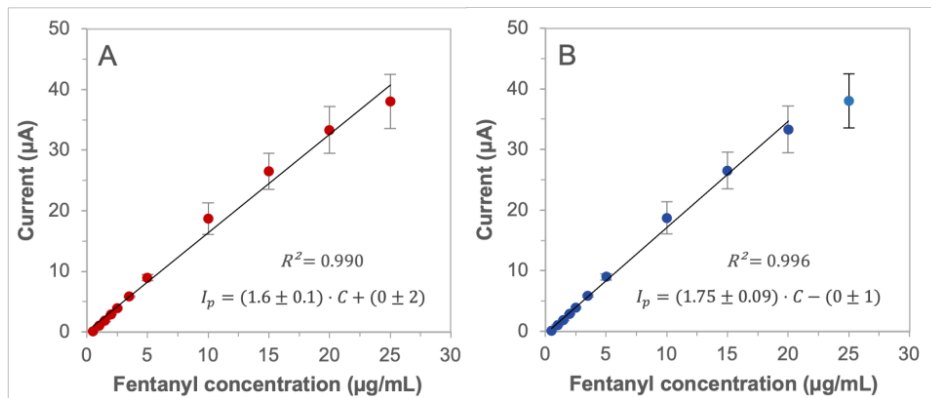


Fig. S5 Average calibration curve of the anodic peak current against fentanyl concentration ($n = 3$) for linearity study based on AdSCV measurements for increasing fentanyl concentration in PB solution at pH 7.5 using Cyt c /MWCNT/SPC biosensor. **(A)** Line fitting ranging from 0.5 to 25.0 µg/mL. **(B)** Line fitting ranging from 0.5 to 20.0 µg/mL.

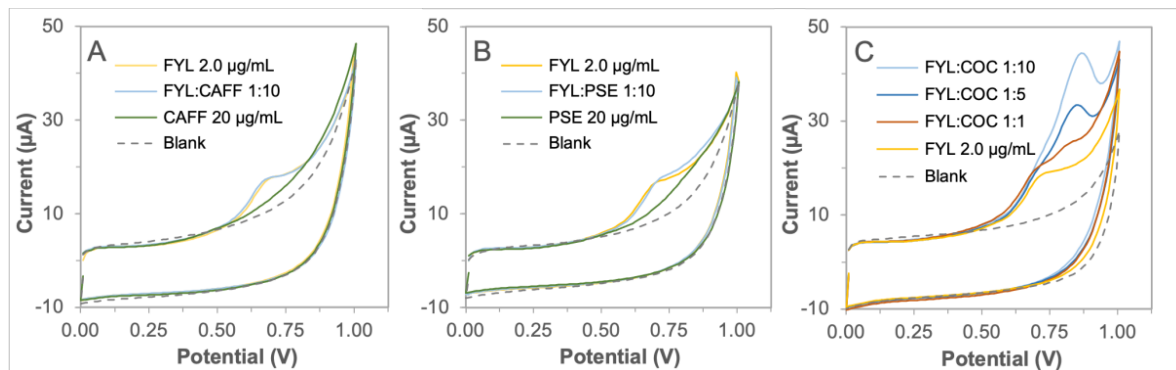


Fig. S6 AdSCV profiles obtained from the interference study for fentanyl (FYL) determination. **(A)** Voltammograms of fentanyl vs. caffeine (CAFF). **(B)** Voltammograms of fentanyl vs pseudoephedrine (PSE). **(C)** Voltammograms of fentanyl vs cocaine (COC).

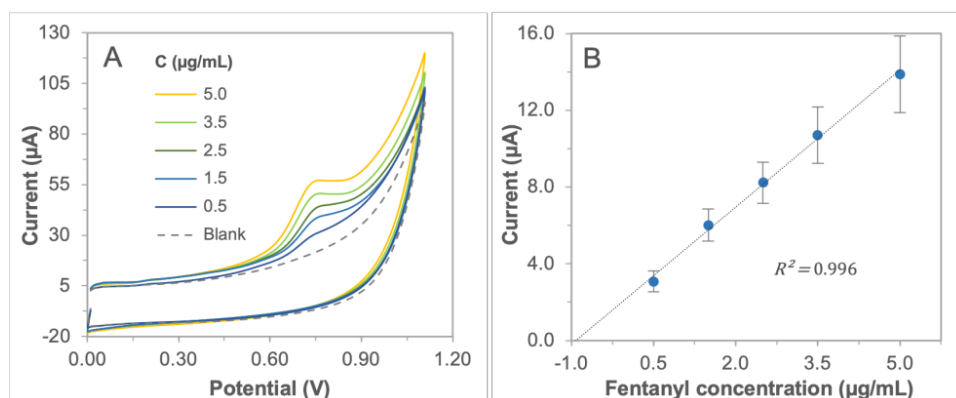


Fig. S7 Determination of fentanyl in spiked urine sample. **(A)** AdSCV curve profile for increasing standard additions recorded using Cyt c /MWCNT/SPC biosensor (scan rate 100 mV/s in the positive direction). **(B)** Average standard addition calibration curve in the form of anodic peak current vs fentanyl concentration to assess by triplicate the trueness at low level (1.0 µg/mL, $n = 3$).

6.4 Discusión general

El mercado global de las drogas se caracteriza por ser un sistema muy complejo y dinámico. Variables tales como el desarrollo de nuevas tecnologías impulsan la oferta de una amplia variedad de productos, así como los mecanismos de distribución que facilitan la adquisición de sustancias psicoactivas para la población.

La reclasificación general de las drogas basada en evidencia científica y en la aplicación de políticas globales eficaces es apremiante, tanto para garantizar la disponibilidad adecuada para fines médicos, como para resguardar la salud y la vida de las personas. La gran cantidad de nuevas sustancias psicoactivas (NSP) en la actualidad, evidencia el obsoleto sistema de fiscalización que obliga a las autoridades correspondientes a librar una “guerra antidrogas” que no ha logrado sus objetivos, en caso de tenerlos.

Desde la perspectiva de la investigación científica relacionada con la identificación, la caracterización y la cuantificación de sustancias psicoactivas, ya sean drogas legales, ilegales o no controladas, la discusión se centra en la importancia de brindar herramientas analíticas que cumplan con los más altos estándares de calidad y que respondan a las necesidades del mercado y de la sociedad actuales. El objetivo de estas metodologías es discriminar adecuadamente entre moléculas, hacer cumplir los requerimientos legales –sean o no objetivos, realistas y efectivos– y de atender correctamente las emergencias sanitarias que se presentan por el abuso de estupefacientes y psicotrópicos.

Con miras a contribuir con información científica en el debate global sobre el manejo y la clasificación de las drogas, principalmente en la categoría más grande y diversa denominada NSP, se planteó en esta investigación –enmarcada en una tesis doctoral– el diseño, el desarrollo y la experimentación pertinente para la implementación de sensores químicos fiables y precisos. Las tecnologías analíticas como la electroquímica y la espectroelectroquímica son los pilares idóneos para la creación de los dispositivos, esencialmente por sus características y propiedades entre las que destacan: tiempos cortos de análisis, capacidad de resolución temporal

in situ, costos relativamente bajos, versatilidad de las metodologías, generación de pocos desechos y excelentes parámetros de desempeño como los bajos límites de detección.

En la categoría de NSP, algunos de los grupos de sustancias de mayor crecimiento y diversificación según datos de la ONUDD y el OEDT [22,39], son los estimulantes, los opioides sintéticos y los alucinógenos. Ciertos ejemplares de estas drogas han persistido en el mercado por muchos años y han dado origen a nuevas drogas con efectos más potentes. Esto motivó la selección de las sustancias psicoactivas para su investigación electroquímica y el posterior análisis, situación que se abordó con cinco sensores químicos distribuidos en tres categorías: tres sensores electroquímicos, un sensor espectroelectroquímico y un biosensor enzimático.

Las drogas sintéticas 25B-NBOMe, DMT, BZP y mCPP se estudiaron electroquímicamente tomando en cuenta diferentes condiciones de análisis como las técnicas voltamperométricas, los soportes electrolíticos, el pH y los materiales de los electrodos de trabajo, entre otros. La optimización de estas variables se realizó con base en la influencia directa que ejercen sobre la intensidad de la corriente al aplicar el barrido de potencial.

Los transductores de los sensores electroquímicos seleccionados fueron el electrodo sólido de diamante dopado con boro y los electrodos serigrafiados de carbono y de platino. La respuesta electroquímica de la oxidación de las cuatro NSP sobre los tres sensores se analizó por DPV, la técnica que mostró, en este caso, la mayor sensibilidad analítica. Los microvolúmenes empleados para cada corrida fueron de 50 μL para los electrodos serigrafiados y de 100 μL para el electrodo de diamante con boro, para el cual se diseñó y se imprimió una microcelda para el ensamblaje del electrodo de trabajo junto con los electrodos auxiliar y referencial.

La determinación de los parámetros de desempeño del método utilizado con cada uno de los sensores para cada molécula psicoactiva deja una clara perspectiva de las ventajas y las debilidades de los tres dispositivos. Características como el bajo LOD, la alta sensibilidad, la menor influencia de interferencias, así como las

condiciones en medio acuoso que simplifican los procedimientos, posicionan al sensor basado en el electrodo de carbono como el más apto para el análisis químico de las cuatro sustancias. Los porcentajes de recuperación de las muestras de fluido oral enriquecidas con las drogas tuvieron valores entre el 98% y el 103%, lo que revela viabilidad y aplicabilidad de la metodología del sensor electroquímico de carbono. Estos resultados discutidos en la primera publicación científica responden a los objetivos uno y dos del proyecto doctoral.

El análisis electroquímico de las cationonas sintéticas 4-MMC y 4-MEC, en comparación con el estudio anterior, tiene el reto adicional de la identificación inequívoca de dos moléculas que son muy parecidas estructuralmente. La SEC de Raman fue la técnica empleada para el diseño del sensor espectroelectroquímico, principalmente por la portabilidad del instrumento para hacer los análisis *in situ* y por la electroactividad de ambas drogas sobre el electrodo serigrafado de oro, un material con características muy apropiadas para el sustrato SERS. La optimización del procedimiento incluyó maximizar la corriente anódica de la reacción redox simultáneamente con la electroactivación de la superficie electródica para promover el efecto SERS, *i. e.* se optimizó un procedimiento que tiene como objetivo cuantificar las NSP y dotar al sensor de selectividad para la descripción cualitativa de las sustancias.

La caracterización del sustrato de oro por SEM (del inglés *Scanning Electron Microscopy*) y AFM (siglas en inglés de *Atomic Force Microscopy*), antes y después del barrido electroquímico, evidencia los cambios en la morfología de la superficie que propiciaron el fenómeno SERS requerido para la identificación de las señales Raman a bajas concentraciones de los analitos. Al menos cuatro bandas se utilizaron para confirmar la identidad de las cationonas; asimismo la diferenciación entre un triplete y un doblete en el intervalo de 1161 cm^{-1} a 1213 cm^{-1} marcó la discriminación entre ambas drogas. La activación *in situ* del sustrato SERS minimiza la posibilidad de afectación temporal de las propiedades plasmónicas que pueden afectar la reproducibilidad y la confiabilidad de las mediciones.

La funcionalidad del sensor espectroelectroquímico se midió con el análisis de muestras simuladas de incautación –las catinonas mezcladas con maltosa y lidocaína como agentes adulterantes– y muestras de orina enriquecida. La identificación de las moléculas se llevó a cabo sin inconvenientes, tanto en las muestras de orina como en las drogas adulteradas con maltosa y lidocaína. En cuanto a la cuantificación por la técnica electroquímica de CV, la lidocaína resultó ser una interferencia considerable porque es electroactiva, no obstante, los análisis voltamperométricos con la maltosa y con la orina no se vieron afectados. El desarrollo de este sensor espectroelectroquímico se explica en mayor detalle en la segunda publicación científica y obedece a los objetivos tres y cuatro de la propuesta de la tesis.

El sensor desarrollado más recientemente en este proyecto de investigación se construyó con un transductor de carbono modificado con nanotubos de carbono y con una película de la enzima citocromo *c* adherida por entrecruzamiento del glutaraldehído. El objetivo de este biosensor fue la determinación analítica *in situ* del fentanilo y el mejoramiento de los límites de detección reportados con otros sensores químicos. El aumento de la sensibilidad del dispositivo miniaturizado proviene del efecto catalítico relacionado con la actividad enzimática y con la propiedad adsorbente de la superficie modificada del electrodo; de esta forma se empleó una técnica voltamperométrica de redisolución anódica para la cuantificación.

La optimización de la metodología electroquímica incluyó: la influencia del tiempo de adsorción, la concentración de la enzima, el soporte electrolítico, la estabilidad de la respuesta en el tiempo y la velocidad del barrido electroquímico. Los parámetros analíticos como el LOD, la sensibilidad y la precisión respaldan las conclusiones concordantes con un sensor robusto y fiable para el análisis del fentanilo. Además, el análisis de muestras de orina enriquecidas con la sustancia psicoactiva mostró resultados de veracidad entre el 92% y el 100% con coeficientes de variación menores al 3%. La explicación de estos resultados se amplía en la

tercera publicación científica y satisface los objetivos cinco y seis del proyecto doctoral.

Los sensores electroquímicos miniaturizados con capacidad de respuesta *in situ* y monitorización con resolución temporal, se presentan en la actualidad como una opción rigurosa ante los requerimientos de los análisis preliminares de campo. La versatilidad en el diseño de sensores y en la experimentación electroquímica ofrece variadas alternativas analíticas para la pronta respuesta del análisis de nuevas sustancias psicoactivas, ya sea en matrices compuestas de drogas incautadas o en pruebas de toxicología con muestras biológicas de saliva, orina o plasma. La aparición continua de nuevas drogas en el mercado, así como la verificación y el control de sustancias fiscalizadas a nivel internacional, ofrecen un amplio campo de investigación y de aplicación de nuevos dispositivos cada vez más completos y robustos para el análisis químico de las drogas.

7 Conclusiones generales

Los sensores electroquímicos basados en micrométodos para el análisis químico de nuevas sustancias psicoactivas, requieren una mínima preparación de la muestra, generan pocos residuos químicos y suelen ser de menor costo que la instrumentación típica de análisis en un laboratorio químico.

Ciertas características operacionales observadas en el desarrollo de los sensores como la capacidad de resolución temporal, la portabilidad de la instrumentación para los análisis tanto en el laboratorio como en el campo, así como los cortos tiempos de respuesta de las técnicas electroquímicas o espectroelectroquímicas, les conceden ventajas sustanciales a estos dispositivos frente a otras metodologías para el análisis preliminar de NSP.

Los sensores fundamentados en las técnicas espectroelectroquímicas ofrecen un valor agregado al análisis químico, sustancialmente por combinar las ventajas de las técnicas electroquímicas como la sensibilidad y la versatilidad de los métodos, simultáneamente con las ventajas que brinda la huella espectroscópica de las sustancias para la determinación selectiva e inequívoca.

La biodetección voltamperométrica basada en la actividad catalítica de las enzimas, aumenta significativamente la sensibilidad y la selectividad de los dispositivos, parámetros deseados en el diseño de los sensores electroquímicos para analizar drogas puras, mezclas de drogas o cantidades remanentes posterior al consumo humano.

La factibilidad y la aplicabilidad demostradas de los métodos electroquímicos de los diferentes sensores desarrollados en este proyecto de investigación doctoral, revela la potencial aplicación de los sensores para la determinación de drogas en áreas como la toxicología o las ciencias forenses, principalmente en materiales incautados o en muestras biológicas como la orina o el fluido oral.

8 Referencias

- [1] United Nations office on Drugs and Crime (UNODC), World Drug Report 2021, 2021. www.unodc.org/unodc/en/data-and-analysis/wdr2021.html.
- [2] EMCDDA, European Drug Report 2019: Trends and Developments, 2019. <https://doi.org/10.1097/JSM.0b013e31802b4fda>.
- [3] R. Gittins, A. Guirguis, F. Schifano, I. Maidment, Exploration of the use of new psychoactive substances by individuals in treatment for substance misuse in the UK, *Brain Sci.* 8 (2018) 1–20. <https://doi.org/10.3390/brainsci8040058>.
- [4] O. Cottencin, B. Rolland, L. Karila, New Designer Drugs (Synthetic Cannabinoids and Synthetic Cathinones): Review of Literature, *Curr. Pharm. Des.* 20 (2014) 4106–4111. <https://doi.org/10.2174/13816128113199990622>.
- [5] O. Carmichael, S. Lockhart, The Growing Problem of New Psychoactive Substances (NPS), *Brain Imaging Behav. Neurosci.* (2017) 289–320. <https://doi.org/10.1007/7854>.
- [6] M. Mignone, O. Ingrassi, A. Colombo, A. Robins, Recognizing and identifying NPS for enforcement and forensic purposes, Torri di Quartesolo, 2016. https://www.npsproject.eu/wp-content/uploads/2017/03/NPS_Final_Forensic_web.pdf.
- [7] CGPD, Hora de poner fin a la prohibición, (2021). <http://www.globalcommissionondrugs.org>/<https://www.facebook.com/globalcommissionondrugs>/<https://twitter.com/globalcdp><https://www.youtube.com/c/GlobalCommissiononDrugPolicy>.
- [8] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA), European Drug Report 2021: Trends and Developments, 2021. <https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/13838/TDAT21001ENN.pdf>.
- [9] E.L. Friesen, P.A. Kurdyak, T. Gomes, G. Kolla, P. Leece, L. Zhu, E. Toombs, B. O’Neill, N.M. Stall, P. Jüni, C.J. Mushquash, L. Mah, The Impact of the COVID-19 Pandemic on Opioid-Related Harm in Ontario, 2021. <https://doi.org/10.47326/ocsat.2021.02.42.1.0>.
- [10] B. Pardo, P. Reuter, Enforcement strategies for fentanyl and other synthetic opioids, *Foreign Policy Glob. Econ. Dev. Programs Brookings.* (2020). chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.brookings.edu/wp-content/uploads/2020/06/5_Pardo-Reuter_final.pdf.
- [11] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA), Impact of COVID-19 on patterns of drug use and drug-related harms in Europe, (2020) 1–27. <https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/13130/EMCDD>

- A-Trendspotter-Covid-19-Wave-2_1.pdf.
- [12] CDC, Centers for Disease Control and Prevention, (2023). <https://www.cdc.gov/nchs/nvss/vsrr/drug-overdose-data.htm> (accessed March 5, 2023).
- [13] United Nations Office on Drugs and Crime, Métodos recomendados para la identificación y el análisis de los agonistas de los receptores de cannabinoides sintéticos en los materiales incautados, (2014) 72.
- [14] L. Shaw, L. Dennany, Applications of electrochemical sensors: Forensic drug analysis, *Curr. Opin. Electrochem.* 3 (2017) 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.coelec.2017.05.001>.
- [15] N. Anzar, S. Suleman, S. Parvez, J. Narang, A review on Illicit drugs and biosensing advances for its rapid detection, *Process Biochem.* 113 (2022) 113–124. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2021.12.021>.
- [16] L. Harper, J. Powell, E.M. Pijl, An overview of forensic drug testing methods and their suitability for harm reduction point-of-care services, *Harm Reduct. J.* 14 (2017). <https://doi.org/10.1186/s12954-017-0179-5>.
- [17] I.H. Cho, D.H. Kim, S. Park, Electrochemical biosensors: Perspective on functional nanomaterials for on-site analysis, *Biomater. Res.* 24 (2020) 1–12. <https://doi.org/10.1186/s40824-019-0181-y>.
- [18] E.M. Richter, A.L. Squissato, R.A.A. Munoz, C.E. Banks, An overview of recent electroanalytical applications of utilizing screen-printed electrodes within flow systems, *ChemElectroChem.* (2020). <https://doi.org/10.1002/celc.202000175>.
- [19] PAHO, Pan American Health Organization, (n.d.). <https://www.paho.org/en> (accessed February 17, 2023).
- [20] V. Lukić, R. Micić, B. Arsić, B. Nedović, Ž. Radosavljević, Overview of the major classes of new psychoactive substances, psychoactive effects, analytical determination and conformational analysis of selected illegal drugs, *Open Chem.* 19 (2021) 60–106. <https://doi.org/10.1515/chem-2021-0196>.
- [21] N. Unidas, J. Internacional, D.E.F.D.E. Estupefacientes, Informe de la Junta Internacional de Fiscalización de Estupefacientes relativo a la Disponibilidad de sustancias sometidas a fiscalización internacional: Garantizar suficiente acceso a esas sustancias para fines médicos y científicos, 2016. https://www.incb.org/documents/Publications/AnnualReports/AR2015/Spanish/Supplement-AR15_availability_Spanish.pdf.
- [22] UNODC, World Drug Report 2022, (2022). www.unodc.org/unodc/en/data-and-analysis/world-drug-report-2022.html (accessed February 25, 2023).
- [23] L. Arbour, P. Bém, R. Branson, M. Cattai, F.H. Cardoso, H. Clark, N. Clegg, Dreiffus, Classification of psychoactive substances: when science was left behind, *Glob. Com. Drug Policy.* (2019) 55.
- [24] H. Services, Alcohol and tobacco as preventable risk factors, *U.S Dep. Heal. Hum. Serv.* (2010) 6.

- [25] M. Madden, J. McCambridge, Alcohol marketing versus public health: David and Goliath?, *Global Health*. 17 (2021) 1–6. <https://doi.org/10.1186/s12992-021-00696-2>.
- [26] N.R. Sircar, S.A. Bialous, Assessing the links between human rights and global tobacco control through statements made on global fora, *BMC Public Health*. 21 (2021) 439. <https://doi.org/10.1186/s12889-021-10451-2>.
- [27] P.H. Service, *A Discussion Paper on Preventing Alcohol, Tobacco, and Other Drug Problems*, (1993).
- [28] U. Gneiting, H.P. Schmitz, Comparing global alcohol and tobacco control efforts: Network formation and evolution in international health governance, *Health Policy Plan*. 31 (2016) i98–i109. <https://doi.org/10.1093/heapol/czv125>.
- [29] E.R. Weitzman, Y.Y. Chen, S. V. Subramanian, Youth smoking risk and community patterns of alcohol availability and control: A national multilevel study, *J. Epidemiol. Community Health*. 59 (2005) 1065–1071. <https://doi.org/10.1136/jech.2005.033183>.
- [30] F. Zapata, J.M. Matey, G. Montalvo, C. García-Ruiz, Chemical classification of new psychoactive substances (NPS), *Microchem. J.* 163 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105877>.
- [31] United Nations office on Drugs and Crime (UNODC), *Terminología e Información sobre Drogas, Terminol. e Inf. Sobre Drog.* (2020). <https://doi.org/10.18356/ea02b5b2-es>.
- [32] United Nations Office on Drug and Crime, *Single Convention on Narcotic Drugs, 1961, 1972*. https://www.incb.org/documents/Narcotic-Drugs/1961-Convention/convention_1961_en.pdf.
- [33] United Nations, *Convention on Psychotropic Substances 1971, 1971*.
- [34] United Nations, *United Nations convention against illicit traffic in narcotic drugs and psychotropic substances, 1988, 1988*. https://treaties.un.org/Pages/ViewDetails.aspx?src=TREATY&mtdsg_no=VI-19&chapter=6&lang=en.
- [35] B. Pérez Salazar, A. Vizcaíno Solano, Tirado Acero Misael, *Las drogas: políticas nacionales e internacionales de control*, Editorial Universidad Católica de Colombia, 1999. <https://publicaciones.ucatolica.edu.co/gpd-las-drogas-politicas-nacionales-e-internacionales-de-control.html>.
- [36] United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC), *World Drug Report 2022 Booklet 2: Global Overview Drug Demand, 2022*.
- [37] Comisión Global de Políticas de Drogas, *Regulación: El Control Responsable de las Drogas*, (2018) 1–60. http://www.globalcommissionondrugs.org/wp-content/uploads/2018/09/SPA-2018_Regulation_Report_WEB-FINAL.pdf.
- [38] United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC), *World Drug Report 2022 Booklet 4: Drug Market Trends, 2022*.

- [39] Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías, Informe Europeo sobre Drogas 2022: Tendencias y novedades, 2022. www.emcdda.europa.eu.
- [40] UNODC (United Nations Office on Drugs and Crime), Early Warning Advisory on New Psychoactive Substances, (2023). <https://www.unodc.org/LSS/Page/NPS> (accessed February 21, 2023).
- [41] H. Dolengevich-Segal, B. Rodríguez-Salgado, J. Gómez-Arnau, D. Sánchez-Mateos, An approach to the new psychoactive drugs phenomenon, *Salud Ment.* 40 (2017) 71–82. <https://doi.org/10.17711/SM.0185-3325.2017.010>.
- [42] J. González Alonso, N. Llorens Aleixandre, Las Nuevas Sustancias Psicoactivas: un reto para la Salud Pública, 2014. http://www.pnsd.mscbs.gob.es/profesionales/publicaciones/catalogo/bibliotecaDigital/publicaciones/pdf/Nuevas_sustancias_espanol.pdf.
- [43] D.K. Tracy, D.M. Wood, D. Baumeister, Novel psychoactive substances: Types, mechanisms of action, and effects, *BMJ.* 356 (2017) 1–7. <https://doi.org/10.1136/bmj.i6848>.
- [44] S.L. Kacinko, D.M. Papsun, The evolving landscape of designer drugs, *Methods Mol. Biol.* 1872 (2019) 129–135. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8823-5_13.
- [45] DEA, United States Drug Enforcement Administration, (2023). <https://www.dea.gov/drug-information/drug-scheduling> (accessed February 21, 2023).
- [46] N. Sato, Electrode Reactions, *Electrochem. Met. Semicond. Electrodes.* (1998) 213–233. <https://doi.org/10.1016/b978-044482806-4/50007-6>.
- [47] A. Nilsson, L.G.M. Pettersson, J.K. Nørskov, Chemical Bonding at Surfaces and Interfaces, *Chem. Bond. Surfaces Interfaces.* (2008). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52837-7.X5001-1>.
- [48] J.M. Pingarrón, J. Labuda, J. Barek, C.M.A. Brett, M.F. Camões, M. Fojta, D.B. Hibbert, Terminology of electrochemical methods of analysis (IUPAC Recommendations 2019), *Pure Appl. Chem.* 92 (2020) 641–694. <https://doi.org/10.1515/pac-2018-0109>.
- [49] P.R. Hernández, C.A. Galán, A. Morales, S. Alegret, Measuring system for amperometric chemical sensors using the three-electrode technique for field application, *J. Appl. Res. Technol.* 1 (2003). <https://doi.org/10.22201/icat.16656423.2003.1.02.605>.
- [50] B. Segura, N. Jiménez, R. Giraldo, Prototipo de potenciostato con aplicaciones en procesos electroquímicos, *Entre Cienc. e Ing.* 10 (2016) 61–69.
- [51] Gamry Instruments, (n.d.). <https://www.gamry.com/> (accessed January 13, 2023).
- [52] Pine Research Instrumentation, Inc., (n.d.). <https://pineresearch.com/> (accessed January 13, 2023).
- [53] Bio-Logic Science Instruments, The mystery of potentiostat stability

- explained, (2005) 1–8. www.biologic.net.
- [54] Metrohm, Basic overview of the working principle of a potentiostat / galvanostat (PGSTAT) – Electrochemical cell setup, (2018) 2–4. www.metrohm.com/en/products/electrochemistry.
- [55] A.-A. Álvaro Angel, T.-C. Rosa Liliana, Sistema multipotenciostato basado en instrumentación virtual, *Ing. Investig. y Tecnol.* 15 (2014) 321–337. [https://doi.org/10.1016/s1405-7743\(14\)70344-0](https://doi.org/10.1016/s1405-7743(14)70344-0).
- [56] C.G. Zoski, J. Leddy, A.J. Bard, L.R. Faulkner, H.S. White, *Electrochemical methods: fundamentals and applications, student solutions manual*, JOHN WILEY, 2021.
- [57] C.D. Gary, *Química Analítica*, 6th ed., McGraw Hill Companies, Mexico D.F., 2009.
- [58] M. Wilches, L.F. Ruiz, M. Hernández, *Bioingeniería VI: Fundamentos de instrumentación para la química clínica y las radiaciones ionizantes*, 1st ed., Antioquía, Universidad de, Colombia, 2007.
- [59] M.T. Fernández Abedul, Chapter 1 - Dynamic electroanalysis: an overview, in: M.T. Fernandez Abedul (Ed.), *Lab. Methods Dyn. Electroanal.*, Elsevier, 2020: pp. 1–10. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815932-3.00001-2>.
- [60] A. Ivaska, J. Bobacka, PROCESS ANALYSIS | Electroanalytical Techniques, in: P. Worsfold, A. Townshend, C. Poole (Eds.), *Encycl. Anal. Sci. (Second Ed., Second Edi*, Elsevier, Oxford, 2005: pp. 309–316. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B0-12-369397-7/00487-8>.
- [61] International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), *Compendium of Chemical Terminology: Gold Book*, 2.3.3, 2014. <https://doi.org/10.1351/goldbook>.
- [62] C. León, *Química Electroanalítica: Polarografía, voltamperometría y amperometría*, 1st ed., Editorial Universidad de Costa Rica, San José, CR, 2007.
- [63] D. Harvey, *Analytical Chemistry 2.1*, 2.1, DePauw University, 2016. https://books.google.co.cr/books?id=CBN%5C_zQEACAAJ.
- [64] V. Almagro, *Cinética electroquímica*, *An. La Univ. Murcia.* XXIII (1965).
- [65] D.A. Skoog, D.M. West, *Análisis instrumental*, 2nd ed., McGraw-Hill, 1989.
- [66] K.B. Oldham, Advances in Engineering Software Fractional differential equations in electrochemistry j o t, *Adv. Eng. Softw.* 41 (2010) 9–12. <https://doi.org/10.1016/j.advengsoft.2008.12.012>.
- [67] E. Fields, S.E. Fields, *Encyclopedia of Applied Electrochemistry*, 2014. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6996-5>.
- [68] R. Seeber, C. Zanardi, The inherent coupling of charge transfer and mass transport processes: the curious electrochemical reversibility, (2016). <https://doi.org/10.1007/s40828-016-0027-3>.
- [69] J.R. Selman, C.W. Tobias, *Mass-Transfer Measurements by the Limiting-*

- Current Technique, (n.d.).
- [70] P. Kurzweil, *Electrochemical Double-layer Capacitors*, Elsevier B.V., 2015. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-62616-5.00019-X>.
- [71] P. Pal, *Physicochemical Treatment Technology*, Ind. Water Treat. Process Technol. (2017) 145–171. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-810391-3.00004-7>.
- [72] D. Harvey, *Instrumental Analysis*, DePauw Univ. (2022).
- [73] G. Bontempelli, N. Dossi, R. Toniolo, *Linear Sweep and Cyclic*, Elsevier Inc., 2016. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-409547-2.12200-0>.
- [74] H. YAMADA, K. YOSHII, M. ASAHII, M. CHIKU, Y. KITAZUMI, *Cyclic Voltammetry Part 1: Fundamentals*, *Electrochemistry*. 90 (2022) 102005–102005. <https://doi.org/10.5796/electrochemistry.22-66082>.
- [75] C. Batchelor-McAuley, D. Li, R.G. Compton, *Mass-Transport-Corrected Transfer Coefficients: A Fully General Approach*, *ChemElectroChem*. 7 (2020) 3844–3851. <https://doi.org/10.1002/celec.202001107>.
- [76] N. Elgrishi, K.J. Rountree, B.D. McCarthy, E.S. Rountree, T.T. Eisenhart, J.L. Dempsey, *A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry*, *J. Chem. Educ.* 95 (2018) 197–206. <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.7b00361>.
- [77] G. Bontempelli, N. Dossi, R. Toniolo, *Voltammetry | Polarography*, in: P. Worsfold, C. Poole, A. Townshend, M. Miró (Eds.), *Encycl. Anal. Sci.* (Third Ed., Third Edit, Academic Press, Oxford, 2019: pp. 218–229. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.14326-4>.
- [78] P. Westbroek, *2 - Electrochemical methods*, in: P. Westbroek, G. Priniotakis, P. Kiekens (Eds.), *Anal. Electrochem. Text.*, Woodhead Publishing, 2005: pp. 37–69. <https://doi.org/https://doi.org/10.1533/9781845690878.1.37>.
- [79] J.L. Morris, L.R. Faulkner, *Normal Pulse Voltammetry in Electrochemically Poised Systems*, *Anal. Chem.* 49 (1977) 489–494. <https://doi.org/10.1021/ac50011a038>.
- [80] N. Kumar, A. Arora, A. Krishnan, *Complementary AC Voltammetry - A Method for Simultaneous Measurement of Faradaic and Nonfaradaic Currents in an Electrochemically Reversible System*, *IEEE Sens. J.* 20 (2020) 13196–13203. <https://doi.org/10.1109/JSEN.2020.3004426>.
- [81] A. Hulanicki, S. Glab, F. Ingman, *Chemical sensors definitions and classification*, *Pure Appl. Chem.* 63 (1991) 1247–1250. <https://doi.org/10.1351/pac199163091247>.
- [82] J.M. Freitas, T. da C. Oliveira, R.A.A. Munoz, E.M. Richter, *Boron doped diamond electrodes in flow-based systems*, *Front. Chem.* 7 (2019). <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00190>.
- [83] H.E. Zittel, F.J. Miller, *A Glassy-Carbon Electrode for Voltammetry*, *Anal. Chem.* 37 (1965) 200–203. <https://doi.org/10.1021/ac60221a006>.
- [84] T.C. Canevari, *3 - Application of hybrid nanomaterials for development of*

- electrochemical sensors, in: C.M. Hussain, J.G. Manjunatha (Eds.), *Funct. Nanomater. Electrochem. Sensors*, Woodhead Publishing, 2022: pp. 41–53. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823788-5.00002-8>.
- [85] Z. Hugh Fan, *Chemical Sensors and Microfluidics*, *J. Biosens. Bioelectron.* 04 (2013) 1–2. <https://doi.org/10.4172/2155-6210.1000e117>.
- [86] S. Singh, J. Wang, S. Cinti, Review—An Overview on Recent Progress in Screen-Printed Electroanalytical (Bio)Sensors, *ECS Sensors Plus.* 1 (2022) 023401. <https://doi.org/10.1149/2754-2726/ac70e2>.
- [87] M. Li, Y.T. Li, D.W. Li, Y.T. Long, Recent developments and applications of screen-printed electrodes in environmental assays-A review, *Anal. Chim. Acta.* 734 (2012) 31–44. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.05.018>.
- [88] Z. Taleat, A. Khoshroo, M. Mazloum-Ardakani, Screen-printed electrodes for biosensing: A review (2008-2013), *Microchim. Acta.* 181 (2014) 865–891. <https://doi.org/10.1007/s00604-014-1181-1>.
- [89] H. Beitollahi, S.Z. Mohammadi, M. Safaei, S. Tajik, Applications of electrochemical sensors and biosensors based on modified screen-printed electrodes: A review, *Anal. Methods.* 12 (2020) 1547–1560. <https://doi.org/10.1039/c9ay02598g>.
- [90] A. García-Miranda Ferrari, S.J. Rowley-Neale, C.E. Banks, Screen-printed electrodes: Transitioning the laboratory in-to-the field, *Talanta Open.* 3 (2021) 100032. <https://doi.org/10.1016/j.talo.2021.100032>.
- [91] J. Baranwal, B. Barse, G. Gatto, G. Broncova, A. Kumar, *Electrochemical Sensors and Their Applications: A Review*, *Chemosensors.* 10 (2022). <https://doi.org/10.3390/chemosensors10090363>.
- [92] N.R. Stradiotto, H. Yamanaka, M.V.B. Zanoni, Electrochemical sensors: A powerful tool in analytical chemistry, *J. Braz. Chem. Soc.* 14 (2003) 159–173. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532003000200003>.
- [93] C.M. Hussain, R. Keçili, Electrochemical techniques for environmental analysis, *Mod. Environ. Anal. Tech. Pollut.* (2020) 199–222. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-816934-6.00008-4>.
- [94] H. Bi, X. Han, *Chemical sensors for environmental pollutant determination*, Elsevier Inc., 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815409-0.00010-3>.
- [95] C.C. Liu, *Electrochemical sensors*, *Med. Devices Syst.* 07 (2006) 48-1-48–6. <https://doi.org/10.5796/kogyobutsurikagaku.58.1087>.
- [96] F.R. Simões, M.G. Xavier, 6 - *Electrochemical Sensors*, in: *Nanosci. Its Appl.*, Elsevier Inc., 2017: p. 0. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-49780-0/00006-5>.
- [97] C. Kokkinos, A. Economou, Recent advances in voltammetric, amperometric and ion-selective (bio)sensors fabricated by microengineering manufacturing approaches, *Curr. Opin. Electrochem.* (2020). <https://doi.org/10.1016/j.coelec.2020.02.020>.

- [98] J. Brugger, Editorial: Nanotechnology impact on sensors, *Nanotechnology*. 20 (2009) 19–21. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/20/43/430206>.
- [99] J.R. Stetter, W.R. Penrose, S. Yao, *Sensors, Chemical Sensors, Electrochemical Sensors, and ECS*, *J. Electrochem. Soc.* 150 (2003) S11. <https://doi.org/10.1149/1.1539051>.
- [100] S. Rajendrachari, D. Ramakrishna, 1 - Functionalized nanomaterial-based electrochemical sensors: A sensitive sensor platform, in: C.M. Hussain, J.G. Manjunatha (Eds.), *Funct. Nanomater. Electrochem. Sensors*, Woodhead Publishing, 2022: pp. 3–25. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823788-5.00010-7>.
- [101] A. Walcarius, S.D. Minteer, J. Wang, Y. Lin, A. Merkoçi, Nanomaterials for bio-functionalized electrodes: Recent trends, *J. Mater. Chem. B*. 1 (2013) 4878–4908. <https://doi.org/10.1039/c3tb20881h>.
- [102] S. Vigneshvar, C.C. Sudhakumari, B. Senthilkumaran, H. Prakash, Recent advances in biosensor technology for potential applications - an overview, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 4 (2016) 1–9. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2016.00011>.
- [103] C.C. Jiménez, D.E.P. León, Biosensors: Implementation and outlook in the control and process quality and foodstuffs, *Vitae*. 16 (2009) 144–154.
- [104] L.C. Clark, C. Lyons, Electrode Systems for Continuous Monitoring in Cardiovascular Surgery, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 102 (1962) 29–45. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x>.
- [105] N. Bhalla, P. Jolly, N. Formisano, P. Estrela, Introduction to biosensors, *Essays Biochem.* 60 (2016) 1–8. <https://doi.org/10.1042/EBC20150001>.
- [106] C.M. Silveira, M.G. Almeida, Small electron-transfer proteins as mediators in enzymatic electrochemical biosensors, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 3619–3635. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-6786-4>.
- [107] A.A. Homaei, R. Sariri, F. Vianello, R. Stevanato, Enzyme immobilization: An update, *J. Chem. Biol.* 6 (2013) 185–205. <https://doi.org/10.1007/s12154-013-0102-9>.
- [108] D.R. Walt, V.I. Agayn, The chemistry of enzyme and protein immobilization with glutaraldehyde, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 13 (1994) 425–430. [https://doi.org/10.1016/0165-9936\(94\)85023-2](https://doi.org/10.1016/0165-9936(94)85023-2).
- [109] F. López-Gallego, J.M. Guisán, L. Betancor, Glutaraldehyde-mediated protein immobilization, *Methods Mol. Biol.* 1051 (2013) 33–41. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-550-7_3.
- [110] F. López-Gallego, L. Betancor, C. Mateo, A. Hidalgo, N. Alonso-Morales, G. Dellamora-Ortiz, J.M. Guisán, R. Fernández-Lafuente, Enzyme stabilization by glutaraldehyde crosslinking of adsorbed proteins on aminated supports, *J. Biotechnol.* 119 (2005) 70–75. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.05.021>.
- [111] W. Kaim, J. Fiedler, Spectroelectrochemistry: The best of two worlds, *Chem.*

- Soc. Rev. 38 (2009) 3373–3382. <https://doi.org/10.1039/b504286k>.
- [112] R.J. Mortimer, *Spectroelectrochemistry: Applications*, 3rd ed., Elsevier Ltd., 2016. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803224-4.00288-0>.
- [113] R. Bersohn, B.J. Berne, *Chemical Physics*, in: R.A.B.T.-E. of P.S. and T. (Third E. Meyers (Ed.), Academic Press, New York, 2003: pp. 739–749. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B0-12-227410-5/00099-5>.
- [114] Y. Ozaki, Recent advances in molecular spectroscopy of electronic and vibrational transitions in condensed phase and its application to chemistry, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 92 (2019) 629–654. <https://doi.org/10.1246/bcsj.20180319>.
- [115] C.E. Ott, A. Burns, E. Sisco, L.E. Arroyo, Targeted fentanyl screening utilizing electrochemical surface-enhanced Raman spectroscopy (EC-SERS) applied to authentic seized drug casework samples, *Forensic Chem.* 34 (2023) 100492. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.forc.2023.100492>.
- [116] J. Garoz-Ruiz, J.V. Perales-Rondon, A. Heras, A. Colina, Spectroelectrochemical Sensing: Current Trends and Challenges, *Electroanalysis.* 31 (2019) 1254–1278. <https://doi.org/10.1002/elan.201900075>.
- [117] A.-H.A. Shah, UV–Vis Spectroelectrochemistry BT - Encyclopedia of Applied Electrochemistry, in: G. Kreysa, K. Ota, R.F. Savinell (Eds.), Springer New York, New York, NY, 2014: pp. 2099–2102. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6996-5_242.
- [118] T.E. Keyes, R.J. Forster, *Spectroelectrochemistry*, *Handb. Electrochem.* (2007) 591–635.
- [119] F. Miomandre, P. Audebert, *Luminescence in Electrochemistry*, 2017. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-49137-0>.
- [120] J. Kirchhoff, *Luminescence Spectroelectrochemistry*, *Curr. Sep.* 1 (1997) 11–14. <https://www.basinc.com/assets/library/issues/16-1/cs16-1b.pdf>.
- [121] W.J. Paschoalino, S. Kogikoski, J.T.C. Barragan, J.F. Giarola, L. Cantelli, T.M. Rabelo, T.M. Pessanha, L.T. Kubota, *Electrochemiluminescence*, *ChemElectroChem.* 6 (2019) 10–30.
- [122] J.J.A. Lozeman, P. Führer, W. Olthuis, M. Odijk, Spectroelectrochemistry the future of visualizing electrode processes by hyphenating electrochemistry with spectroscopic techniques, *Analyst.* 145 (2020) 2482–2509. <https://doi.org/10.1039/c9an02105a>.
- [123] L. León, J.D. Mozo, Designing spectroelectrochemical cells: A review, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 102 (2018) 147–169. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.02.002>.
- [124] A. Roguska, A. Kudelski, M. Pisarek, M. Lewandowska, K.J. Kurzydłowski, M. Janik-Czachor, In situ spectroelectrochemical surface-enhanced Raman scattering (SERS) investigations on composite Ag/TiO₂-nanotubes/Ti substrates, *Surf. Sci.* 603 (2009) 2820–2824. <https://doi.org/10.1016/j.susc.2009.07.028>.

- [125] S. Hernandez, J. V. Perales-Rondon, A. Heras, A. Colina, Electrochemical SERS and SOERS in a single experiment: A new methodology for quantitative analysis, *Electrochim. Acta.* 334 (2020) 135561. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2019.135561>.
- [126] R. Moldovan, E. Vereshchagina, K. Milenko, B. Iacob, A. Elena, A. Falamas, N. Tosa, C.M. Muntean, Review on combining surface-enhanced Raman spectroscopy and electrochemistry for analytical applications, *Anal. Chim. Acta.* (2021). <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.339250>.
- [127] H. Xu, J. Aizpurua, M. Käll, P. Apell, Electromagnetic contributions to single-molecule sensitivity in surface-enhanced Raman scattering, *Phys. Rev. E - Stat. Physics, Plasmas, Fluids, Relat. Interdiscip. Top.* 62 (2000) 4318–4324. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.62.4318>.
- [128] E.C. Le Ru, P.G. Etchegoin, Single-molecule surface-enhanced raman spectroscopy, *Annu. Rev. Phys. Chem.* 63 (2012) 65–87. <https://doi.org/10.1146/annurev-physchem-032511-143757>.
- [129] H.M. Lee, S.M. Jin, H.M. Kim, Y.D. Suh, Single-molecule surface-enhanced Raman spectroscopy: A perspective on the current status, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 15 (2013) 5276–5287. <https://doi.org/10.1039/c3cp444463e>.
- [130] D. Martín-Yerga, A. Pérez-Junquera, M.B. González-García, D. Hernández-Santos, P. Fanjul-Bolado, Towards single-molecule: In situ electrochemical SERS detection with disposable substrates, *Chem. Commun.* 54 (2018) 5748–5751. <https://doi.org/10.1039/c8cc02069h>.
- [131] A.J. Wain, M.A. O'connell, Advances in surface-enhanced vibrational spectroscopy at electrochemical interfaces, *Adv. Phys. X.* 2 (2017) 188–209. <https://doi.org/10.1080/23746149.2016.1268931>.
- [132] United Nations office on Drugs and Crime (UNODC), Recommended Methods for The Identification and Analysis of Fentanyl and Its Analogues in Biological Specimens, (2018). <https://doi.org/10.18356/aca7aca5-en>.
- [133] J.S.-C. Tsai, G.L. Lin, Drug-Testing Technologies and Applications BT - Drugs of Abuse: Body Fluid Testing, in: R.C. Wong, H.Y. Tse (Eds.), Humana Press, Totowa, NJ, 2005: pp. 29–69. https://doi.org/10.1007/978-1-59259-951-6_3.
- [134] M. Akutsu, K. ichi Sugie, K. Saito, Analysis of 62 synthetic cannabinoids by gas chromatography–mass spectrometry with photoionization, *Forensic Toxicol.* 35 (2016) 1–10. <https://doi.org/10.1007/s11419-016-0342-9>.
- [135] N. Jornet-Martínez, Y. Moliner-Martínez, C. Molins-Legua, P. Campíns-Falcó, Trends for the Development of In Situ Analysis Devices, *Encycl. Anal. Chem.* (2017) 1–23. <https://doi.org/10.1002/9780470027318.a9593>.
- [136] R.A.S. Couto, J.L.F.C. Lima, M.B. Quinaz, Recent developments, characteristics and potential applications of screen-printed electrodes in pharmaceutical and biological analysis, *Talanta.* 146 (2016) 801–814. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.06.011>.

- [137] D. Love, N.S. Jones, Interpol Review of Drug Analysis 2019-2022, *Forensic Sci. Int. Synerg.* 6 (2023) 100299. <https://doi.org/10.1016/j.fsisyn.2022.100299>.
- [138] A.F.B. Andrade, S.K. Mamo, J. Gonzalez-Rodriguez, Rapid screening method for new psychoactive substances of forensic interest: Electrochemistry and analytical determination of phenethylamines derivatives (NBOMe) via cyclic and differential pulse voltammetry, *Anal. Chem.* 89 (2016) 1445–1452. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b02426>.
- [139] G.A. Souza, L.C. Arantes, T.J. Guedes, A.C. de Oliveira, P.A. Marinho, R.A.A. Muñoz, W.T.P. dos Santos, Voltammetric signatures of 2,5-dimethoxy-N-(2-methoxybenzyl) phenethylamines on boron-doped diamond electrodes: Detection in blotting paper samples, *Electrochem. Commun.* 82 (2017) 121–124. <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2017.08.001>.
- [140] G.A. Souza, D.M. Pimentel, A.B. Lima, T.J. Guedes, L.C. Arantes, A.C. De Oliveira, R.M.F. Sousa, R.A.A. Muñoz, W.T.P. Dos Santos, Electrochemical sensing of NBOMes and other new psychoactive substances in blotting paper by square-wave voltammetry on a boron-doped diamond electrode, *Anal. Methods.* 10 (2018) 2411–2418. <https://doi.org/10.1039/c8ay00385h>.
- [141] J. González-Hernández, A.L. Alvarado-Gámez, L.E. Arroyo-Mora, M. Barquero-Quirós, Electrochemical determination of novel psychoactive substances by differential pulse voltammetry using a microcell for boron-doped diamond electrode and screen-printed electrodes based on carbon and platinum, *J. Electroanal. Chem.* 882 (2021) 114994. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2021.114994>.
- [142] S.A. Waddell, C. Fernandez, C.C. Inverarity, R. Prabhu, Extending the capability of forensic electrochemistry to the novel psychoactive substance benzylpiperazine, *Sens. Bio-Sensing Res.* 13 (2017) 28–39. <https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2016.12.001>.
- [143] R.G. Rocha, I.C.O.F. Silva, L.C. Arantes, J.S. Stefano, C.D. Lima, L.M.A. Melo, R.A.A. Munoz, W.T.P. dos Santos, E.M. Richter, Simple and rapid electrochemical detection of 1-benzylpiperazine on carbon screen-printed electrode, *Microchem. J.* 167 (2021) 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106282>.
- [144] E. El-Naby, Potentiometric Signal Transduction for Selective Determination of 1-(3-Chlorophenyl)piperazine “Legal Ecstasy” Through Biomimetic Interaction Mechanism, *Chemosensors.* 7 (2019) 46. <https://doi.org/10.3390/chemosensors7030046>.
- [145] L.R. Rocha, J. de Cássica Mendonça, T. Boareto Capelari, R. Antigo Medeiros, C.R. Teixeira Tarley, Development of a reliable and selective voltammetric method for determination of designer drug 1-(3-chlorophenyl)piperazine (mCPP) using boron-doped diamond electrode and exploiting surfactant-mediated measurements, *Sensors Actuators, B Chem.* 310 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.127812>.
- [146] W.P. Silva, R.G. Rocha, L.C. Arantes, C.D. Lima, L.M.A. Melo, R.A.A. Munoz,

- W.T.P. dos Santos, E.M. Richter, Development of a simple and rapid screening method for the detection of 1-(3-chlorophenyl)piperazine in forensic samples, *Talanta*. 233 (2021) 122597. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122597>.
- [147] G. Plaza, B. Piña, H. Herrera, K. Calfuman, Electrochemical determination of N,N-dimethyltryptamine in water based on tetra-ruthenated porphyrins and ionic liquid modified electrodes, *J. Chil. Chem. Soc.* 65 (2020) 4668–4671. <https://doi.org/10.4067/S0717-97072020000104668>.
- [148] J.P. Smith, J.P. Metters, C. Irving, O.B. Sutcliffe, C.E. Banks, Forensic electrochemistry: the electroanalytical sensing of synthetic cathinone-derivatives and their accompanying adulterants in “legal high” products, *Analyst*. 139 (2013) 389–400. <https://doi.org/10.1039/c3an01985c>.
- [149] J.P. Smith, J.P. Metters, O.I.G. Khreit, O.B. Sutcliffe, C.E. Banks, 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.* 86 (2014) 9985–9992. <https://doi.org/10.1021/ac502991g>.
- [150] F. Tan, J.P. Smith, O.B. Sutcliffe, C.E. Banks, Regal electrochemistry: Sensing of the synthetic cathinone class of new psychoactive substances (NPSs), *Anal. Methods*. 7 (2015) 6470–6474. <https://doi.org/10.1039/c5ay01820j>.
- [151] I. Razavipanah, E. Alipour, B. Deiminiat, G.H. Rounaghi, A novel electrochemical imprinted sensor for ultrasensitive detection of the new psychoactive substance “Mephedrone,” *Biosens. Bioelectron.* 119 (2018) 163–169. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.08.016>.
- [152] J. Gonz, C.E. Ott, Á. Colina, A. Lorena, R. Urcuyo, L.E. Arroyo-mora, by Spectroelectrochemistry: Simultaneous Cyclic Voltammetry and In Situ Surface-Enhanced Raman Spectroscopy, (2022).
- [153] G.C. Papaioannou, S. Karastogianni, S. Girousi, Development of an Electrochemical Sensor Using a Modified Carbon Paste Electrode with Silver Nanoparticles Capped with Saffron for Monitoring Mephedrone, *Sensors*. 22 (2022). <https://doi.org/10.3390/s22041625>.
- [154] M.C. Prete, L.R. Rocha, C.R.T. Tarley, Chapter 4 - Development of new electroanalytical method based on graphene oxide-modified glassy carbon electrode for mephedrone illicit drug determination, in: J.G. Manjunatha, C.M.B.T.-C.N.-B.S. Hussain (Eds.), Elsevier, 2022: pp. 43–56. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91174-0.00022-6>.
- [155] E. Pospíšilová, N. Paškanová, M. Kuchař, T. V. Shishkanova, Potentiometric Determination of Mephedrone in Oral Fluids with Ion-Selective Membranes, *Electroanalysis*. (2023) 1–9. <https://doi.org/10.1002/elan.202200468>.
- [156] S.A. Goodchild, L.J. Hubble, R.K. Mishra, Z. Li, K.Y. Goud, A. Barfidokht, R. Shah, K.S. Bagot, A.J.S. McIntosh, J. Wang, Ionic Liquid-Modified Disposable Electrochemical Sensor Strip for Analysis of Fentanyl, *Anal. Chem.* 91 (2019) 3747–3753. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b00176>.

- [157] A. Barfidokht, R.K. Mishra, R. Seenivasan, S. Liu, L.J. Hubble, J. Wang, D.A. Hall, Wearable electrochemical glove-based sensor for rapid and on-site detection of fentanyl, *Sensors Actuators, B Chem.* 296 (2019) 126422. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.04.053>.
- [158] E. Sohoulí, A.H. Keihan, F. Shahdost-fard, E. Naghian, M.E. Plonska-Brzezinska, M. Rahimi-Nasrabadi, F. Ahmadi, A glassy carbon electrode modified with carbon nanooxions for electrochemical determination of fentanyl, *Mater. Sci. Eng. C.* 110 (2020) 110684. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110684>.
- [159] N. Wester, E. Mynttinen, J. Etula, T. Lilius, E. Kalso, B.F. Mikladal, Q. Zhang, H. Jiang, S. Sainio, D. Nordlund, E.I. Kauppinen, T. Laurila, J. Koskinen, Single-Walled Carbon Nanotube Network Electrodes for the Detection of Fentanyl Citrate, *ACS Appl. Nano Mater.* 3 (2020) 1203–1212. <https://doi.org/10.1021/acsanm.9b01951>.
- [160] E. Naghian, E. Marzi Khosrowshahi, E. Sohoulí, F. Ahmadi, M. Rahimi-Nasrabadi, V. Safarifard, A new electrochemical sensor for the detection of fentanyl lethal drug by a screen-printed carbon electrode modified with the open-ended channels of Zn(ii)-MOF, *New J. Chem.* 44 (2020) 9271–9277. <https://doi.org/10.1039/d0nj01322f>.
- [161] C.E. Ott, H. Cunha-Silva, S.L. Kuberski, J.A. Cox, M.J. Arcos-Martínez, L.E. Arroyo-Mora, Electrochemical detection of fentanyl with screen-printed carbon electrodes using square-wave adsorptive stripping voltammetry for forensic applications, *J. Electroanal. Chem.* 873 (2020) 114425. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2020.114425>.
- [162] Mostafa Najafi, E. Sohoulí, F. Mousavi, An Electrochemical Sensor for Fentanyl Detection Based on Multi-Walled Carbon Nanotubes as Electrocatalyst and the Electrooxidation Mechanism, *J. Anal. Chem.* 75 (2020) 1209–1217. <https://doi.org/10.1134/S1061934820090130>.
- [163] H. Ding, W. Tao, Synthesis of NiO-CNTs nanocomposite for modification of glassy carbon electrode and Application for Electrochemical determination of fentanyl as an opioid analgesic drug, *Int. J. Electrochem. Sci.* 16 (2021) 1–12. <https://doi.org/10.20964/2021.11.33>.
- [164] R.K. Mishra, A. Krishnakumar, A. Zareei, U. Heredia-Rivera, R. Rahimi, Electrochemical sensor for rapid detection of fentanyl using laser-induced porous carbon-electrodes, *Microchim. Acta.* 189 (2022). <https://doi.org/10.1007/s00604-022-05299-1>.
- [165] M. Akbari, M.S. Mohammadnia, M. Ghalkhani, M. Aghaei, E. Sohoulí, M. Rahimi-Nasrabadi, M. Arbabi, H.R. Banafshe, A. Sobhani-Nasab, Development of an electrochemical fentanyl nanosensor based on MWCNT-HA/ Cu-H3BTC nanocomposite, *J. Ind. Eng. Chem.* 114 (2022) 418–426. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2022.07.032>.
- [166] N. Tokranova, N. Cady, A. Lampher, I.A. Levitsky, Highly Sensitive Fentanyl Detection Based on Nanoporous Electrochemical Immunosensors, *IEEE Sens. J.* 22 (2022) 20165–20170. <https://doi.org/10.1109/jsen.2022.3200591>.

- [167] D. Jun, G. Sammis, P. Rezazadeh-Azar, E. Ginoux, D. Bizzotto, Development of a Graphene-Oxide-Deposited Carbon Electrode for the Rapid and Low-Level Detection of Fentanyl and Derivatives, *Anal. Chem.* 94 (2022) 12706–12714. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.2c02057>.
- [168] J. González-Hernández, G. Alvarado-Moya, A.L. Alvarado-Gámez, R. Urcuyo, M.J. Arcos-Martínez, Electrochemical biosensor for quantitative determination of fentanyl based on immobilized cytochrome c on multi-walled carbon nanotubes modified screen-printed carbon electrodes, *Microchim. Acta.* (2022) 1–12. <https://doi.org/10.1007/s00604-022-05578-x>.
- [169] M. Dronova, E. Smolianitski, O. Lev, Electrooxidation of New Synthetic Cannabinoids: Voltammetric Determination of Drugs in Seized Street Samples and Artificial Saliva, *Anal. Chem.* 88 (2016) 4487–4494. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b00368>.
- [170] C.E. Ott, H. Cunha-Silva, S.L. Kuberski, J.A. Cox, M.J. Arcos-Martínez, L.E. Arroyo-Mora, Electrochemical detection of fentanyl with screen-printed carbon electrodes using square-wave adsorptive stripping voltammetry for forensic applications, *J. Electroanal. Chem.* 873 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2020.114425>.
- [171] S.S. Ba Hashwan, M.F. Fatin, A.R. Ruslinda, M.K. Md Arshad, U. Hashim, R.M. Ayub, Functionalization of Multi Wall Carbon Nanotubes Using Nitric Acid Oxidation, *Appl. Mech. Mater.* 754–755 (2015) 1156–1160. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/amm.754-755.1156>.
- [172] I. Horcas, R. Fernández, J.M. Gómez-Rodríguez, J. Colchero, J. Gómez-Herrero, A.M. Baro, WSXM: A software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology, *Rev. Sci. Instrum.* 78 (2007). <https://doi.org/10.1063/1.2432410>.
- [173] UNODC, World Drug Report 2019, 2019. <https://doi.org/10.18356/bdc264f4-en>.
- [174] UNODC, Current NPS Threats, 2020. https://www.unodc.org/documents/scientific/Current_NPS_Threats_Volume_II_Web.pdf.
- [175] S. Castiglioni, Assessing illicit drugs in wastewater: advances in wastewater-based drug epidemiology, 2016. <https://doi.org/10.2810/017397>.
- [176] C.A. Bartlett, S. Taylor, C. Fernandez, C. Wanklyn, D. Burton, E. Enston, A. Raniczkowska, M. Black, L. Murphy, Disposable screen printed sensor for the electrochemical detection of methamphetamine in undiluted saliva, *Chem. Cent. J.* 10 (2016) 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13065-016-0147-2>.
- [177] H.M. Elbardisy, C.W. Foster, L. Cumba, L.H. Antonides, N. Gilbert, C.J. Schofield, T.S. Belal, W. Talaat, O.B. Sutcliffe, H.G. Daabees, C.E. Banks, Analytical determination of heroin, fentanyl and fentalogues using high-performance liquid chromatography with diode array and amperometric detection, *Anal. Methods.* 11 (2019) 1053–1063. <https://doi.org/10.1039/c9ay00009g>.

- [178] Q. Xu, A. Yuan, R. Zhang, X. Bian, D. Chen, X. Hu, Application of Electrochemical Methods for Pharmaceutical and Drug Analysis, *Curr. Pharm. Anal.* 5 (2009) 144–155. <https://doi.org/10.2174/157341209788172889>.
- [179] J.P. Smith, O.B. Sutcliffe, C.E. Banks, An overview of recent developments in the analytical detection of new psychoactive substances (NPSs), *Analyst.* 140 (2015) 4932–4948. <https://doi.org/10.1039/c5an00797f>.
- [180] A.N. Lad, A. Pandya, Y.K. Agrawal, Overview of nano-enabled screening of drug-facilitated crime: A promising tool in forensic investigation, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 80 (2016) 458–470. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.07.016>.
- [181] D. Antuña-Jiménez, M.B. González-García, D. Hernández-Santos, P. Fanjul-Bolado, Screen-printed electrodes modified with metal nanoparticles for small molecule sensing, *Biosensors.* 10 (2020) 1–22. <https://doi.org/10.3390/bios10020009>.
- [182] G.B. Slepchenko, T.M. Gindullina, S. V. Nekhoroshev, Capabilities of the electrochemical methods in the determination of narcotic and psychotropic drugs in forensic chemistry materials, *J. Anal. Chem.* 72 (2017) 703–709. <https://doi.org/10.1134/S1061934817070127>.
- [183] M. Klimuntowski, M.M. Alam, G. Singh, M.M.R. Howlader, Electrochemical Sensing of Cannabinoids in Biofluids: A Noninvasive Tool for Drug Detection, *ACS Sensors.* (2020). <https://doi.org/10.1021/acssensors.9b02390>.
- [184] UNODC, Terminology and Information on Drugs, Third, United Nations Publication, New York, USA, 2016. <https://doi.org/10.18356/0f5bdc21-en>.
- [185] UNODC (United Nations Office on Drugs and Crime), World Drug Report 2020, 2020. <https://doi.org/10.18356/025e247e-en>.
- [186] S. Gibbons, M. Zloh, An analysis of the “legal high” mephedrone, *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 20 (2010) 4135–4139. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.05.065>.
- [187] EMCDDA (The European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction), European Drug Report 2020: Trends and developments, 2020. <https://doi.org/10.2810/420678>.
- [188] L.D. Simmler, T.A. Buser, M. Donzelli, Y. Schramm, L.H. Dieu, J. Huwyler, S. Chaboz, M.C. Hoener, M.E. Liechti, Pharmacological characterization of designer cathinones in vitro, *Br. J. Pharmacol.* 168 (2013) 458–470. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.02145.x>.
- [189] E. Papaseit, C. Pérez-Mañá, E.B. de Sousa Fernandes Perna, E. Olesti, J. Mateus, K.P.C. Kuypers, E.L. Theunissen, F. Fonseca, M. Torrens, J.G. Ramaekers, R. de la Torre, M. Farré, Mephedrone and alcohol interactions in humans, *Front. Pharmacol.* 10 (2020). <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01588>.
- [190] UNODC (United Nations Office on Drugs and Crime), Recommended methods for the Identification and Analysis of Synthetic Cathinones in Seized Materials, 2020.

- https://www.unodc.org/documents/scientific/Recommended_methods_for_the_Identification_and_Analysis_of_Synthetic_Cathinones_in_Seized_Materials-Rev..pdf.
- [191] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA), Report on the risk assessment of mephedrone in the framework of the Council Decision on new psychoactive substances, 2011. <http://www.emcdda.europa.eu/html.cfm/index116639EN.html>.
- [192] R. Nissim, R.G. Compton, Absorptive stripping voltammetry for cannabis detection, *Chem. Cent. J.* 9 (2015). <https://doi.org/10.1186/s13065-015-0117-0>.
- [193] A.L. Alvarado-Gámez, M.A. Alonso-Lomillo, O. Domínguez-Renedo, M.J. Arcos-Martínez, A chronoamperometric screen printed carbon biosensor based on alkaline phosphatase inhibition for W(IV) determination in water, using 2-phospho-L-ascorbic acid trisodium salt as a substrate, *Sensors (Switzerland)*. 15 (2015) 2232–2243. <https://doi.org/10.3390/s150202232>.
- [194] S. Cîntă Pînzaru, I. Pavel, N. Leopold, W. Kiefer, Identification and characterization of pharmaceuticals using Raman and surface-enhanced Raman scattering, *J. Raman Spectrosc.* 35 (2004) 338–346. <https://doi.org/10.1002/jrs.1153>.
- [195] J. Omar, B. Slowikowski, C. Guillou, F. Reniero, M. Holland, A. Boix, Identification of new psychoactive substances (NPS) by Raman spectroscopy, *J. Raman Spectrosc.* 50 (2019) 41–51. <https://doi.org/10.1002/jrs.5496>.
- [196] B. Fortuni, Y. Fujita, M. Ricci, T. Inose, R. Aubert, G. Lu, J.A. Hutchison, J. Hofkens, L. Latterini, H. Uji-I, A novel method for in situ synthesis of SERS-active gold nanostars on polydimethylsiloxane film, *Chem. Commun.* 53 (2017) 5121–5124. <https://doi.org/10.1039/c7cc01776f>.
- [197] A.Y.F. Mahmoud, C.J. Rusin, M.T. McDermott, Gold nanostars as a colloidal substrate for in-solution SERS measurements using a handheld Raman spectrometer, *Analyst.* 145 (2020) 1396–1407. <https://doi.org/10.1039/c9an02439e>.
- [198] F. Tian, F. Bonnier, A. Casey, A.E. Shanahan, H.J. Byrne, Surface enhanced Raman scattering with gold nanoparticles: Effect of particle shape, *Anal. Methods.* 6 (2014) 9116–9123. <https://doi.org/10.1039/c4ay02112f>.
- [199] K.H. Chen, M.J. Pan, Z. Jargalsaikhan, T.O. Ishdorj, F.G. Tseng, Development of Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS)-Based Surface-Corrugated Nanopillars for Biomolecular Detection of Colorectal Cancer, *Biosensors.* 10 (2020). <https://doi.org/10.3390/bios10110163>.
- [200] G. Herrera, A. Padilla, S. Hernandez-Rivera, Surface Enhanced Raman Scattering (SERS) Studies of Gold and Silver Nanoparticles Prepared by Laser Ablation, *Nanomaterials.* 3 (2013) 158–172. <https://doi.org/10.3390/nano3010158>.
- [201] H. Stevenson, A. Bacon, K.M. Joseph, W.R.W. Gwandaru, A. Bhide, D. Sankhala,

- V.N. Dhamu, S. Prasad, A Rapid Response Electrochemical Biosensor for Detecting Thc In Saliva, *Sci. Rep.* 9 (2019) 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49185-y>.
- [202] S. Han, S. Hong, X. Li, Effects of cations and anions as aggregating agents on SERS detection of cotinine (COT) and trans-3'-hydroxycotinine (3HC), *J. Colloid Interface Sci.* 410 (2013) 74–80. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2013.07.066>.
- [203] K. Sivashanmugan, K. Squire, A. Tan, Y. Zhao, J.A. Kraai, G.L. Rorrer, A.X. Wang, Trace Detection of Tetrahydrocannabinol in Body Fluid via Surface-Enhanced Raman Scattering and Principal Component Analysis, *ACS Sensors.* 4 (2019) 1109–1117. <https://doi.org/10.1021/acssensors.9b00476>.
- [204] R. Urcuyo, E. Cortés, A.A. Rubert, G. Benitez, M.L. Montero, N.G. Tognalli, A. Fainstein, M.E. Vela, R.C. Salvarezza, Aromatic and aliphatic thiol self-assembled monolayers on Au: Anchoring and delivering copper species, *J. Phys. Chem. C.* 115 (2011) 24707–24717. <https://doi.org/10.1021/jp207875g>.
- [205] D. Martín-Yerga, A. Pérez-Junquera, M.B. González-García, J. V. Perales-Rondon, A. Heras, A. Colina, D. Hernández-Santos, P. Fanjul-Bolado, Quantitative Raman spectroelectrochemistry using silver screen-printed electrodes, *Electrochim. Acta.* 264 (2018) 183–190. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2018.01.060>.
- [206] L. Zhao, J. Blackburn, C.L. Brosseau, Quantitative detection of uric acid by electrochemical-surface enhanced raman spectroscopy using a multilayered Au/Ag substrate, *Anal. Chem.* 87 (2015) 441–447. <https://doi.org/10.1021/ac503967s>.
- [207] D. Ibáñez, A. Pérez-Junquera, M.B. González-García, D. Hernández-Santos, P. Fanjul-Bolado, Spectroelectrochemical elucidation of B vitamins present in multivitamin complexes by EC-SERS, *Talanta.* 206 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120190>.
- [208] D.Y. Wu, J.F. Li, B. Ren, Z.Q. Tian, Electrochemical surface-enhanced Raman spectroscopy of nanostructures, *Chem. Soc. Rev.* 37 (2008) 1025–1041. <https://doi.org/10.1039/b707872m>.
- [209] W. Wu, L. Liu, Z. Dai, J. Liu, S. Yang, L. Zhou, X. Xiao, C. Jiang, V.A.L. Roy, Low-Cost, Disposable, Flexible and Highly Reproducible Screen Printed SERS Substrates for the Detection of Various Chemicals, *Sci. Rep.* 5 (2015) 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep10208>.
- [210] M. Dendisová, Z. Němečková, M. Člupek, V. Prokopec, EC-SERS study of phenolic acids sorption behavior on Au, Ag and Cu substrates – Effect of applied potential and metal used, *Appl. Surf. Sci.* 470 (2019) 716–723. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2018.11.120>.
- [211] D. Li, D.W. Li, J.S. Fossey, Y.T. Long, Portable surface-enhanced raman scattering sensor for rapid detection of aniline and phenol derivatives by on-site electrostatic preconcentration, *Anal. Chem.* 82 (2010) 9299–9305.

- <https://doi.org/10.1021/ac101812x>.
- [212] A.M. Robinson, S.G. Harroun, J. Bergman, C.L. Brosseau, Portable electrochemical surface-enhanced raman spectroscopy system for routine spectroelectrochemical analysis, *Anal. Chem.* 84 (2012) 1760–1764. <https://doi.org/10.1021/ac2030078>.
- [213] S.D. Bindesri, R. Jebailey, N. Albarghouthi, C.C. Pye, C.L. Brosseau, Spectroelectrochemical and computational studies of tetrahydrocannabinol (THC) and carboxy-tetrahydrocannabinol (THC-COOH), *Analyst.* 145 (2020) 1849–1857. <https://doi.org/10.1039/c9an02173f>.
- [214] D. Martín-Yerga, A. Pérez-Junquera, D. Hernández-Santos, P. Fanjul-Bolado, In situ Activation of Thick-film Disposable Copper Electrodes for Sensitive Detection of Malachite Green Using Electrochemical Surface-enhanced Raman Scattering (EC-SERS), *Electroanalysis.* 30 (2018) 1095–1099. <https://doi.org/10.1002/elan.201800023>.
- [215] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA), 2001 Annual report on the state of the drugs problem in the European Union, (2001) 1–6. https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/201/sel2001_3_en_69551.pdf.
- [216] A. Manirakiza, L. Irakoze, S. Manirakiza, P. Bizimana, Efficacy and Safety of Fentanyl Compared With Morphine among Adult Patients with Cancer: A Meta-Analysis, *East African Heal. Res. J.* 4 (2020) 8–16. <https://doi.org/10.24248/eahrj.v4i1.617>.
- [217] R.F. Wolff, D. Aune, C. Truyers, A. V. Hernandez, K. Misso, R. Riemsma, J. Kleijnen, Systematic review of efficacy and safety of buprenorphine versus fentanyl or morphine in patients with chronic moderate to severe pain, *Curr. Med. Res. Opin.* 28 (2012) 833–845. <https://doi.org/10.1185/03007995.2012.678938>.
- [218] National Institute on Drug Abuse, Fentanyl DrugFacts, (2021) 1–7. <https://nida.nih.gov/publications/drugfacts/fentanyl>.
- [219] United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC), Global Smart Update: Fentanyl and its analogues - 50 years on, (2017) 3–12. https://www.unodc.org/documents/scientific/Global_SMART_Update_17_web.pdf.
- [220] United Nations office on Drugs and Crime (UNODC), Global Smart Update: Understanding the global opioid crisis, 21 (2019). https://www.unodc.org/documents/scientific/Global_SMART_21_web_new.pdf.
- [221] The US Centers for Disease Control and Prevention (CDC), (2022). <https://www.cdc.gov/nchs/nvss/vsrr/drug-overdose-data.htm> (accessed May 3, 2022).
- [222] DEA, United States Drug Enforcement Administration, (2023).

- <https://www.dea.gov/resources/facts-about-fentanyl> (accessed May 10, 2023).
- [223] S. Strano-Rossi, I. Álvarez, M.J. Taberner, P. Cabarcos, P. Fernández, A.M. Bermejo, Determination of fentanyl, metabolite and analogs in urine by GC/MS, *J. Appl. Toxicol.* 31 (2011) 649–654. <https://doi.org/10.1002/jat.1613>.
- [224] A. Mochizuki, H. Nakazawa, N. Adachi, K. Takekawa, H. Shojo, Identification and quantification of mepirapim and acetyl fentanyl in authentic human whole blood and urine samples by GC–MS/MS and LC–MS/MS, *Forensic Toxicol.* 36 (2018) 81–87. <https://doi.org/10.1007/s11419-017-0384-7>.
- [225] O.T. Cummings, J.R. Enders, G.L. McIntire, R. Backer, A. Poklis, Fentanyl-norfentanyl concentrations during transdermal patch application: LC-MS-MS urine analysis, *J. Anal. Toxicol.* 40 (2016) 595–600. <https://doi.org/10.1093/jat/bkw067>.
- [226] J.J. Palamar, A. Salomone, M.J. Barratt, Drug checking to detect fentanyl and new psychoactive substances, *Curr. Opin. Psychiatry.* 33 (2020) 301–305. <https://doi.org/10.1097/YCO.0000000000000607>.
- [227] F. Vincenti, C. Montesano, S. Gobbi, M. Sergi, R. Curini, D. Compagnone, Quantitative analysis of fentanyl, several analogues and metabolites in urine by parallel artificial liquid membrane extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis, *J. Chromatogr. Open.* 1 (2021) 100006. <https://doi.org/10.1016/j.jcoa.2021.100006>.
- [228] M.K. Choinśka, I. Šestáková, V. Hrdlička, J. Skopalová, J. Langmaier, V. Maier, T. Navrátil, Electroanalysis of Fentanyl and Its New Analogs: A Review, *Biosensors.* 12 (2022). <https://doi.org/10.3390/bios12010026>.
- [229] M.W. Glasscott, K.J. Vannoy, P.U.A. Iresh Fernando, G.K. Kosgei, L.C. Moores, J.E. Dick, Electrochemical sensors for the detection of fentanyl and its analogs: Foundations and recent advances, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 132 (2020) 116037. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116037>.
- [230] R.K. Mishra, K.Y. Goud, Z. Li, C. Moonla, M.A. Mohamed, F. Tehrani, H. Teymourian, J. Wang, Continuous Opioid Monitoring along with Nerve Agents on a Wearable Microneedle Sensor Array, *J. Am. Chem. Soc.* 142 (2020) 5991–5995. <https://doi.org/10.1021/jacs.0c01883>.
- [231] L. Asturias-Arribas, M.A. Alonso-Lomillo, O. Domínguez-Renedo, M.J. Arcos-Martínez, CYP450 biosensors based on screen-printed carbon electrodes for the determination of cocaine, *Anal. Chim. Acta.* 685 (2011) 15–20. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.11.006>.
- [232] L. Asturias-Arribas, M.A. Alonso-Lomillo, O. Domínguez-Renedo, M.J. Arcos-Martínez, Electrochemical determination of cocaine using screen-printed cytochrome P450 2B4 based biosensors, *Talanta.* 105 (2013) 131–134. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.11.078>.
- [233] S.R. Ahmed, R. Chand, S. Kumar, N. Mittal, S. Srinivasan, A.R. Rajabzadeh,

- Recent biosensing advances in the rapid detection of illicit drugs, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 131 (2020) 116006. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116006>.
- [234] C. Garrido, L. Galluzzi, M. Brunet, P.E. Puig, C. Didelot, G. Kroemer, Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria, *Cell Death Differ.* 13 (2006) 1423–1433. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401950>.
- [235] R. Jain, S. Kumar, R. Chhabra, M.C. Agarwal, R. Kumar, Analysis of the pH-dependent stability and millisecond folding kinetics of horse cytochrome c, *Arch. Biochem. Biophys.* 585 (2015) 52–63. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.09.011>.
- [236] D.H. Murgida, P. Hildebrandt, Proton-coupled electron transfer of cytochrome c, *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001) 4062–4068. <https://doi.org/10.1021/ja004165j>.
- [237] Z.S. Aghamiri, M. Mohsennia, H.A. Rafiee-Pour, Immobilization of cytochrome c and its application as electrochemical biosensors, *Talanta.* 176 (2018) 195–207. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.08.039>.
- [238] M. Eguílaz, C.J. Venegas, A. Gutiérrez, G.A. Rivas, S. Bollo, Carbon nanotubes non-covalently functionalized with cytochrome c: A new bioanalytical platform for building bienzymatic biosensors, *Microchem. J.* 128 (2016) 161–165. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2016.04.018>.
- [239] J.W. Shie, Y. Umasankar, S.M. Chen, Electroanalytical properties of cytochrome c by direct electrochemistry on multi-walled carbon nanotubes incorporated with DNA biocomposite film, *Talanta.* 74 (2008) 1659–1669. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2007.10.034>.
- [240] S. Viswanathan, C. Rani, A. Vijay Anand, J. an A. Ho, Disposable electrochemical immunosensor for carcinoembryonic antigen using ferrocene liposomes and MWCNT screen-printed electrode, *Biosens. Bioelectron.* 24 (2009) 1984–1989. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2008.10.006>.
- [241] M. Imai, T. Saio, H. Kumeta, T. Uchida, F. Inagaki, K. Ishimori, Investigation of the redox-dependent modulation of structure and dynamics in human cytochrome c, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 469 (2016) 978–984. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.12.079>.