
ESTUDIOS DE METABOLISMO Y TOXICIDAD DE DERIVADOS DEL METILFENIDATO EN LARVAS DE PEZ CEBRA

Trabajo Fin de Máster

Máster en Genética, Física y Química Forense



UNIVERSITAT
ROVIRA I VIRGILI

Laura Lanuza Pérez

Tutor profesional: Sergio Armenta Estrela

Tutor URV: Ricard Boqué Martí

Centro: Universitat de València

Junio 2021

RESUMEN

Las Nuevas Sustancias Psicoactivas (NPS) son un tema emergente en cuanto al abuso de sustancias. Constantemente aparecen nuevas variedades en el mercado, de las cuales se desconocen las propiedades tóxicas y el metabolismo. Por ello, en el presente trabajo se realizan estudios de dichas propiedades en larvas de pez cebra, modelo utilizado por varios autores, por su similitud con el genoma humano para el que se han obtenido resultados prometedores.

Se analizan el 4-fluorometilfenidato (4F-MPH) y el 4-metilmetilfenidato (4M-MPH), dos derivados del metilfenidato (MPH), un conocido fármaco para tratar el trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH) y que han aparecido recientemente en el mercado de las NPS. Para estudiar la toxicología se inocularon distintas concentraciones de los analitos al medio y se observó el desarrollo de las larvas, mientras que para el estudio del metabolismo se hicieron distintos experimentos con y sin etanol analizándose mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (LC-HRMS).

ABSTRACT

New psychoactive substances (NPS) are an emerging topic amongst abused compounds. New molecules appear constantly on the market, without any knowledge about their toxicology and metabolism. Therefore, in this project, the study of these properties were carried out in zebrafish larvae, a model used by several authors in the literature because of their similarity with the human genome with promising results.

4-fluormethylphenidate (4F-MPH) and 4-methylmethylphenidate (4M-MPH), two derived substances from methylphenidate (MPH), a well-known drug to treat attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD), that have recently appeared on the NPS market, were analysed. In one hand, to study the toxicology, different concentrations of the analytes were supplied in order to evaluate the development of larvae and, in the other hand, to study the metabolism of the drugs, different experiments with and without ethanol were carried out, analysing the results with the liquid chromatography with high resolution mass spectrometry detector (LC-HRMS).

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	4
1.1 NPS: Nuevas Sustancias Psicoactivas	4
1.2 Catalogación.....	7
1.3 Propiedades del 4F-MPH, 4M-MPH y su precursor el MPH	8
1.4 Larvas de pez cebra.....	10
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	11
3. METODOLOGÍA.....	12
3.1 Reactivos y materiales	12
3.2 Crecimiento de los embriones	13
3.3 Estudio toxicidad.....	14
3.4 Estudio metabolismo	15
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	17
4.1 Estudio toxicidad.....	17
4.2 Estudio metabolismo	21
5. CONCLUSIONES	27
6. BIBLIOGRAFÍA.....	28

1. INTRODUCCIÓN

Dentro del marco de las ciencias forenses, un apartado muy importante en cuanto a la rama de la química es el análisis de drogas. Éstas se pueden caracterizar con distintos métodos, cromatografía de gases, cromatografía de líquidos, rayos X, etc.

El presente trabajo se centra en un tipo de drogas llamadas Nuevas Sustancias Psicoactivas (NPS), de carácter ilegal, analizadas mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas.

1.1 NPS: Nuevas Sustancias Psicoactivas

Las Nuevas Sustancias Psicoactivas son definidas por las Naciones Unidas, como toda aquella sustancia, pura o preparado, empleada con fines recreativos, no incluida en la Convención única sobre Estupefacientes de 1961 ni en la Convención sobre Sustancias Psicoactivas de 1971¹.

Estas drogas emergentes comparten características comunes que describen el grave problema de salud pública que generan:

- No son ilegales. Para que una droga sea ilegal debe contemplarse dentro del Convenio generado por las Naciones Unidas. Por esta ilegalidad que las caracteriza son sustancias de libre circulación, más baratas que las ilegales, lo que las hace más llamativas para los grupos de población más vulnerables.
- Se pueden sintetizar fácilmente.
- No son seguras en su consumo. La mayoría de estas sustancias son sintetizadas en laboratorios clandestinos, que no siguen ningún control de calidad, ni en sus instalaciones ni en sus productos, por lo tanto, las drogas son puestas en el mercado sin haber sido testadas respecto a sus efectos en humanos.
- Se difunden a través de las nuevas tecnologías y se pueden adquirir de manera rápida y sencilla.

No hay que confundir el término 'Nueva Sustancia Psicoactiva' con 'Droga de Nueva Síntesis', puesto que las NPS no tienen por qué haber sido sintetizadas por primera vez recientemente, sino que su uso indebido, difusión o divulgación sea actual.

La **Figura 1** muestra la cantidad de nuevas sustancias reportadas por cada país según la Oficina de Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (UNODC):

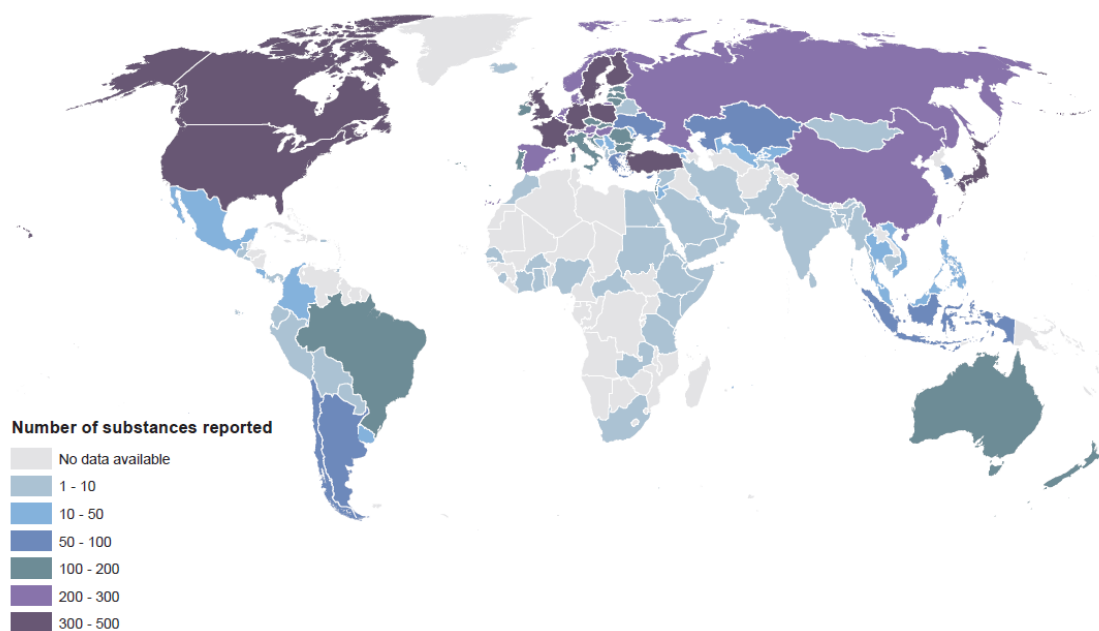


Figura 1. NPS reportadas por cada país. Fuente: United Nations Office on Drugs and Crime, Early Warning Advisory (EWA) on NPS, 2020³.

La velocidad con la que estas sustancias aparecen en el mercado y se difunden a través de la red hace imposible aplicar legislaciones punitivas para cada una de ellas. La lentitud en la tramitación de su incorporación a las listas de estupefacientes ilegales y la opacidad de internet hace que el sistema de control se vea saturado. Por ello, ha sido necesario crear un sistema de alerta temprana que notificara a los Estados Miembros sobre las sustancias emergentes².

Sistema de Alerta Temprana de la Unión Europea (Early Warning System, EWS)

El Sistema de Alerta Temprana de la Unión Europea (EWS, Early Warning System)² fue creado en 1997 por el Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías (EMCDDA, European Monitoring Center for Drugs and Drugs Addictions) y la Oficina Europea de Policía (Europol) en colaboración con los Estados Miembros de la Unión Europea (UE), en el marco de la Acción Conjunta de 16 de junio de 1997 relativa al intercambio de información, la evaluación de riesgos y el control de las nuevas drogas de síntesis.

Dicho sistema consiste en un intercambio de información entre los distintos Estados Miembros al detectar la aparición de alguna NPS, así como una evaluación de los riesgos que estas conllevan.

Existen 3 fases de respuesta una vez detectada una nueva sustancia:

- *Fase 1: Intercambio de información* → Cuando una nueva sustancia es detectada por alguno de los Estados Miembros estos se lo notifican a la Europol y al EMCDDA junto con la información disponible en relación a su fabricación, tráfico y uso. Estos recopilan la información, la valoran y la intercambian con el resto de miembros, la Comisión Europea y la Agencia Europea del Medicamento (EMA).
- *Fase 2: Informe conjunto e informe de evaluación del riesgo* → Si la Europol y la EMCDDA consideran que la sustancia merece ser analizada en profundidad se elabora un informe conjunto en el que constará una descripción físico-química de la sustancia, la frecuencia, circunstancias y/o cantidad en la que se encuentra, métodos de fabricación y la implicación del crimen organizado en su síntesis y distribución, riesgos de salud, precursores químicos, si existen ya medidas de control de los distintos Estados Miembros y si la nueva sustancia ha sido ya evaluada por la UE. Por su parte, la EMA informa si la nueva sustancia ha obtenido autorización de comercio, si está pendiente de recibirla o si su autorización ha sido suspendida.

Para el informe de evaluación del riesgo, el EMCDDA convoca reuniones con su Comité Científico, que evalúan los riesgos en base a los aspectos que se tienen en cuenta en la Convención Única de 1961 sobre Estupefacientes o el Convenio sobre Sustancias Psicotrópicas de 1971 para garantizar el control de la sustancia a nivel internacional.

- *Fase 3: Toma de decisión* → Una vez realizado el informe de evaluación de riesgo, el Consejo de la Unión Europea puede decidir si someter o no a la nueva sustancia a medidas de control en toda la UE. En caso afirmativo, los Estados Miembros deberán realizar las acciones necesarias de acuerdo con las leyes nacionales para que, en no más de un año, la sustancia sea sometida a medidas de control.

1.2 Catalogación

Las NPS pueden clasificarse según el efecto general que producen⁴:

- *Estimulantes*: estimulan el sistema nervioso central (SNC), interfieren el sueño y son alucinógenos en altas dosis.
- *Cannabinoides sintéticos*: actúan sobre los receptores de las células del cerebro.
- *Alucinógenos*: alteran la percepción del tiempo y la realidad. Afectan al movimiento, pensamiento, percepciones, visión y oído.
- *Opioides*: estimulantes que interactúan con los receptores opioides del SNC.
- *Hipnóticos*: depresores del SNC.
- *Disociativos*: actúan alterando la distribución del neurotransmisor glutamato a través del cerebro. El glutamato está involucrado en la percepción del dolor, las respuestas al ambiente, y la memoria.

La **Figura 2** corresponde a las NPS reportadas por la organización UNODC a nivel global. En ella se puede observar cómo las drogas más consumidas son las que tienen un efecto estimulante y los cannabinoides sintéticos.

Synthetic new psychoactive substances by effect group, up to December 2020:

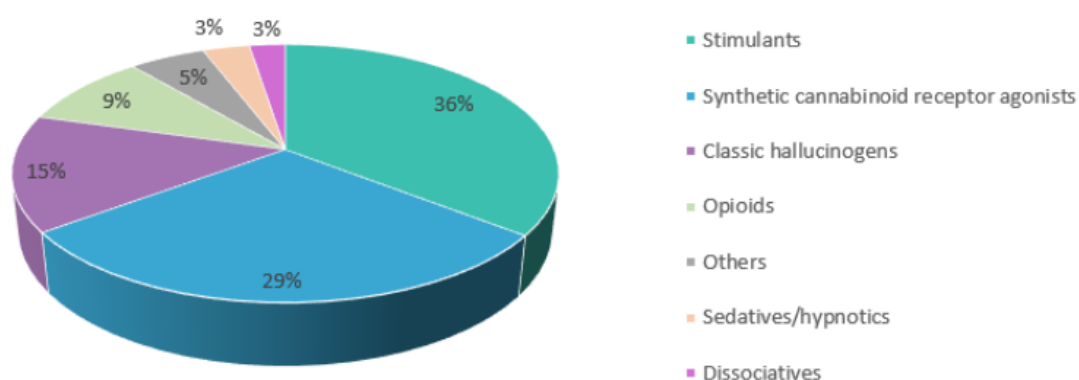


Figura 2. NPS según sus efectos. Fuente: United Nations Office on Drugs and Crime, Early Warning Advisory (EWA) on NPS, 2020³.

En este trabajo nos centraremos en el análisis del 4F-MPH y 4M-MPH, dos derivados del MPH, sustancia de carácter estimulante.

1.3 Propiedades del 4F-MPH, 4M-MPH y su precursor MPH.

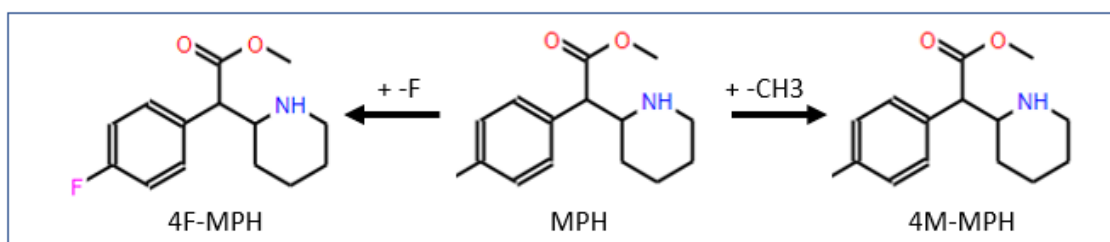


Figura 3. Estructuras de los compuestos a analizar: 4F-MPH, 4M-MPH y su precursor MPH.

Metilfenidato

El MPH (methyl 2-phenyl-2-piperidin-2-ylacetate) es un medicamento estimulante del SNC utilizado para tratar el TDAH a través de un mecanismo de actuación sobre los transportadores de noradrenalina y dopamina, inhibiendo su recaptación y extracción desde el espacio sináptico, aumentando así sus niveles en el SNC, el cual provoca la inhibición de la impulsividad y una mejora de la concentración^{5,6}. También se ha utilizado para tratar otros trastornos como la depresión, el cáncer, la narcolepsia, trastornos cognitivos y en enfermos del virus de la inmunodeficiencia humana entre otros⁷.

Se encuentra incluido en la Lista II de clasificación de drogas según la UNODC. En ella se incluyen las drogas que presentan un riesgo de uso indebido y que constituyen una amenaza grave para la salud pública debido a su alto potencial de abuso⁸, ya que en grandes cantidades tiene efectos similares a los de la cocaína, como por ejemplo euforia, agitación, aumento de la sociabilidad o supresión del apetito⁵. Esta similitud se debe a que ambas drogas actúan sobre la misma región del cerebro, el cuerpo estriado, a esta conclusión se llegó a través de estudios marcando ambos analitos con ^{14}C ⁹.

En presencia de etanol forma un metabolito llamado etilfenidato (EPH), ethyl 2-phenyl-2-(piperidin-2-yl)acetate^{10,11}, sustancia no controlada por las autoridades y de uso únicamente recreativo. Posee un mecanismo de acción similar al del MPH, sin embargo, tiene una mayor selectividad dopaminérgica, con una afinidad 16 veces mayor por las proteínas transportadoras de dopamina que por las de norepinefrina, lo que parece indicar que genera un mayor efecto de euforia, así como una menor ansiedad y menores efectos simpaticomiméticos¹². Esta NPS se ha visto involucrada, en conjunto con otras

sustancias, en numerosas muertes por intoxicación¹³, sin embargo, destaca un caso en el que la muerte fue atribuible únicamente a la presencia de este compuesto, en una muestra de sangre femoral, detectado por LC-HRMS¹⁴. Puesto que el consumo de drogas está estrechamente relacionado con el de alcohol dedicaremos parte de este estudio a la detección de este metabolito y su toxicidad.

4-Fluorometilfenidato

El 4F-MPH (methyl 2-(4-fluorophenyl)-2-(piperidin-2-yl)acetate) es un derivado halogenado del MPH que mantiene la estructura básica del mismo. Presenta dos diastereoisómeros, treo-4F-MPH y eritreo-4F-MPH, de los cuales solo el primero es activo farmacológicamente⁹, el cual genera un potencial mayor en la inhibición de dopamina y noradrenalina que su precursor aumentando el efecto estimulante. Dicho estudio sobre los diastereoisómeros fue llevado a cabo en sinaptosomas de cerebro de rata, lo cual sugiere que tendrá el mismo efecto en seres humanos debido a su similitud genómica¹⁶. Los diastereoisómeros, treo y eritreo, pueden separarse mediante su transformación en sales de HCl y caracterizarse mediante espectroscopía de Rayos X¹⁶.

Las sustituciones en la posición 4 tienden a presentar una potencia de unión sobre los receptores tres veces mayor que el MPH^{17,18}. En concreto, la adición de un grupo flúor en la posición 4 del anillo aromático hace que aumente la lipofilicidad de la molécula mejorando su potencia como agente del SNC¹⁹. Además de esto, numerosos estudios afirman que la adición del flúor favorece el aumento de los efectos estimulantes y alucinógenos²⁰.

En 2018 se realizó el primer estudio post-mortem del 4F-MPH utilizando LC-HRMS para su detección en muestras de orina y jugo gástrico.

4-Metilmetilfenidato

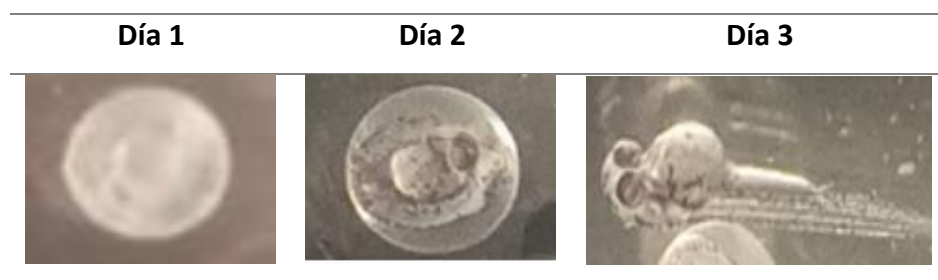
El 4M-MPH (methyl 2-(4-methylphenyl)-2-piperidin-2-ylacetate) proviene de la inclusión de un grupo metilo sobre la posición 4 del anillo aromático del MPH. Como se ha citado anteriormente, la sustitución sobre esta posición tiende a aumentar la potencia sobre el SNC, en particular, la adición de un receptor de electrones, como es el grupo metilo, también tiende a aumentar la lipofilidad, al igual que el flúor, favoreciendo la difusión hacia el SNC²². Los efectos que se esperan encontrar tras la ingesta de esta droga serían estados de euforia, disminución de la necesidad de dormir, aumento de la sexualidad, disminución del apetito, sudoración, patrones de sueño alterados, alucinaciones y agresividad²³.

Las estructuras de cada compuesto aparecen reflejadas en la **Figura 3**.

1.4 Larvas de pez cebra

A menudo, los estudios in vitro con células hepáticas humanas presentan ciertas desventajas, como la necesidad de un equipo especial para su cultivo, lo que ha llevado a la comunidad científica a buscar alternativas para el estudio del metabolismo de las NPS. Por ello, desde hace un tiempo se está popularizando el uso del pez cebra (*Danio rerio*) para este tipo de estudios metabólicos, ya que éste presenta una gran semejanza con el genoma humano, por ejemplo, varias enzimas del citocromo P450 (CYP) en el pez cebra presentan ortólogos directos en los humanos, lo que indica un metabolismo similar al de los mamíferos²⁴, por ello ya ha sido empleado en numerosos ensayos para el estudio de la formación de metabolitos de distintas NPS como por ejemplo, cannabinoides sintéticos²⁵, meta-clorofenilpiperazina(mCPP)²⁶ o efilona²⁴ entre otras, utilizando LC-HRMS como método analítico para su detección, dando resultados muy satisfactorios. Estos análisis pueden llevarse a cabo durante su etapa de larva, lo cual es un aspecto positivo, ya que no son considerados animales hasta 5 días después de la fertilización (dpf) según la Directiva Europea 2010/63 UE²⁵, con lo que se podría experimentar con ellos respetando los criterios éticos, puesto que como vemos en la **Figura 4**, el tercer día desde la fecundación la larva ya puede estar formada^{27,28}.

Figura 4. Fases de crecimiento de la larva de pez cebra



2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Los objetivos del presente trabajo se basan en el estudio de la toxicología y metabolismo de dos analitos catalogados como NPS, el 4F-MPH y el 4M-MPH, cuyo precursor es un conocido fármaco utilizado para tratar el TDAH.

- Estudio de la toxicidad del 4F-MPH, 4M-MPH y 4M-EPH a distintas concentraciones.
- Estudio del metabolismo de 4F-MPH y 4M-MPH.
- Estudio del metabolismo de 4F-MPH y 4M-MPH en presencia de etanol (EtOH) a distintas concentraciones.

3. METODOLOGÍA

3.1 Reactivos y materiales

Analitos

Los reactivos 4F-MPH, 4M-MPH y 4M-EPH fueron obtenidos del laboratorio la *Unidad de Inspección de Farmacia y Control de Drogas (Valencia, España)*, para los que se realizaron disoluciones patrón de cada analito a 5000 mg L⁻¹ en agua.

Huevos de pez cebra

Aproximadamente 100 huevos provenientes de *Aprende con Danio (Alicante, España)* fueron recibidos en dos tubos, sumergidos en azul de metilo a unos 28°C, temperatura óptima para una mayor tasa de supervivencia.

Medio Danieau

Los experimentos se realizaron en presencia del medio Danieau, cuya composición se presenta en la **Tabla 1**, el cual no interfiere con los analitos ni en el desarrollo de las larvas.

Tabla 1. Composición medio Danieau

Compuesto	Concentración (mM)	Peso molecular Mr (g/mol)	Cantidad en 1L (mg)
NaCl	17	58,44	993
KCl	2	74,55	149
MgSO ₄	0,12	120,37	14,44
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	1,8	236,15	425
HEPES (tampón Na)	1,5	260,28	195
HEPES (tampón ácido)	1,5	238,3	178

Microscopio

Para monitorear el desarrollo de las larvas se hizo uso de un microscopio LEICA M205 FA stereo de *Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH (Wetzlar, Alemania)*.

Condiciones LC-HRMS/MS para la identificación de metabolitos

El sistema AB SCIEX (Redwood City, CA, USA) TripleTOF™ 5600 LC/MS/MS fue utilizado para ambos extractos, el sobrenadante del medio Danieau y las larvas de pez cebra. La separación cromatográfica fue realizada usando una columna Acquity UPLC BEH C18 (50 x 2.1 mm, 1.7 µm) proveniente de *Waters Corporation (Milford, MA, USA)* con una fase móvil que consistía en 0,1% de ácido fórmico en agua(A) y 0,1% de ácido fórmico en acetonitrilo(B) con un flujo de 0,4 mL min⁻¹. El gradiente de elución consistía inicialmente en un 10% de B durante 5 minutos, seguido de un aumento del 10 al 95% a lo largo de 7 minutos y un mantenimiento de la elución isocrática durante 8 minutos al 95%. Los resultados de la espectrometría de masas de alta resolución se obtuvieron con una fuente de ionización por electrospray, utilizando nitrógeno como gas portador de iones a 45 psi, gas cortina a 30 psi a una temperatura de fuente de gas de 450°C y un voltaje de pulverización de iones de 5500V. La recopilación de datos del espectro de masas fue mediante un método de Adquisición Independiente de la Información (IDA) con un analizador de tiempo de vuelo (TOF) y un analizador de iones con una energía de colisión de 10V. Los resultados fueron evaluados utilizando el software PeakView™ de AB SCIEX.

3.2 Crecimiento de los embriones

Los 100 huevos fueron repartidos en dos placas Petri, retirando parte del azul de metilo y rellenando con agua Bezoya. Para una óptima conservación, los embriones fueron llevados a una cámara térmica que se encontraba a unos 25-26°C, renovando el agua de las placas Petri cada 24h durante un par de días, para ello se retiró un 40-50% del



Figura 5. Aspecto de los huevos 2dpf

volumen y se añadió agua nueva. Las **Figuras 5** muestra el aspecto de los huevos a 2dpf.

3.3 Estudio toxicidad

Se realizó un control y 8 experimentos con los analitos a distintas concentraciones, cada uno de ellos por duplicado. Las concentraciones a estudiar fueron 100, 1000 y 5000 μM para 4F-MPH; 100, 500 y 1000 μM para 4M-MPH y 100 y 1000 μM para 4M-EPH. Este último corresponde al metabolito formado tras la adición de etanol al medio del 4M-MPH.

Se trasvasó el volumen necesario para cada concentración de la dilución a 5000 mg L^{-1} de cada analito y se rellenó con medio Danieau hasta llegar a un volumen final de 3 mL. En la **Tabla 2** se muestra la composición de cada experimento.

Tabla 2. Composición de los experimentos de toxicidad.

Nombre del experimento	Composición
Control	10 larvas + 3 mL medio Danieau
4F-MPH, 100 μM	10 larvas + 15 μL disolución patrón 4F-MPH 5000 mg L^{-1} + 3mL medio Danieau
4F-MPH, 1000 μM	10 larvas + 150 μL disolución patrón 4F-MPH 5000 mg L^{-1} + 2,85 mL medio Danieau
4F-MPH, 5000 μM	10 larvas + 3 mL de la disolución de 7,6 mg disueltos en 6 mL de medio Danieau
4M-MPH, 100 μM	10 larvas + 15 μL disolución patrón 4M-MPH 5000 mg L^{-1} + 3 mL medio Danieau
4M-MPH, 500 μM	10 larvas + 75 μL disolución patrón 4M-MPH 5000 mg L^{-1} + 2,9 mL medio Danieau
4F-MPH, 1000 μM	10 larvas + 150 μL disolución patrón 4M-MPH 5000 mg L^{-1} 2,85 mL medio Danieau
4M-EPH, 100 μM	10 larvas + 15 μL disolución patrón 4M-EPH 5000 mg L^{-1} + 3 mL medio Danieau
4M-EPH, 1000 μM	10 larvas + 150 μL disolución patrón 4M-EPH 5000 mg L^{-1} + 2,85 mL medio Danieau

Los experimentos se colocaron en una placa de 12 pocillos y en viales de 10 mL y se dejaron reposar en una cámara a 25-26°C.

Para evaluar los efectos de los analitos en el desarrollo de las larvas se utilizó un microscopio anotando los cambios físicos a las 24h, 48h y 5 días.

3.4 Estudio metabolismo

Se realizaron 13 experimentos, incluyendo un control, en los que se estudiaron los metabolitos de los analitos 4F-MPH y 4M-MPH, en presencia y ausencia de EtOH al 0,5 y 1% v/v.

Los experimentos se realizaron en una placa con 12 pocillos (**Figura 6**) y un vial de 10mL. En cada pocillo se adicionaron 10 larvas + 3 mL medio Danieau + analito 100 μ M + etanol si el experimento lo requiere, como se muestra en la **Tabla 3**.

Para conseguir la concentración de 100 μ M de analito se adicionaron 15 μ L de la disolución patrón de 5000 mg L⁻¹ y para las concentraciones de etanol se adicionaron 15 μ L para la concentración al 0,5% y 30 μ L para la concentración al 1% v/v.

Los experimentos del estudio de la formación de metabolitos se realizaron por duplicado, menos los experimentos con etanol 0,5% y el control, de los cuales solo se realizó una réplica.

Tabla 3. Composición de los experimentos de metabolismo.

Nombre del experimento	Composición
Control	10 larvas + 3 mL medio Danieau
Larvas + EtOH 1%	10 larvas + 3 mL medio Danieau + 30 μ L EtOH
4F-MPH	10 larvas + 3 mL medio Danieau + 15 μ L 4F-MPH 5000 mg L ⁻¹
4F-MPH + EtOH 0,5%	10 larvas + 3 mL medio Danieau + 15 μ L 4F-MPH 5000 mg L ⁻¹ + 15 μ L EtOH
4F-MPH + EtOH 1%	10 larvas + 3 mL medio Danieau + 15 μ L 4F-MPH 5000 mg L ⁻¹ + 30 μ L EtOH
4M-MPH	10 larvas + 3 mL medio Danieau + 15 μ L 4M-MPH 5000 mg L ⁻¹
4M-MPH + EtOH 0,5%	10 larvas + 3 mL medio Danieau + 15 μ L 4M-MPH 5000 mg L ⁻¹ + 15 μ L EtOH
4M-MPH + EtOH 1%	10 larvas + 3 mL medio Danieau + 15 μ L 4M-MPH 5000 mg L ⁻¹ + 30 μ L EtOH

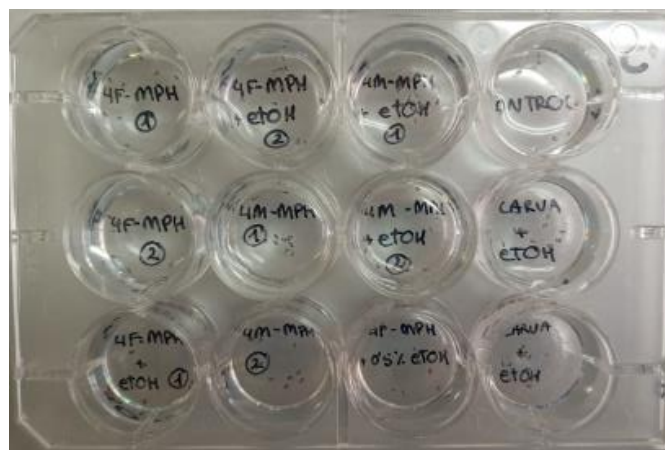


Figura 6. Placa de 12 pocillos con el experimental del estudio de los metabolitos de 4F-MPH y 4M-MPH.

Tratamiento de las muestras

Se dejó que las larvas absorbieran y metabolizaran las drogas durante 24 h en una cámara térmica a 25-26°C y una vez transcurrido este tiempo se analizaron mediante LC-HRMS.

Se estudiaron los metabolitos que se habían formado, tanto en las propias larvas como en el medio en el que se encuentran, ya que, una vez metabolizados, los metabolitos son excretados al exterior. Para separar las larvas del medio y analizar ambas partes se realizaron los siguientes procedimientos:

- Análisis del medio. Se pipeteó entre 1 y 1,5 mL del mismo, se inyectó en una jeringuilla con un filtro de 22 micras acoplado y se depositó en un vial.
- Análisis de las larvas. Se retiró el exceso de agua de la placa con una pipeta y se lavó con el medio Danieau, aproximadamente 2 mL, tres veces. A continuación, se recogieron las 10 larvas de cada experimento con una pipeta y se dejaron en la mínima cantidad de líquido (medio Danieau) posible en un vial.

Una vez separadas las larvas se llevaron al congelador y una vez congeladas se procedió a la liofilización de éstas. Los viales con las larvas se introdujeron en el liofilizador sin tapa y se dejaron durante 2h. Pasado este tiempo se adicionaron 100 µL de metanol a cada vial y se agitó con un vórtex.

Por último, se centrifugó el extracto a 10.000 rpm durante 4 minutos y se separó el sobrenadante trasvasándolo a un vial. Este vial llevaba incorporado un inserto para facilitar la inyección del automuestreador del LC-HRMS.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Estudio toxicidad

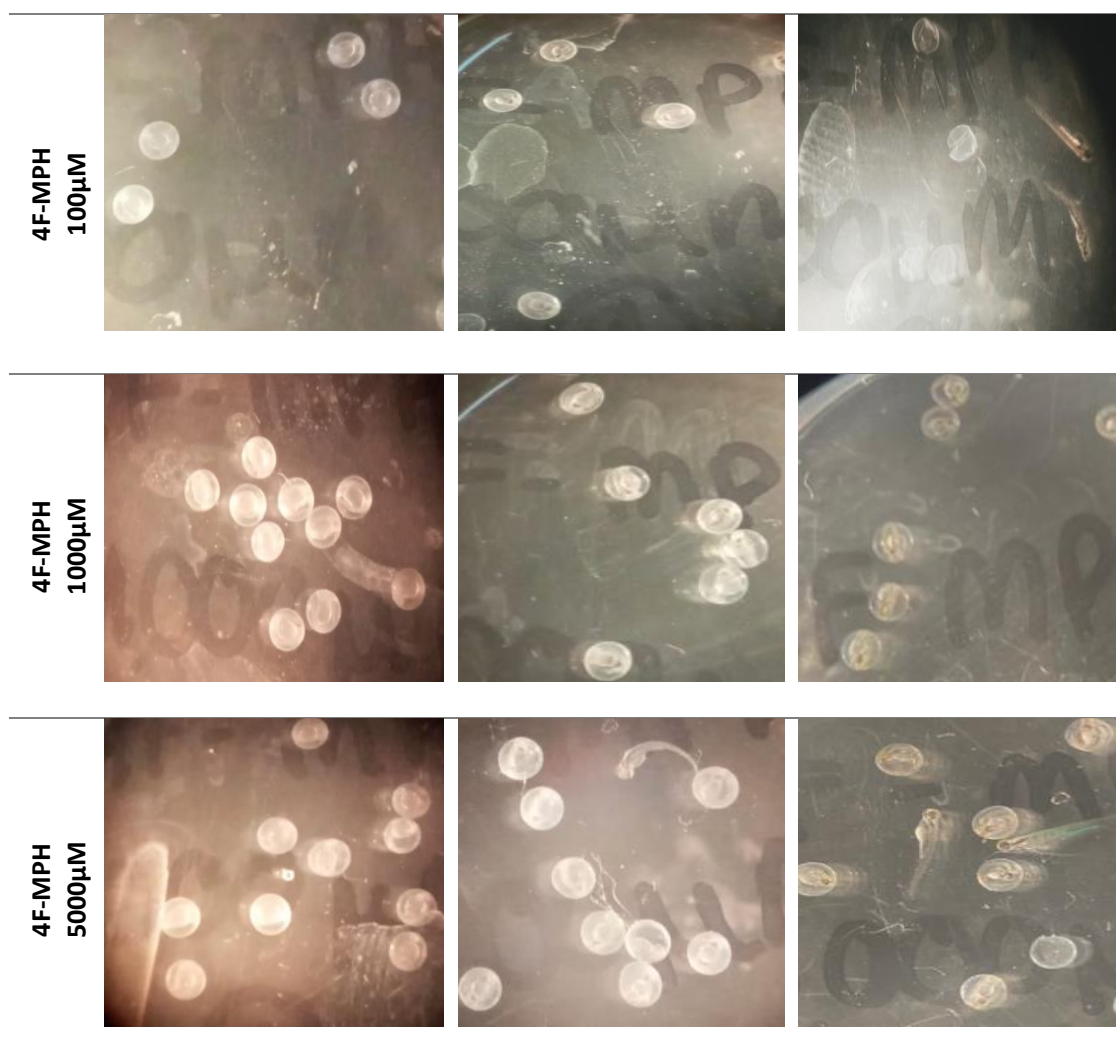
El desarrollo de larvas de pez cebra fue controlado pasadas 24h, 48h y 5 días desde la adición de los analitos 4F-MPH, 4M-MPH y 4M-EPH a distintas concentraciones entre 100 y 5000 µM, como se indica en la **Tabla 2**.

Se tomó como referencia un experimento control en el que se evaluó el desarrollo de las larvas sin la influencia del analito, cuya evolución aparece reflejada al inicio de las **Tablas 5-6-7**, en la que se puede apreciar el desarrollo progresivo de los huevos, hasta una total eclosión de los 10.

El analito 4F-MPH fue adicionado a 100, 1000 y 5000 µM. Para este primer experimento de menor concentración, los resultados fueron similares a los del control, con un desarrollo total de las larvas progresivo, hasta la completa eclosión de los 10 huevos. Lo contrario que ocurre al aumentar la concentración, donde observamos que a 1000 µM ninguna larva sale del huevo a lo largo del ensayo y a 5000 µM únicamente 2 de ellas lo logran, como puede apreciarse en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Desarrollo de las larvas de pez cebra con el analito 4FM-MPH a distintas concentraciones recién adicionado, 24 y 48h después.

	Recién adicionado	24h	48h
CONTROL			



El analito 4M-MPH fue adicionado a 100, 500 y 1000 μ M. Para este primer experimento de menor concentración, el desarrollo de las larvas fue similar al del control, con una eclosión progresiva hasta el total desarrollo de las 10 larvas. Sin embargo, para los experimentos de 500 y 1000 μ M el desarrollo fue más lento cuanto mayor era la concentración, observándose que pasadas 48h había 6 larvas desarrolladas para el experimento a 500 μ M y 3 larvas para el experimento con el analito a 1000 μ M, como aparece reflejado en la **Tabla 5**.

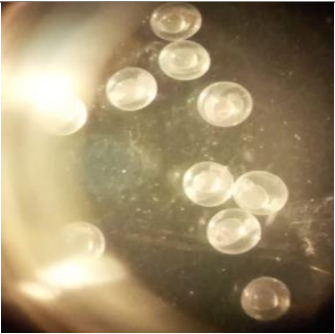
Tabla 5. Desarrollo de las larvas de pez cebra con el analito 4M-MPH a distintas concentraciones recién adicionado, 24 y 48h después.

	Recién adicionado	24h	48h
CONTROL			
4M-MPH 100µM			
4M-MPH 500µM			
4M-MPH 1000µM			

El analito 4M-EPH fue adicionado a 100 y 1000 µM. Para este primer experimento de menor concentración, el desarrollo de las larvas fue similar al del control, con la total eclosión de los huevos a lo largo del tiempo. Sin embargo, para el experimento a 1000

μM los huevos no llegaron a desarrollarse, estando menos formados que en el resto de experimentos, como se puede apreciar en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Desarrollo de las larvas de pez cebra con el analito 4M-EPH a distintas concentraciones recién inyectado, 24h y 48h después.

	Recién inyectado	24h	48h
CONTROL			
4M-EPH 100 μM			
4M-EPH 1000 μM			

El % de larvas desarrolladas después de 5 días de tratamiento se proyecta sobre la **Tabla 7**. Los huevos tratados con una concentración de 100 μM de analito presentan un desarrollo del 100% de las larvas para los tres experimentos. En el caso del 4F-MPH a 1000 μM no llegaron a eclosionar y a 5000 μM observamos que solo 2 larvas se desarrollaron por completo, aunque, sí que se puede observar una progresión morfológica en el resto de huevos en comparación con el primer día en ambos ensayos. En el experimento con 4M-MPH la tasa de desarrollo a 1000 μM es del 100% mientras

que a 500 μM es también del 100% pero con aparición de malformaciones en la espina dorsal de las larvas. Por último, los huevos tratados con 4M-EPH presentaban un desarrollo del 0% para el experimento a 1000 μM , sin apreciación de ningún cambio desde el día de la adición del analito.

Tabla 7. Ratio de larvas de pez cebra salidas del huevo después de 5 días de tratamiento con distintas concentraciones de 4F-MPH, 4M-MPH y 4M-EPH.

Concentración μM	% Desarrollo total de las larvas		
	4F-MPH	4M-MPH	4M-EPH
0	100	100	100
100	100	100	100
500	-	100**	-
1000	0*	100	0
5000	20*	-	-

(-) Experimento no realizado.

(*) Los huevos presentan un mayor desarrollo respecto al primer día.

(**) Malformaciones.

4.2 Estudio metabolismo

Los metabolitos se identificaron en función de su masa molecular, tomando de ejemplo las rutas metabólicas encontradas en la bibliografía para su precursor, el MPH²⁹. En total fueron encontrados 4 metabolitos del 4F-MPH y 3 del 4M-MPH. Los picos de los cromatogramas de HPLC de los metabolitos fueron comparados con el del analito original para estudiar la intensidad y el tiempo de retención.

Los metabolitos más abundantes encontrados para el 4F-MPH fueron el derivado fluorado del ácido ritalínico ($\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{FNO}_2$) formado tras la hidrólisis del éster del analito, el cual presenta una mayor intensidad, por lo tanto, es el mayoritario. El metabolito formado tras la doble hidroxilación del anillo aromático ($\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{FNO}_4$), el metabolito transesterificado ($\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{FNO}_2$) formado al adicionar etanol al medio y la lactama ($\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{FNO}_3$), originada tras la oxidación de este último metabolito en la posición 6 del anillo de piperidina. En la **Figura 7** podemos observar la ruta metabólica del 4F-MPH, en la que aparecen las estructuras de los metabolitos mencionados, junto con su fórmula molecular, intensidad (I), tiempo de retención (tR) y masa molecular (m/z) con el error

asociado a la diferencia entre la masa molecular esperada y la teórica, expresado en partes por millón (ppm), dentro del rango de ± 6 ppm (error ppm).

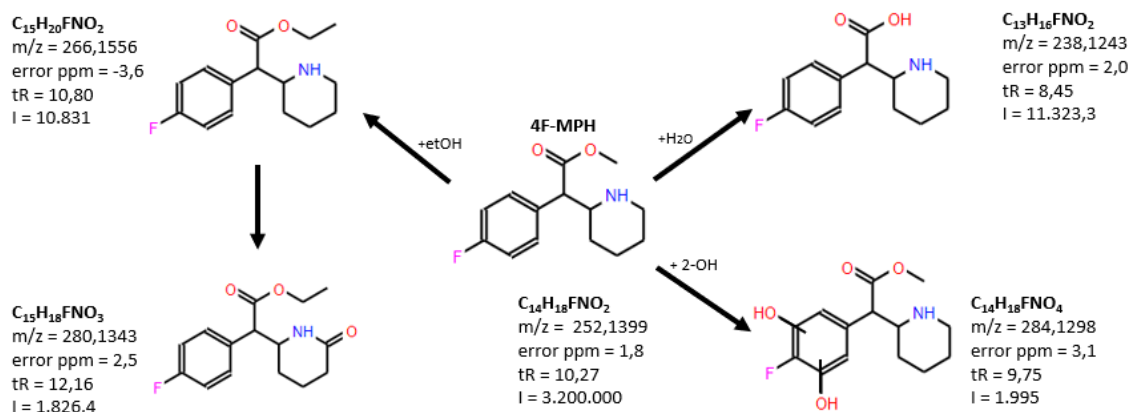
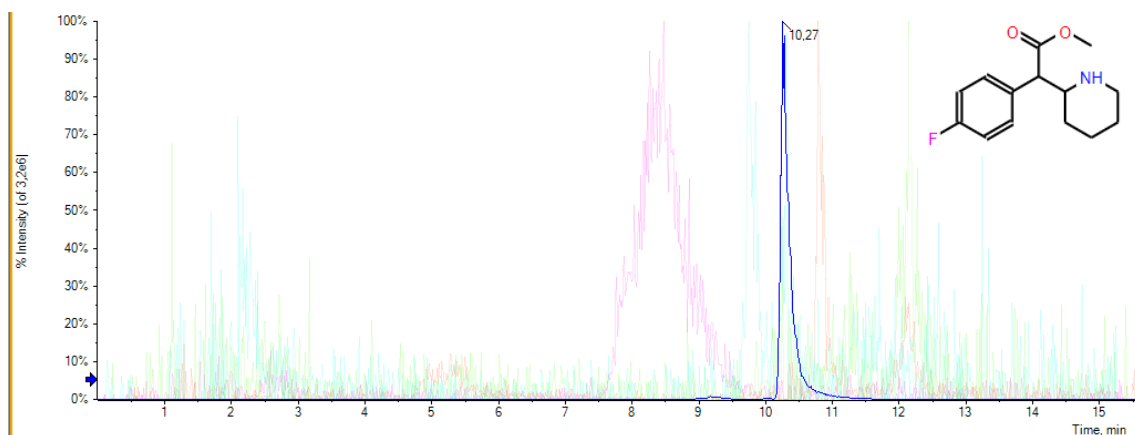
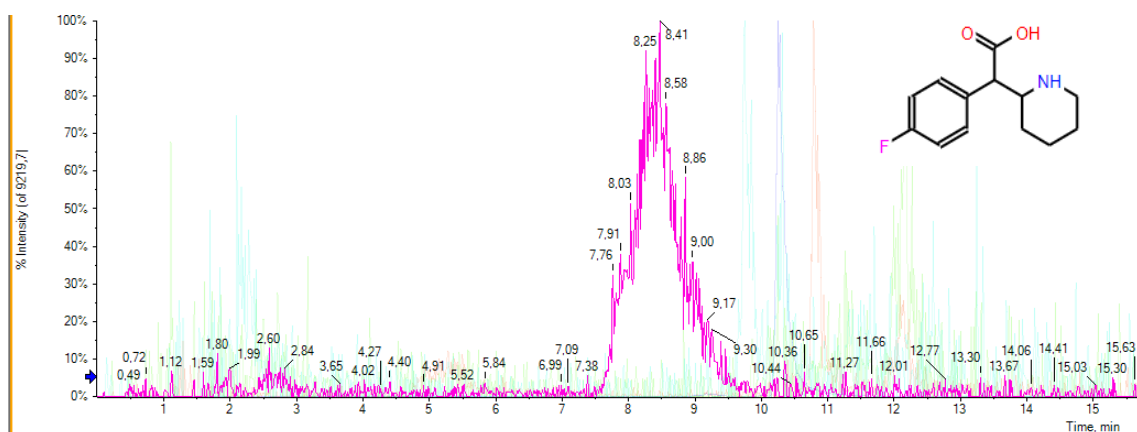


Figura 7. Ruta metabólica del 4F-MPH

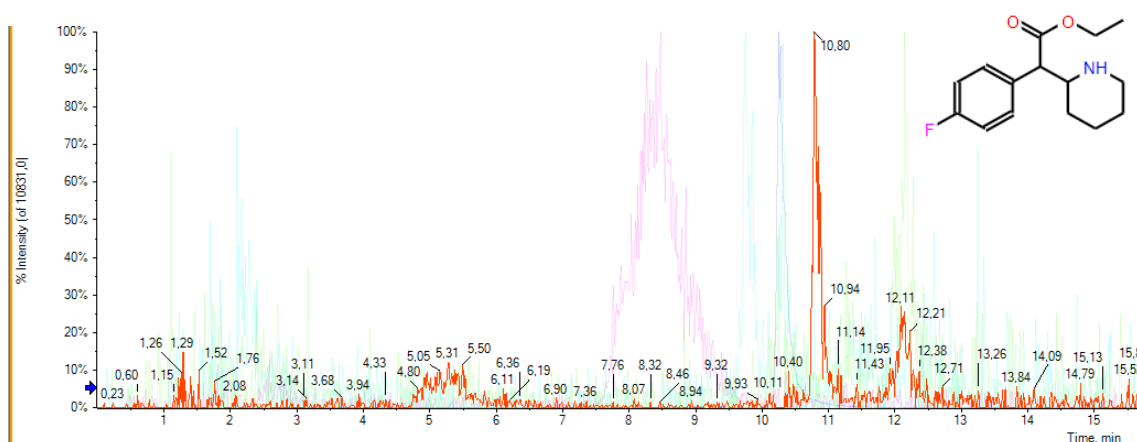
En los cromatogramas de la **Figura 8** se puede observar que los metabolitos más polares, como el derivado del ácido ritalínico ($tR = 8,45$) y la doble hidroxilación ($tR = 9,75$), aparecen a un tiempo de retención menor que el del analito principal ($tR = 10,27$), lo cual se debe al tipo de columna utilizada, sin embargo, los metabolitos menos polares, como el de la transesterificación ($tR = 10,80$) y la transesterificación + lactama ($tR = 12,16$) aparecen a tiempos de retención mayores que los del analito.



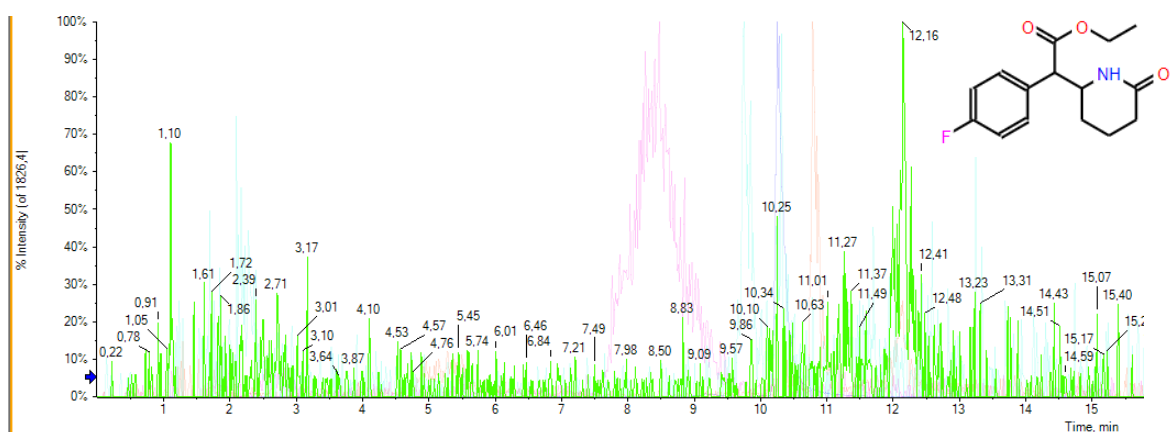
a) Cromatograma del analito 4F-MPH para m/z 252,1399 con tR 10,27 min.



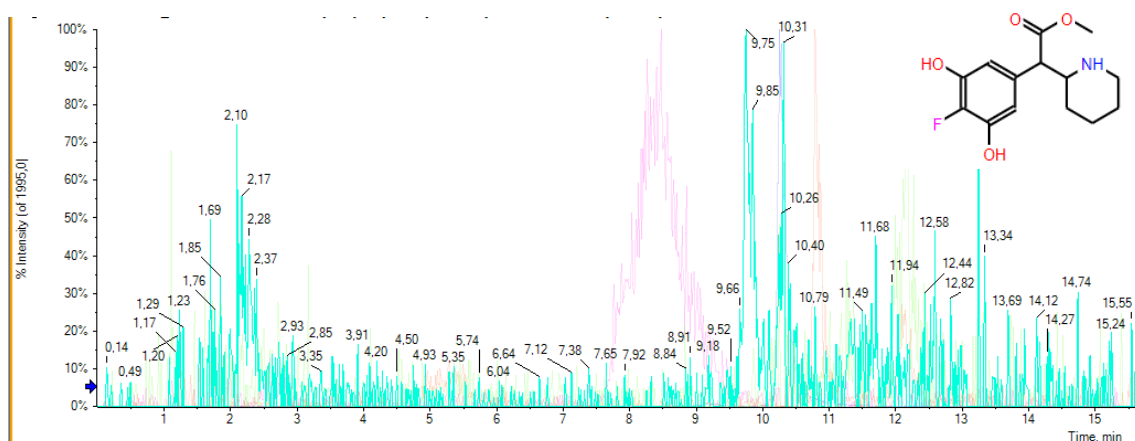
b) Cromatograma del ácido $C_{13}H_{16}FNO_2$ para m/z 238,1243 con tR 8,45 min



c) Cromatograma de la transesterificación $C_{15}H_{20}FNO_2$ para m/z 266,1556 con tR 10,80 min



d) Cromatograma de la transesterificación + lactama $C_{15}H_{18}FNO_3$ para m/z 280,1343 con tR 12,16 min



e) Cromatograma de la doble hidroxilación $C_{14}H_{18}FNO_4$ para m/z 284,1298 con t_R 9,75 min

Figura 8. Cromatogramas de los metabolitos de 4F-MPH.

Por otro lado, los metabolitos encontrados para el 4M-MPH fueron, de manera mayoritaria, el derivado metilado del ácido ritalínico ($C_{14}H_{19}NO_2$), formado tras la hidrólisis del éster, el metabolito formado tras la doble hidroxilación del mismo en el anillo aromático ($C_{14}H_{19}NO_4$) y la transesterificación del analito ($C_{16}H_{23}NO_2$), generada tras la adición de etanol al medio. En la **Figura 9** podemos observar la ruta metabólica del 4M-MPH, en la que aparecen las estructuras de los metabolitos formados, junto con su fórmula molecular, intensidad, tiempo de retención y masa molecular con el error asociado a la diferencia entre la masa molecular esperada y la teórica, expresado en ppm, dentro del rango de ± 6 ppm.

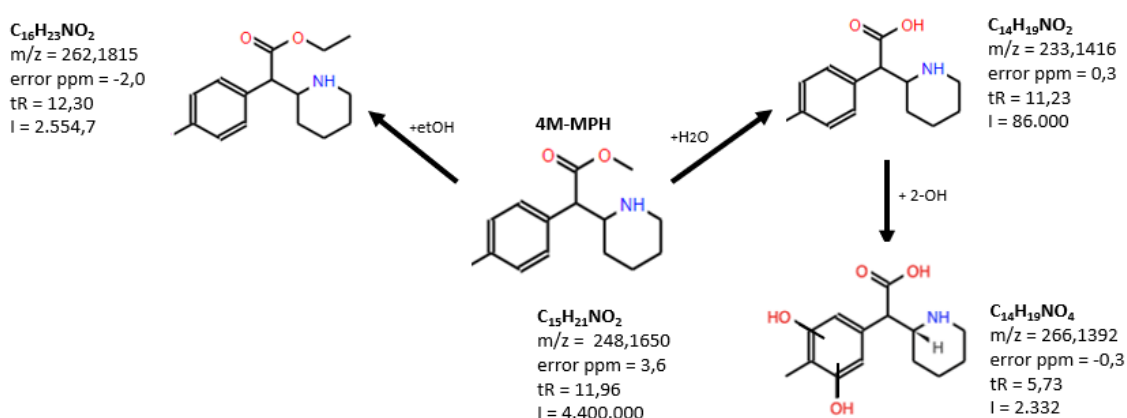
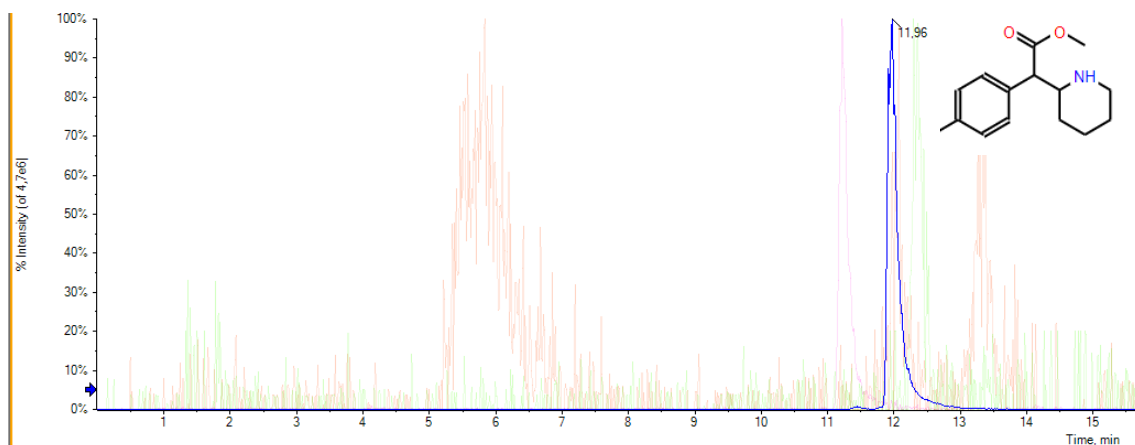


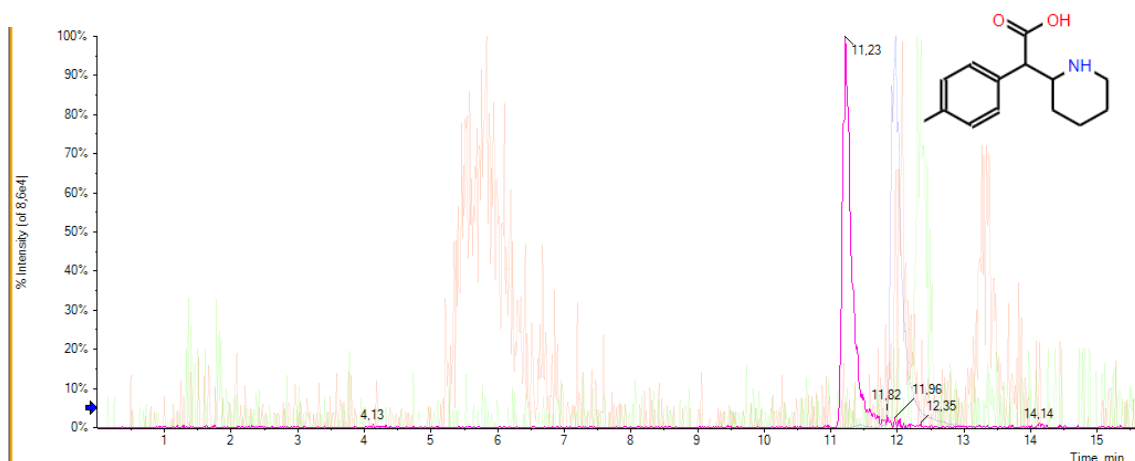
Figura 9. Ruta metabólica del 4M-MPH

En los cromatogramas incluidos en la **Figura 10** se puede observar que los metabolitos más polares, como el derivado metilado del ácido ritalínico (t_R = 11,23) y el mismo con

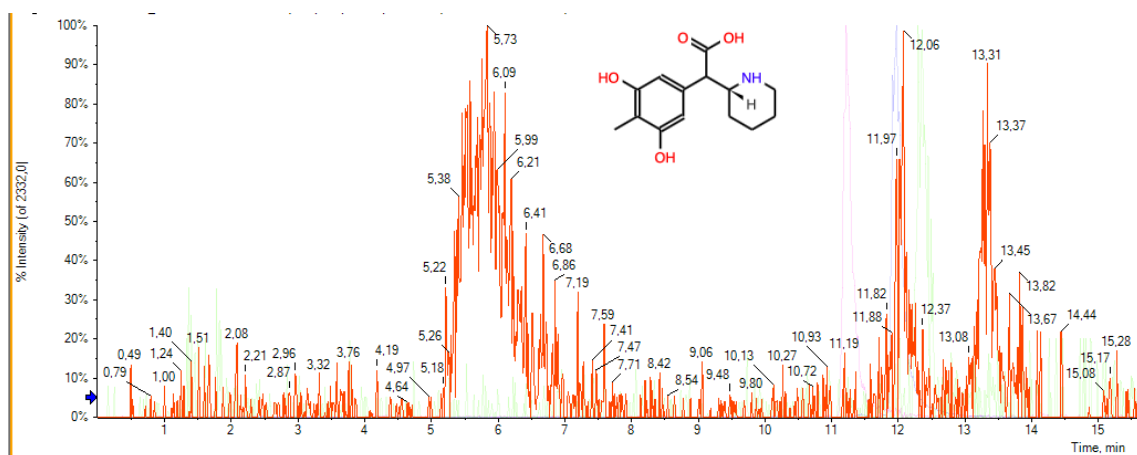
doble hidroxilación ($t_R = 5,73$), aparecen a un tiempo de retención menor que el del analito principal ($t_R = 11,96$), lo cual se debe al tipo de columna utilizada. Sin embargo, los metabolitos menos polares, como el generado tras la transesterificación ($t_R = 12,30$) aparece a un tiempo de retención mayores que el del analito.



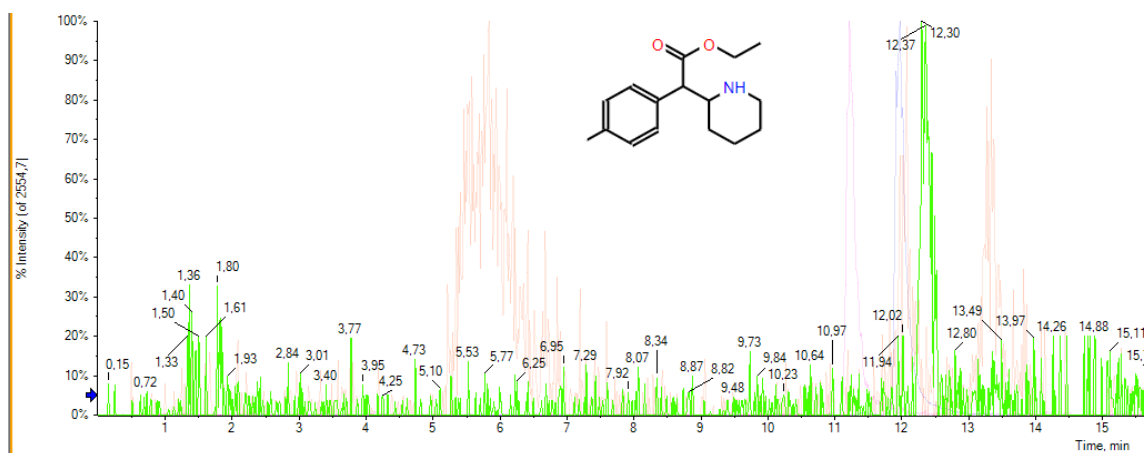
a) Cromatograma del analito 4M-MPH para m/z 248,1650 con t_R 11,96 min



b) Cromatograma del ácido $C_{14}H_{19}NO_2$ para m/z 233,1416 con t_R 11,23 min



c) Cromatograma del ácido + doble hidroxilación $C_{14}H_{19}NO_4$ para m/z 266,1392 con tR 5,73 min



d) Cromatograma de la transesterificación $C_{16}H_{23}NO_2$ para m/z 262,1815 con tR 12,30 min

Figura 10. Cromatogramas de los metabolitos de 4M-MPH.

5. CONCLUSIONES

Debido a la problemática de la rápida aparición y la ilegalidad de las NPS se decidió realizar este trabajo para evaluar la toxicología y el metabolismo de dos analitos derivados de un conocido medicamento para tratar el TDAH, el MPH. Estos analitos vienen de la incorporación de un átomo de flúor en el caso del 4F-MPH y un grupo metilo para el 4M-MPH.

La toxicidad de los analitos 4F-MPH, 4M-MPH y 4M-EPH fue estudiada a distintas concentraciones, entre 100 y 5000 μM , para un total de 5 días. La tasa de desarrollo de las larvas parece descender al aumentar la concentración de las drogas en el caso del 4F-MPH y el 4M-MPH, sin embargo, el propio desarrollo del pez también es un aspecto a tener en cuenta, ya que pese a seguir dicha tendencia en la mayoría de los casos, se obtienen resultados como la aparición de dos larvas en el experimento de 4F-MPH a 5000 μM que hace que sea necesario un estudio más en profundidad teniendo en cuenta este aspecto. Sin embargo, se puede confirmar la mayor toxicidad del 4M-EPH, cuya adición detuvo el desarrollo embrionario, al no observarse ningún cambio morfológico en los huevos desde el primer día.

Para el segundo estudio, realizado acerca del metabolismo del 4F-MPH y el 4M-MPH se obtuvo, en ambos casos, como metabolito principal el derivado del ácido ritalínico, proveniente de la hidrólisis del éster, además de esto, también se pudo confirmar la formación de metabolitos derivados del etilfenidato en presencia de EtOH. De forma más concreta para cada analito, cabe destacar que para el 4F-MPH, además de los metabolitos ya mencionados, se obtuvo la doble hidroxilación del anillo aromático y la oxidación del anillo de piperidina en presencia de etanol. Por último, para el 4M-MPH también se pudo observar la obtención del metabolito proveniente de la adición de dos grupos hidroxilo sobre el anillo aromático en el compuesto derivado del ácido ritalínico.

Todo ello se desarrolló utilizando larvas de pez cebra, ya que gracias a su genoma con gran similitud al del ser humano es considerado un modelo muy prometedor en el estudio de NPS.

6. BIBLIOGRAFÍA

- (1) González, J.; Llorens, N. Las nuevas sustancias psicoactivas. Un reto para la salud pública [online], 15-51. Disponible en: https://pnsd.sanidad.gob.es/profesionales/publicaciones/catalogo/bibliotecaDigital/publicaciones/pdf/Nuevas_sustancias_espanol.pdf (consultado 12 mayo 2021)
- (2) Sistemas de alerta temprana. https://pnsd.sanidad.gob.es/en/profesionales/sistemasAlerta/pdf/1_Informe_2013_SEAT.pdf (consultado 10 mayo 2021)
- (3) UNODC Early Warning Advisory on New Psychoactive Substances <https://www.unodc.org/LSS/Page/NPS> (consultado 15 mayo 2021)
- (4) National Institute on Drug Abuse <https://www.drugabuse.gov/es/informacion-sobre-drogas/sustancias-de-abuso-habitual#opioides-con-receta-m-dica> (consultado 15 mayo 2021)
- (5) The recovery village. <https://www.therecoveryvillage.com/> (consultado 25 mayo 2021)
- (6) Docherty, JR. Pharmacology of stimulants prohibited by the World Anti-Doping Agency (WADA). *Br J Pharmacol*. [online] **2008**, 154(3), 606-622. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2439527/> (consultado el 26 mayo 2021)
- (7) Morton, WA.; Stockton, GG. Methylphenidate Abuse and Psychiatric Side Effects. *Prim Care Companion J Clin Psychiatry* [online] **2000**, 2(5), 159-164. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC181133/> (consultado 26 mayo 2021)
- (8) Drug Enforcement Administration (U.S. Department of Justice). <https://www.deadiversion.usdoj.gov/schedules/> (consultado 20 mayo 2021)
- (9) Volkow, ND.; Wang, GJ.; Fowler, JS.; Logan, J.; Gatley, SJ.; Wong, C.; Hitzemann, R.; Pappas, NR. Reinforcing effects of psychostimulants in humans are associated with increases in brain dopamine and occupancy of D₂ receptors. *Pharmacol Exp. Ther.* [online] **1999**, 291, 409-415. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10490931/> (consultado 21 mayo 2021).
- (10) Ritcher, L HJ.; Herrmann, J.; Andreas, A.; Park, YM.; Wagmann, L.; Flockerzi, V.; Müller, R.; Meyer, MR. Tools for studying the metabolism of new psychoactive substances for toxicological screening purposes - A comparative study using pooled human liver S9, HepaRG cells, and zebrafish larvae. *Toxicol Lett* [online] **2019**, 305, 73-80. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30682400/> (consultado 17 mayo 2021)
- (11) Dini-Oliveira, RJ. Metabolomics of Methylphenidate and Ethylphenidate: Implications in Pharmacological and Toxicological Effects. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* [online] **2017**. 42(1), 11-16. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27438788/> (consultado 12 junio 2021)

- (12) Ho, JH.; Bailey, GP.; Archer, JR.; Dargan, PI.; Wood, DM. Ethylphenidate: availability, patterns of use, and acute effects of this novel psychoactive substance. *European journal of clinical pharmacology* [online] **2015**, 71, 1185-1196. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26195274/> (consultado 2 junio 2021)
- (13) Parks, C.; McKeown, D. A review of ethylphenidate in deaths in east and west Scotland. *FSI* [online] **2015**, 257, 203-208. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/282037523_A_review_of_ethylphenidate_in_deaths_in_east_and_west_Scotland (consultado 12 junio 2021)
- (14) Maskella, PD.; Smith, PR.; Cole, R.; Hikin, L.; Morley, SR. Seven fatalities associated with ethylphenidate. *FSI* [online] **2016**, 265, 70-74. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0379073816000037> (consultado 17 junio 2021)
- (15) Nacionalni Forenzicni Laboratorij. Analytical Report 4F-MPH (C14H18FNO2). Disponible en: http://www.policija.si/apps/nfl_response_web/0_Analytical_Reports_final/4F-MPH-ID-1352-15-report_final.pdf
- (16) McLaughlin, G.; Morris, N.; Kavanagh, PV.; Power, JD.; Dowling, G.; Twamley, B.; O'Brien, J.; Hessman, G.; Murphy, B.; Walther, D.; et al. Analytical characterization and pharmacological evaluation of the new psychoactive substance 4-fluoromethylphenidate (4F-MPH) and differentiation between the (±)-threo and (±)-erythro diastereomers. *Drug Test. Analysis* [online] **2017**, 9, 347-357. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5378611/> (consultado 15 junio 2021)
- (17) Deutsch, HM.; Shi, Q.; Gruszecka-Kowalik, E.; Schweri, MM. Synthesis and Pharmacology of Potential Cocaine Antagonists. 2. Structure-Activity Relationship Studies of Aromatic Ring-Substituted Methylphenidate Analogs. *J Med Chem* [online] **1996**, 39 (6), 1201-1209. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8632426/> (consultado el 28 mayo 2021)
- (18) Realchems <https://realchems.com/es/4f-mph-pellets#product.info.descriptionc> (consultado 28 mayo 2021)
- (19) EMCDDA. 4,4'-DMAR EMCDDA-Europol Joint Report on a new psychoactive substance: 4,4'-DMAR (4-methyl-5-(4-methylphenyl)-4,5-dihydrooxazol-2-amine). **2014**. Disponible en: https://www.emcdda.europa.eu/system/files/publications/812/TDAS14006ENN_4_76050.pdf (consultado 30 mayo 2021)
- (20) Nichols, DE. Structure-activity relationships of phenethylamine hallucinogens. *J Pharm Sci.* [online] **1982**, 70 (8), 839-849. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7031221/> (consultado 30 mayo 2021)
- (21) Shoff, EN.; Kahl, JH.; Hime, GW.; Coburn, M.; Boland, DM. 4-Fluoromethylphenidate: Fatal Intoxication Involving a Previously Unreported Novel Psychoactive Substance in the USA. *Journal of Analytical Toxicology* [online] **2019**,

- 43, 666-672. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31424072/> (consultado 10 junio 2021)
- (22) De Souza, E. Pharmacology and Toxicology of Amphetamine and Related Designer Drugs. *NIDA Res Monogr.* [online] **1989**. Disponible en: <https://archives.drugabuse.gov/pdf/monographs/94.pdf>
- (23) Luethi, D.; Kaeser, P.; Brandt, S.; Krähenbühl, S.; Liechti, M. Pharmacological profile of methylphenidate-based designer drugs. *J. Neuropharm* [online] **2017**, 8, 1-20. Disponible en: <https://www.semanticscholar.org/paper/Pharmacological-profile-of-methylphenidate-based-Luethi-Kaeser/0c4b993b583575b551dec642bbb3dc6afe1bb8e> (consultado 2 junio 2021)
- (24) Wagmann, L.; Frankenfeld, F.; Park, Y.M.; Herrmann, J.; Fischmann, S.; Westphal, F.; Müller, R.; Flockerzi, V.; Meyer, M.R. How to Study the Metabolism of New Psychoactive Substances for the Purpose of Toxicological Screenings-A Follow-Up Study Comparing Pooled Human Liver S9, HepaRG Cells, and Zebrafish Larvae. *Front Chem* [online] **2020**. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32766204/> (consultado 15 mayo 2021)
- (25) Ritcher, L.H.J.; Herrmann, J.; Andreas, A.; Park, Y.M.; Wagmann, L.; Flockerzi, V.; Müller, R.; Meyer, M.R. Tools for studying the metabolism of new psychoactive substances for toxicological screening purposes - A comparative study using pooled human liver S9, HepaRG cells, and zebrafish larvae. *Toxicol Lett* [online] **2019**, 305, 73-80. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30682400/> (consultado 17 mayo 2021)
- (26) Kirla, K.T.; Groh, K.J.; Poetzsch, M.; Banote, R.K.; Stadnicka-Michalak, J.; Eggen, R.L.; Schirmer, T.; Kraemer, T. Importance of Toxicokinetics to Assess the Utility of Zebrafish Larvae as Model for Psychoactive Drug Screening Using Meta-Chlorophenylpiperazine (mCPP) as Example. *Front. Pharmacol.* [online] **2018**. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29755353/> (consultado 1 junio 2021)
- (27) Vargas-Vargas, A.R. Pez cebra (Danio rerio) y anestesia. Un modelo animal alternativo para realizar investigación biomédica básica. *Anest. Mex* [online] **2017**, 29. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2448-87712017000400086 (consultado en 12 junio 2021)
- (28) Valles, S.; Gutierrez López, E.; Bardullas, U. Implementación de un sistema para evaluar la neurotoxicidad de los contaminantes ambientales en larvas de pez cebra (Danio rerio). *Investigación y Ciencia* [online] **2018**, 26 (74), 25-31. Disponible en: <https://www.redalyc.org/jatsRepo/674/67455945004/html/index.html> (consultado 9 junio 2021)
- (29) Dini-Oliveira, R.J. Metabolomics of Methylphenidate and Ethylphenidate: Implications in Pharmacological and Toxicological Effects. *Eur J Drug Metab*

Pharmacokinet [online] **2017**. 42(1), 11-16. Disponible en:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27438788/> (consultado 12 junio 2021)