



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
Ciencias de la Producción y de la Salud Animal

“Diseño de un sistema odorífero imitador (SOI) para el aprovechamiento zootécnico de perros detectores de narcóticos”

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal

PRESENTA:

ALONSO SIERRA RESÉNDIZ

Tutora Principal: Dinorah Vargas Estrada. FMVZ UNAM

Comité Tutorial:

María Josefa Bernad Bernad. FQ UNAM

Roberto Díaz Torres. FES Cuautitlán UNAM

Ciudad Universitaria, Ciudad de México, octubre 2022.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A mi madre que con su ejemplo y sacrificio me dio sentido y motivo para caminar por la vida.

A mi esposa María de Jesús y mis hijas Aranza, Belén y Atalía quienes con paciencia me han regalado cariño y tiempo para alcanzar este logro.

Agradecimientos

A la Dra. Dinorah Vargas Estrada, por su dirección y orientación, por la confianza y entusiasmo depositados para el desarrollo de otros proyectos, por el espíritu de equipo y la motivación que mantuvo durante todo este tiempo.

A los María Josefa Bernad Bernad, Roberto Díaz Torres, Jesús Gracia Mora, Sheila Irais Peña Corona, quienes no solo con conocimiento, sino con experiencia y valores me orientaron para llevar a buen término este proyecto.

Al Dr. Luis Ocampo Camberos, maestro y amigo quien ha mantenido la puerta abierta del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, en donde he disfrutado de las mayores satisfacciones profesionales de mi vida.

A CONACYT por el apoyo económico que me brindó para culminar los estudios de posgrado.

A los centros caninos: Criadero de perros Pastor Alemán Von Fraica, propiedad del Lic. Francisco de Icaza y Solana, Cikan, propiedad del Sr. Enrique Sebastián Velasco González y Prototipo K9 propiedad del MVZ Esaú Pérez Herrera, quienes facilitaron ejemplares e instalaciones para las fases de evaluación en perros adiestrados en detección.

Por último, al “mejor amigo del hombre”, a todos los perros con los que compartí años de trabajo, a los que el progreso del aprendizaje mutuo se apreciaba en cada repetición y en cada ejercicio realizado.

Resumen

La eficacia de los perros para la detección de sustancias y mercancías ilegales o peligrosas es indudable; para su condicionamiento se requiere de sustancias con los olores que se pretenden buscar, para evitar los riesgos de intoxicación por el uso de sustancias reales, la industria ha desarrollado diversos compuestos denominados “Sustancias de ayuda” (SAy) que pretenden imitar su olor, el presente trabajo propone el diseño de SAy mediante polímeros de impronta molecular (MIP) controlando la desorción de un volátil representativo del olor de la cocaína HCl (SOIc), heroína (SOIh) y marihuana (SOIm). Se comprobaron sus cualidades mediante: i) Análisis instrumental, ii) Su eficacia mediante el condicionamiento de ratas Wistar asociando el olor de los SOI’s a una solución edulcorada mediante un bebedero de diseño especial, iii) Adiestramiento de perros mediante la exposición simultánea y el análisis del comportamiento en la exposición de los odorantes por separado y iv) Ensayo multicéntrico, doble ciego (DBMT) en el que se analizó el comportamiento de perros previamente acondicionados con SAy diferentes a las diseñadas al exponerlos por primera vez a los olores individuales de los SOI. El análisis instrumental comprobó la presencia del volátil característico de cada sustancia a imitar, en las ratas se observó una tasa de éxito (TE) para el olor combinado (91,96%) y los olores individuales SOIh (97,62%), SOIc (98,81%) y SOIm (96.82). En el condicionamiento de perros se observó en el olor combinado TE 90.14% y separados de 100%. En el DBMT se determinó TE 90% para SOIc y SOIh, y para SOIm TE de 95%. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) en la exposición del SOIc. Se concluye que las sustancias propuestas cuentan con características odoríferas que podrían ser útiles en cualquier modalidad de condicionamiento de perros detectores de cocaína, heroína y marihuana.

Palabras clave: Polímeros de impronta molecular, drogas de abuso, aprendizaje asociativo, asociación hedónica de olor.

Abstract

The effectiveness of dogs for the detection of illegal or dangerous substances and merchandise is undoubted; for its conditioning, substances with the odors that are intended to be sought are required, to avoid the risks of intoxication from the use of real substances, the industry has developed various compounds called "assistance substances" (SAy) that aim to imitate its smell. This paper proposes the design of SAy using molecularly imprinted polymers (MIP) controlling the desorption of a volatile representative of the odor of cocaine HCl (SOIc), heroin (SOIh) and marijuana (SOIm). Its qualities were verified by: i) Instrumental analysis, ii) Its effectiveness by conditioning of Wistar rats associating the odor of the SOI's to a sweetened solution through a specially designed drinker, iii) Training of dogs through simultaneous exposure and analysis of behavior in the exposure of odorants separately and iv) Multicentre, double-blind trial (DBMT) in which the behavior of dogs previously conditioned with assistance substances different from those designed was analyzed when exposed for the first time to the individual odors of the SOI. The instrumental analysis verified the presence of the characteristic volatile of each substance to be imitated, in rats a success rate (TE) was observed for the combined odor (91.96%) and the individual odors SOIh (97.62%), SOIc (98.81%) and SOIm (96.82). In the conditioning of dogs, it was observed in the combined odor TE 90.14% and separated from 100%. In the DBMT, a TE of 90% was determined for SOIc and SOIh, and for SOIm, a TE of 95%. Were found statistically significant differences ($P < 0.05$) in the SOIc exposure. It concluded that the proposed

substances have odoriferous characteristics that could be useful in any modality of conditioning cocaine, heroin and marijuana detection dogs.

Keywords: Molecular imprint polymers, drugs of abuse, associative learning, hedonic association of odor.

Contenido

Resumen	i
Abstract	ii
Cuadros	viii
Figuras	x
1.- Introducción	1
2.- Generalidades	3
2.1.- Propiedades de las sustancias odoríferas	3
2.2.- Compuestos con oxígeno.	5
2.3.- Sentido del olfato	5
2.3.1.- Importancia del olfato en la supervivencia	6
2.3.2.- Anatomofisiología del olfato.....	7
2.3.2.1.- Epitelio Olfatorio	7
2.3.2.2.- Neuronas Olfatorias.....	10
2.3.2.3.- Organización de las neuronas olfatorias	11
2.3.2.4.- Interacción del odorante–receptor	11
2.3.2.5.- Adaptación sensorial	12
2.3.2.6.- Bulbo olfatorio.....	12
2.3.2.7.- Vía olfatoria central.....	16
2.3.2.8.- Órgano Vomeronasal (OVN) y Feromonas	18
2.3.2.9.- Otros componentes neurales	20
2.3.2.10.- Neurogénesis adulta.....	22
3.0.- Olfato y aprendizaje.....	24
4.0.- Sustancias de ayuda para el condicionamiento olfativo	29
5.0.- Diseño del sistema odorífero integral (SOI)	33
6.0.- Polímeros de impronta molecular (MIP´s).....	34
6.1.- Utilidades de los Polímeros de impronta molecular (MIP´s).....	36

7.-Hipotesis y Objetivos	39
7.1.- Hipótesis:.....	39
7.2.- Objetivo General	39
7.3.- Objetivos Específicos	39
7.4.- Justificación.....	40
8.0.- Material y métodos (Figura 5)	41
8.1.- Reactivos y equipos	42
8.2.- Propiedades de los compuestos usados	42
8.2.1.- Ácido acetilsalicílico (Número CAS: 50-78-2) [103].....	43
8.2.2.- 4-vinilpiridina (CAS: 100-43-6) [104].....	43
8.2.3.- Dimetilacrilato de etilenglicol (CAS: 97-90-5) [105].....	44
8.2.4.- Acrilamida (CAS: 7774-29-0) [106].....	45
8.2.5.- Azobisisobutironitrilo (CAS: 78-67-1) [107].....	46
8.2.6.- Metil benzoato (CAS: 93-58-3) [108].....	48
8.2.7.- Ácido acético (CAS: 64-19-7) [109]	49
8.2.8.- Acetona (CAS: 67-64-1) [110].....	50
8.2.9.- Etanol (CAS: 64-17-5) [111]	51
8.2.10.- Ácido fosfórico (CAS: 7664-38-2) [112]	53
8.2.11.- Metanol (CAS: 67-56-1) [113].....	54
8.2.12.- CBD Amplio Espectro (10G) Lote JMT0006339.....	55
8.3.- Equipo de laboratorio	55
8.4.- Equipo condicionamiento	55
8.5.- Revisión ética:	57
8.6.- Método de polimerización.....	57
8.6.1.- Polimerización	58
8.6.2.- Molienda y tamizaje.....	59

8.6.3.- Lavado:	59
8.6.4.- Carga de la Molécula Molde:	59
8.6.5.- Caracterización del MIP imitador de Cocaína (SOIc).....	62
8.6.6.- Adsorción:	63
8.6.7.- Desorción:	63
8.6.8.- Espectrofotometría de infrarrojo de 4 vinil piridina y SOIc.....	65
8.7.- Caracterización del MIP imitador de heroína (SOIh).....	66
8.7.1.- Capacidad máxima de retención MIP imitador de heroína (SOIh)	66
8.7.2.- Cromatografía de espacio de cabeza para análisis de ácido acético.	66
8.7.3.- Infrarrojo de acrilamida y MIP _{AA}	67
8.7.4.- Estudios de adsorción de AAS a MIP _{AA}	67
8.8.- Imitador de cannabis (SOIm).....	68
8.9.- Fase Biológica.....	69
8.9.1.- Fase modelo animal A (Ratas)	71
8.9.2.- Fases de aprendizaje	72
8.9.3.- Modelo Biológico “B” (Especie blanco): Condicionamiento de perros (CO)	73
8.9.4.- Proceso de condicionamiento.....	74
8.9.5.- Modelo Biológico “C” (Campo): Ensayo DBMT	76
8.9.6.- Estímulos odoríferos:.....	76
9.- Resultados	79
9.1.- Fase Instrumental:.....	79
9.1.1.- Caracterización del Imitador (SOIc).....	79
9.1.3.- Caracterización del imitador (SOIm):.....	95
9.2.- Modelo Biológico “A” “B” y “C”	95

10.- Discusión.....	100
11.- Conclusiones.....	110
Referencias	112

Cuadros

Cuadro 1: Grupos químicos y ejemplos de compuestos que caracterizan el olor de diferentes sustancias y materiales	6
Cuadro 2.- genes funcionales (intactos) y pseudogenes (defectuosos), se incluyen como funcionales aquellos genes sin mutaciones efectivas, pero aparentemente truncados por alguna secuencia incompleta en humano, rata y perro. Adaptado [26].	9
Cuadro 4.- Relación de caninos (Modelo biológico “B” y “C”) y su procedencia	78
Cuadro 5: Características de la Espectrofotometría de infrarrojo de acrilamida y SOIh cargado	92
Cuadro 6.- Tasa de éxito/repetición (SR) y análisis de Chi cuadrada (Valor de $X^2:0.05$) en las diferentes fases de condicionamiento con imitadores de heroína (SOIh) y cocaína (SOIc) de ratas.....	96
Cuadro 7.- Tasa de éxito/repetición (SR) y análisis de Chi cuadrada (Valor de $X^2:0.05$) en las diferentes fases de condicionamiento el imitador de cannabis (SOIm) de ratas.	96
Cuadro 8.- Tasa de éxito/repetición (SR) y análisis de Chi cuadrada (Valor de $X^2:0.05$) en las diferentes fases de condicionamiento asociado a los olores emanados por imitadores de clorhidrato de cocaína (SOIc), heroína (SOIh) y cannabis (SOIm) de perros.....	97
Cuadro 9.- Tasa de éxito/repetición (SR) y análisis de Chi cuadrada (Valor de $X^2:0.05$) de la respuesta a los olores emanados por los imitadores de clorhidrato de cocaína (SOIc), heroína (SOIh) y cannabis (SOIm) en un ensayo multicéntrico doble ciego (DBMT) realizado en cuatro diferentes centros de adiestramiento.	97
Cuadro 10.- Química sanguínea en ratas, sometidas a un proceso de condicionamiento asociado días al olor de SOIc/SOIh y SOIm durante un período de 14 días.....	98

Cuadro 11.- Hemograma de perros, sometidos a un proceso de condicionamiento asociado al olor de SOIc, SOIh, y SOIm durante un período de 14 días.....99

Figuras

Figura 1.- Formas estructurales de las partículas odoríferas.	4
Figura 2.- Estructura química del 3-metilbutano-1-tiol, cuyo olor caracteriza a la mofeta rayada.....	4
Figura 3.- Genes y pseudogenes codificadores de quimiorreceptores en humano, rata y perro. Adaptado [26].....	10
Figura 4.-Patrones de inhalación en perros relacionados con la presencia y complejidad de localización de algún olor. [51].....	26
Figura 5.- Metodología del ensayo: Fases que integraron el diseño y caracterización de los Sistemas Imitadores de Olor (SOI) de cocaína, heroína y marihuana.	41
Figura 6.-Bebedero para ratas (SDRD) especialmente diseñado para exponer los olores durante el condicionamiento. Diseño del autor.....	56
Figura 7.-Pelota de bote irregular manufacturada en caucho (JBB).....	56
Figura 8.-Cajas de condicionamiento odorífero (CCO) manufacturadas en MDF, madera y plástico rígido, con un orificio en una cara de 10 cm de diámetro.	56
Figura 9.-Reacción de polimerización para el diseño de MIP's imitadores del olor de cocaína y heroína. Adaptado [116, 131]	58
Figura 10.- Descomposición isotérmica del ácido acetilsalicílico. [119].....	60
Figura 11.-Posible interacción de enlaces de hidrógeno del monómero acrilamida con ácido acético dentro de la matriz polimérica. Adaptado [116, 131]......	61
Figura 12.-Curva y espectro de calibración de soluciones de metil benzoato en agua	62

Figura 13.- Curva de calibración de AAS en agua ajustada pH=3	67
Figura 14.-Protonación del ácido acetilsalicílico en un medio ácido. [116, 131]	68
Figura 15.-Espectros infrarrojos del MIP de ácido acetil salicílico.	91
Figura 16.-Registro cromatográfico del espacio de cabeza de una muestra de ácido acético. [116, 131]	93
Figura 17.-Registro cromatográfico de los Compuestos encontrados en el espacio de cabeza de una muestra de SOI <i>h</i> . [116, 131].....	94
Figura 18.-Posibles interacciones de los enlaces de hidrógeno del monómero acrilamida y el ácido acético del SOI <i>h</i> . [116, 131].....	94

1.- Introducción

El olor es una propiedad organoléptica formada por la estimulación del olfato mediante las sustancias volátiles emanadas de un compuesto o sustancia determinada, atribuyéndole un carácter específico [1, 2]. Esta sensación es percibida por el cerebro mediante la transmisión de estructuras nerviosas específicas, de manera que la percepción del olor tiene elementos físicos, químicos y neurológicos, por lo que la relación entre la percepción y la respuesta la otorga el individuo con un significado específico (agradable, desagradable o neutro), por ende, vinculando procesos emotivos y de memoria, otorgándole al individuo una percepción y discernimiento robusto a pesar de la existencia de otros olores [3].

En la naturaleza un elevado porcentaje de estímulos olfativos están asociados a mecanismos de defensa, y en menor grado a la alimentación o reproducción; sin embargo; en un entorno controlado o artificial, se ha observado la capacidad de relacionar olores sin ningún significado fisiológico (estímulos neutros) con experiencias emotivamente definidas, por lo que un odorífero determinado puede usarse para inducir una respuesta de tipo hedónico o placentero; por lo que la modificación del comportamiento es el resultado de una asociación previa entre ese olor en particular y el estado emocional existente en un momento específico, de manera que en la siguiente exposición al olor se repetirá automáticamente la conducta aprendida [4].

Los perros poseen un sentido del olfato extremadamente sensible, con capacidad para identificar una amplísima variedad de odoríferos, aún en presencia de una diversidad de contaminantes y entornos, su capacidad sensorial ha sido aprovechada ampliamente en actividades policiales, militares, de seguridad e incluso de carácter deportivo [5, 6].

En la actualidad el uso de los perros detectores también incluye la búsqueda de cadáveres, personas perdidas/criminales, narcóticos, explosivos e incluso plagas y

otros organismos. La industria ha desarrollado “Say” que imitan el olor de una amplia gama de sustancias ilícitas o peligrosas para evitar los riesgos que entraña el uso de sustancias reales [7,8].

Entre los retos de su diseño, está el identificar el olor característico o firma odorífera de la sustancia a detectar, en general formada por un conjunto de compuestos volátiles que se encuentran en el gas sobrenadante, y que pueden ser registrados y analizados por cromatografía de gases y espectrometría de masas. El segundo elemento de su diseño es la conservación y liberación controlada del olor con el propósito de contar con un estímulo olfativo constante e inconfundible. Los esfuerzos para resolver este problema se dirigen principalmente a elegir materiales adsorbentes no específicos, sin resultados concluyentes hasta la conclusión de este trabajo [6].

La impronta molecular es una tecnología con abundantes antecedentes en el diseño de compuestos con capacidad de adsorber y desorber moléculas específicas empleando la síntesis de estructuras macromoleculares de alto entrecruzamiento que forman cavidades dimensional y estructuralmente compatibles con una molécula molde, además de compartir una distribución de grupos funcionales asociados entre sí, disponiendo de un reconocimiento selectivo [9]. La tecnología de impronta molecular se utiliza con diversos propósitos incluso la adsorción de residuos resultantes de la descomposición de drogas ilícitas como la cocaína, por lo que el presente trabajo propone el diseño de “Say” mediante la tecnología de polímeros de impronta molecular (MIP’s) con la desorción controlada de algún compuesto volátil representativo de la descomposición isotérmica de cocaína HCl (SOIc), heroína (SOIh) y marihuana (SOIm), lo que representa una oportunidad de innovación en el uso de esta tecnología para la desorción controlada de odorantes útiles para el acondicionamiento de odorantes para el mantenimiento de perros detectores en campo.

2.- Generalidades

El olfato es una función vital para la subsistencia, su funcionamiento es dependiente de procesos químicos que permite percibir sustancias volátiles emanadas de un compuesto o sustancia determinada que aporta al individuo información del entorno. A la composición de gases dispersos en el aire en una concentración y proporción definida se le denomina olor, es considerada como una propiedad organoléptica que le atribuye un carácter específico a pesar de ser o no perceptible, por lo que la relación entre percepción y respuesta del individuo puede ser agradable, desagradable o neutro, vinculando procesos emotivos, de memoria y de discernimiento a pesar de la presencia de otros olores [1, 7, 8, 10].

2.1.- Propiedades de las sustancias odoríferas

La capacidad tensioactiva, presión de vapor, volatilidad y lipoficidad, aportan cualidades esenciales para su percepción, la especificidad depende del tamaño y forma de la partícula condicionando el acoplamiento e interacción con el receptor y neurona sensorial correspondiente.

La química de los odorantes se compone principalmente de carbono, hidrógeno y opcionalmente, oxígeno, azufre y nitrógeno, con tamaño molecular entre 200 y 400 daltons, baja polaridad, capacidad de ceder electrones y estructura insaturada; como son los derivados de benceno, alqueno o alquino; además de poseer cualidades de solubilidad al *mucus* nasal [11].

La forma de la partícula se relaciona con el olor percibido; por ejemplo, los olores alcanforados tienen una forma esférica; mientras los olores almizclados en forma de disco y los florales se agrega una cola flexible (Figura 1) [12].

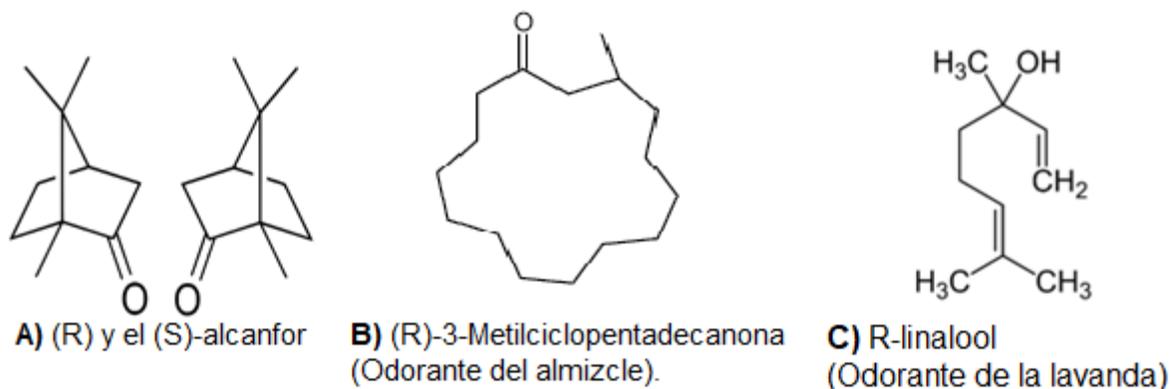


Figura 1.- **Formas estructurales de las partículas odoríferas.**

Los pequeños cambios de la estructura molecular modifican la percepción del olor; mientras que la liposolubilidad y los grupos funcionales determinan la fuerza y carácter odorífero al interactuar con diferentes tipos y proporciones de receptores, los compuestos azufrados son los más reconocidos en el aporte de esta cualidad, como es el caso del 3-metilbutano-1-tiol (Figura 2), olor característico de la mofeta rayada (*Mephitis mephitis*) [13].



Figura 2.- Estructura química del 3-metilbutano-1-tiol, cuyo olor caracteriza a la mofeta rayada

Las modificaciones estructurales demuestran que la olfacción es resultado de la interacción entre la partícula odorante y el sitio activo del receptor; sin dejar de mencionar que los receptores tienen cierta especificidad, es decir, una misma molécula puede ocupar varios receptores con ciertas similitudes [14].

De acuerdo a lo anterior, se comprueba que la fisiología del sentido del olfato es especializada, altamente sensible y sumamente compleja, con la capacidad de distinguir entre enantiómeros o reaccionar a la variación de la concentración como en el caso del indol que muy diluido en el ambiente se detecta como un olor floral y a concentraciones elevadas se percibe como un olor similar a la putrefacción; el sentido del olfato se encuentra intrincadamente relacionado con el sentido del gusto a través del sistema olfatorio accesorio (órgano vomeronasal) siendo este responsable de comportamientos sociales y de apareamiento; esta vía también se le denomina vía retronasal, atribuyéndole una relación muy importante con los mecanismos de recompensa [15, 16, 17, 18].

Los estímulos olorosos perceptibles son generalmente la suma de sustancias diferentes, sin embargo, desde la perspectiva de la química estas se pueden reunir en diferentes grupos:

2.2.- Compuestos con oxígeno.

La mayoría de ésteres, aldehídos y cetonas con más de 4 átomos de carbono tienen olores frutales. Estos compuestos forman parte de más de 3000 aceites esenciales que a su vez se integran en varios cientos de compuestos con un olor particular, se mencionan en el Cuadro 1 algunos ejemplos de compuestos olorosos que caracterizan diversas sustancias y materiales.

2.3.- Sentido del olfato

En los seres vivos, los sentidos son los órganos responsables de la percepción del entorno, clasificándose de acuerdo a la naturaleza del fenómeno que los activa, se dividen en físicos (tacto, vista, oído) y químicos (gusto y olfato), en ambos grupos la percepción se lleva a cabo a partir de estructuras especializadas, que en el caso del gusto y el olfato se denominan quimiorreceptores; cuya función se basa en la capacidad de transformar la energía química de un compuesto en energía eléctrica para inducir la despolarización de las neuronas especializadas localizadas en el

sistema olfatorio principal y el sistema olfatorio accesorio o aparato vomeronasal [19].

2.3.1.- Importancia del olfato en la supervivencia

El sentido del olfato, permite captar sustancias dispersas en el aire, al percibir estas señales, se vinculan conductas relacionadas de supervivencia (alimento y hábitat), interacción social, reproducción o experiencias hedónicas o aversivas [18, 19, 20].

Cuadro 1: Grupos químicos y ejemplos de compuestos que caracterizan el olor de diferentes sustancias y materiales

Grupo	Compuesto	Olor característico
Aldehídos	Benzaldehído	Almendra
	Cinamaldehído	Canela
	Decanal, Octanal, Citral, Sinensal	Cítricos
	2-metilundecanal	Detergentes y jabones
	4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído	Vainilla
Cetona	2-heptanona	Aditivo alimenticio, Cerveza, Pan blanco, mantequilla
	Metil-2-piridilcetona	Palomitas de maíz
Esteres	Acetato de isoamilo	Aceite de plátano
	2-metilbutanoato de etilo	Manzanas maduras
Compuestos con nitrógeno	Amoniaco	Animales, plantas y animales en descomposición
	Aminas biogénicas	Pescado en putrefacción
		Histamina
		Putrecina
		Trimetilamina
Cadaverina		
Compuestos de azufre	Ácido sulfhídrico: Olor a huevo podrido, se puede detectar a concentraciones muy bajas	Petróleo, gas natural, gases volcánicos
		Aguas termales
		Aguas pantanosas, lagunas, estanques, aceite de pescado
	2-furilmetanotiol	Café
3-metilbutano-1-tiol	Mofeta	

Adaptado de Colorado et. al 2014; [13]

2.3.2.- Anatomofisiología del olfato

2.3.2.1.- Epitelio Olfatorio

El epitelio olfatorio es responsable de la percepción de las sustancias odorantes, el cual consta de dos capas: mucosa olfatoria y lámina propia; con base al criterio anatómico e inmunohistoquímico, se integra de por lo menos 6 clases de células:

1. Neuronas receptoras olfatorias (ORN), en el perro se cuentan de 1 a 4 billones de células bipolares ciliadas, la cantidad varía de acuerdo a la especie y raza, se renueva mediante la “neurogénesis adulta” cada 40 a 60 días. Las ORN dirigen su única dendrita a la superficie del neuroepitelio olfatorio, la cual posee una terminación engrosada llamada vesícula olfatoria, que proyecta cilios inmóviles, donde se encuentran los receptores olfatorios [21].
2. Células de soporte encargadas de la producción de moco que se renueva en promedio cada 10 minutos, las cuales rodean las ORN, regulando y manteniendo el medio iónico apropiado para la transducción de la señal; en conjunto con el *mucus*, contribuyen a la remoción de moléculas odorantes y sustancias tóxicas, además de captar sustancias odorantes mediante proteínas transportadoras especializadas (OBP, *olfactory binding protein*) y el barrido de moléculas dañinas.
3. Células con microvellosidades ubicadas en la superficie epitelial, cuya función aún es desconocida.
4. Células basales globosas y 5. Las células basales horizontales, ambas son las progenitoras del epitelio olfatorio, participan en el recambio celular normal y permiten la regeneración de componentes dañados. Las células basales horizontales se encuentran directamente unidas a la lámina basal, siendo precursoras directas de casi todos los tipos celulares del neuroepitelio olfatorio, excepto de las neuronas, de donde son precursores indirectos, ya que diferencian a las células basales globosas y estas a su vez en neuronas olfatorias, ambos grupos son responsables de la regeneración del epitelio en períodos de 40 a 60 días.

6. Las glándulas submucosas o de Bowman son la principal fuente de *mucus*, producen inmunoglobulinas (IgA, IgG e IgM) y proteínas antimicrobianas (lisozima y lactoferrina) con propósitos de defensa de patógenos potenciales y concentraciones importantes de citocromo P450 que protege el epitelio del estrés oxidativo, removiendo componentes citotóxicos del mucus nasal con fines de desintoxicación local, también expresan acuaporinas y canales iónicos, lo que contribuye al flujo de agua y iones dentro del lumen ductal. El conjunto de secreciones baña los cilios neuronales regulando su función el sistema nervioso vegetativo [22].

Las OBP se sintetizan en las glándulas de Bowman, difunden a la mucosa nasal, alcanzando el 1% de las proteínas solubles del *mucus*, se componen de dos cadenas peptídicas idénticas de 19 kD, cuentan con una afinidad micromolar por las sustancias odorantes, contribuyendo al transporte de los odorantes hidrofóbicos a través de la capa hidrofílica de moco hasta contactar con los receptores de la membrana de los cilios olfatorios; por lo que juegan un importante rol en el reconocimiento del complejo ligando OBP-receptor neuronal, que promueven la unión, amplificando la señal olfatoria y la posterior remoción de los odorantes presentes en los receptores para el cese de las señales y protección del exceso de estimulación de los receptores [12, 19].

La agudeza olfatoria está directamente relacionada con la especie, en los perros no solo muestra una mayor dimensión sino también un mayor grosor y número de ORN (60-80% más), lo que asume un mejor refinamiento, el epitelio olfatorio cubre los cornetes, incrementando la superficie del epitelio, por lo que su amplitud es dependiente de la raza. Por ejemplo, en el pastor alemán, la mucosa se extiende hasta 200 cm², mientras que en el cocker spaniel ocupa 67 cm² [23, 24, 25].

Las ORN son células bipolares formadas por una dendrita apical dirigida hacia el epitelio con una terminación ciliada en donde se encuentran los receptores, su axón amielínico atraviesa el etmoides por la placa cribiforme para integrar el bulbo

olfatorio. Los quimiorreceptores son proteínas con siete dominios transmembranal en el punto de unión que pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G (Golf), tienen la misma estructura general, con siete regiones hidrofóbicas fuera de la membrana, y difieren en su secuencia de aminoácidos, especialmente en la tercera, cuarta y quinta regiones transmembrana, las cuales podrían ser los lugares de unión de las moléculas odorantes [14], estas son codificadas por una superfamilia que comprende del 3 al 5% del total del genoma, una proporción de ellos son pseudogenes no funcionales que varían en cada especie (Cuadro 2, Figura 3). Por lo que se cree que su evolución fue a partir de un gen común que se manifestó de manera particular en cada especie [19, 26].

Cada gen codifica para un receptor individual con selectividad química específica de cada proteína receptora; así, cada neurona expresa solo un tipo de quimiorreceptor transmembranal [16].

Cuadro 2.- genes funcionales (intactos) y pseudogenes (defectuosos), se incluyen como funcionales aquellos genes sin mutaciones efectivas, pero aparentemente truncados por alguna secuencia incompleta en humano, rata y perro. Adaptado [26].

Especie	Estructura	Olfativa		Vomeronasal		Gustativa	
	Genes	Olfativo	Asociado a aminos	VR1	VR2	Tipo 1	Tipo 2
Humano	Funcionales	388	6	5	0	3	25
	Pseudogenes	414	3	15	20	0	1
Rata	Funcionales	1259	17	106	79	3	37
	Pseudogenes	508	2	66	142	0	5
Perro	Funcionales	822	2	8	0	3	16
	Pseudogenes	278	2	33	9	0	5

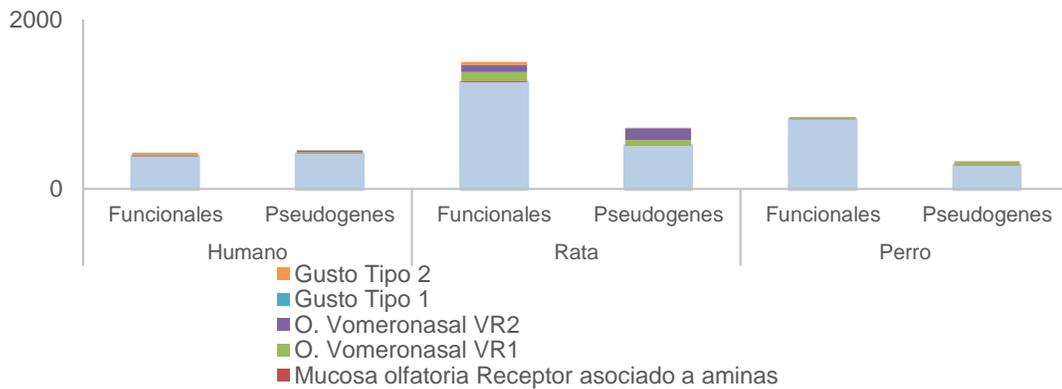


Figura 3.- Genes y pseudogenes codificadores de quimiorreceptores en humano, rata y perro. Adaptado [26]

2.3.2.2.- Neuronas Olfatorias

Cada olor debe inducir un estímulo independiente y particular; por lo que cada neurona expresa solo un tipo de quimiorreceptor, con capacidad de reconocer un grupo de odorantes en particular, las moléculas odorantes tienen una estructura compleja con diferentes grupos funcionales, haciendo posible que diferentes ORN identifiquen un grupo de odorantes con características en común o la capacidad de activar diferentes ORN's por los grupos funcionales que posee la una molécula odorante. De esta manera cada odorante es reconocido por múltiples receptores en un patrón único de activación neural; cualidad a la que se le atribuye la capacidad de discriminación olfatoria [27].

Un fenómeno atribuido a la elevada concentración del odorante, es la identificación de un olor como una sustancia diferente causado aparentemente por la suma de receptores activados, lo que desencadena un cambio del patrón neural y por tanto la identificación de un olor diferente; como sucede con las concentraciones de indol en el medio ambiente [15, 19].

2.3.2.3.- Organización de las neuronas olfatorias

Diferentes trabajos en roedores han demostrado la existencia de una agrupación de neuronas topológicamente circunscritas en el epitelio olfatorio, mezcladas aleatoriamente con una menor proporción de neuronas con diferentes receptores; así, el sistema olfatorio se sectoriza en unidades anatómicas y funcionalmente discretas, que permite que cada zona exprese solo un subconjunto del repertorio completo de receptores, por lo que la exposición de odorantes activa ciertas zonas específicas del epitelio, haciendo posible trazar mapas anatómicos de activación [28].

2.3.2.4.- Interacción del odorante–receptor

La transducción del estímulo desencadena la disociación de la subunidad alfa de la Golf, mediante la activación de la Adenil ciclasa III; enzima exclusiva de las neuronas olfatorias; convirtiendo el ATP en AMP cíclico, la cual se incrementa en el espacio intracelular induciendo la apertura de los canales iónicos regulados por nucleótidos, promoviendo el ingreso de sodio y calcio, lo que provoca la despolarización local transitoria, específica de las neuronas olfatorias originando una corriente hacia el interior de iones sodio y calcio. Las ORN mantienen una elevada concentración intracelular de iones cloro, el incremento de calcio intracelular origina la apertura de canales de cloro con su consiguiente salida, contribuyendo a la despolarización de la ORN (potenciales lentos del receptor), promoviendo la apertura de canales de sodio y potasio dependientes de voltaje, que dan lugar a un incremento graduado de la frecuencia de descarga, de tal manera que estímulos fuertes incrementan el potencial de receptor y la frecuencia de descarga, que es la información que se conducirá hasta el bulbo olfatorio [29, 14].

La mayor concentración de cloro en el espacio intracelular de las ORN se debe a la presencia de una proteína estructural de intercambio de cloro, bicarbonato y a la presencia de un cotransportador de Na-K-Cl [14, 19].

La conclusión de la respuesta olfatoria, se puede atribuir a uno o varios factores conjuntos, como la difusión del odorante durante la separación de los receptores, su degradación por las enzimas presentes en el moco o la existencia del AMP cíclico, que activa a las quinasas, la fosforilación de los canales iónicos, disminuyendo la sensibilidad de los canales dependientes de nucleótidos, lo que permite cesar el mecanismo de transducción retornando el calcio al espacio extracelular por los intercambiadores sodio-calcio, el mecanismo de los canales reguladores de cloro el interior de la célula [19].

2.3.2.5.- Adaptación sensorial

Ante la estimulación continua, la respuesta neural disminuye progresivamente hasta desaparecer, posiblemente causado por un mecanismo de inhibición retroactiva, suprime la transmisión de las señales a través del bulbo olfativo, activando las fibras nerviosas centrifugas que retroceden desde las regiones olfativas del cerebro por el haz olfativo y termina en las células granulares que funcionan como neuronas inhibitorias; actuando sobre el calcio intracelular en interacción con la Calmodulina; y estimulan las fosfodiesterasas degradando el AMP cíclico, disminuyen la actividad de los canales iónicos dependientes de nucleótidos, activando a las quinasas inactivando la Adenil ciclasa III mediante la fosforilación o incluso activando a la Adenil ciclasa A fosforilan a los receptores de odorantes, disminuyendo la sensibilidad a la enzima ciclasa o permitiendo el reclutamiento de proteínas β restrinas que inactivan el dominio intracelular del dominio [14, 19].

2.3.2.6.- Bulbo olfatorio

El bulbo olfatorio es una estructura bilateral, simétrica, localizada en la parte ventral del lóbulo frontal del cerebro, en las cuales se hallan diferentes tipos de neuronas con arreglos dendríticos únicos, sinapsis recíprocas exclusivas con presencia de diferentes tipos de neurotransmisores; en cada bulbo los axones olfatorios periféricos hacen sinapsis dentro de los glomérulos olfatorios con las neuronas de segundo orden.

El bulbo olfatorio conduce la información desde las ORN's hasta las estructuras centrales y la corteza olfatoria. En este sitio los axones se reúnen para formar haces de fibras nerviosas que se extienden hasta el bulbo olfatorio, en donde terminan en una arborización libre y ondulante; cada fibra queda incluida en una formación redondeada llamada glomérulo olfativo. En esta formación hacen sinapsis con la arborización dendrítica de las células mitrales presentes en la zona interna del bulbo, las cuales emiten los cilindroejes que avanzan hacia la región posterior del bulbo olfatorio para constituir la cinta olfativa, que se divide y conecta a uno de los centros corticales del olfato [30].

Las neuronas de segundo orden, células mitrales o neuronas gigantes y en penacho, constituyen las neuronas eferentes del bulbo olfatorio siendo responsables de conducir la información hacia las estructuras superiores, llevando sus axones a través de la cinta olfatoria lateral hasta las estructuras de la corteza olfatoria que comprende varias regiones cerebrales, incluido el núcleo olfativo anterior, la corteza piriforme, partes de la amígdala y la corteza entorrinal y estas áreas a su vez se interconectan con muchas áreas del cerebro, incluidas la neocorteza, el hipocampo, el tálamo mediodorsal, el área preóptica, el hipotálamo y otras partes del sistema límbico. En cada glomérulo, la convergencia de estas neuronas receptoras establece sinapsis excitatorias reguladas por los mediadores glutamato y carnosina; existiendo también interneuronas inhibitorias reguladas por GABA, que corresponden a las células periglomerulares y granulares [31, 32].

De manera que se observan cuatro formaciones diferentes:

Capa plexiforme externa, formada por dos subtipos de células en penacho: medias e internas. La dendrita primaria de ambas conecta con un solo glomérulo, y sus axones se proyectan a la corteza olfatoria por el tracto olfatorio.

Capa de células mitrales o neuronas gigantes que se integra por somas; cada célula mitral tiene una dendrita apical que termina en un solo glomérulo, y varias dendritas

basales que terminan en la capa plexiforme externa. Los axones de las células mitrales son mielínicos y dejan axones colaterales recurrentes que se distribuyen difusamente por la parte profunda de la capa granulosa para terminar en la corteza olfatoria.

Capa plexiforme interna se forma por axones de las células granulosas y unos pocos somas celulares.

Capa de células granulares son las más abundantes del bulbo olfatorio, no tienen axones, cada una da lugar a una prolongación periférica gruesa que se ramifica y termina en la capa plexiforme externa, y varias finas que se distribuyen por la parte más profunda de su misma capa [14, 32, 33].

Los axones que tienen receptores con un alto grado de similitud molecular convergen en los glomérulos cercanos; los odorantes individuales tienden a activar grupos de glomérulos cercanos, en lugar de glomérulos individuales ampliamente dispersos. Lo que sugiere que la topografía de los receptores de olor también se refleja en una topografía funcional, que se extiende organizadamente a diferentes clases de moléculas de olor [34].

En síntesis, el bulbo olfatorio se caracteriza por:

- a) Selectividad: Cada axón olfatorio hace sinapsis en un solo glomérulo, sin ramificaciones distales, contactando con las células mitrales y en penacho.
- b) Sensibilidad y discriminación: Existe una convergencia de hasta 25 000 axones olfatorios en un solo glomérulo compuesto de cerca de 100 neuronas de segundo orden, teniendo un fenómeno de alta convergencia de información neural.
- c) Organización espacial: Cada glomérulo recibe señales de un solo tipo de receptor, los receptores se distribuyen topográficamente (dorsoventral y medio lateralmente), lo que indica que la expresión de tales receptores se divide en zonas [14].

- d) Codificación espacial: Se ha demostrado por diversos trabajos de mapeo de activación, que cada odorante genera un patrón único de activación en neuronas receptoras, glomérulos específicos y en consecuencia en proporciones espaciales semejantes en el bulbo [28].
- e) Codificación temporal: La discriminación olfatoria puede depender del número, patrón temporal, ritmicidad y sincronía de los picos de actividad, es decir no solo cuales neuronas sensoriales disparan sus señales, sino también el momento de su actividad [35].
- f) Información sensorial refinada: El bulbo olfatorio tiene la capacidad de refinar la señal olfativa debido a la existencia de sinapsis recíprocas excitatorias axodendríticas entre la dendrita apical de las células mitrales y de la célula en penacho, e inhibitorias con las interneuronas periglomerulares.

El refinamiento de la señal olfatoria por medio de enfoques recíprocos depende del balance entre los procesos excitatorio e inhibitorio entre las células granulares mitrales y de las proyecciones centrifugas, que modulan cada patrón neural que sale a las áreas centrales a partir de la excitación causada por la neurona olfatoria de la célula mitral y de la periglomerular que tiene como función inhibir en el glomérulo a la misma célula mitral excitada previamente, realizando una inhibición recurrente, la neurona periglomerular y otro grupo de neuronas denominadas de axones cortos que conectan los glomérulos adyacentes estableciendo sinapsis axodendríticas con células mitrales de las estructuras adyacentes contribuyendo a la inhibición de estas células. Las células granulares inhiben a la célula mitral responsable de la excitación inicial y a otras células mitrales conectadas en la capa plexiforme interna con sinapsis dendrodendríticas laterales [32].

La mayoría de las sinapsis están organizadas en pares recíprocos de sinapsis dendrodendríticas, la sinapsis desde la célula mitral a la célula granular es de carácter excitatorio, mientras que las sinapsis desde la célula granular a la célula mitral es inhibitoria, siendo esta última la única salida de las células granulares; la proporción de células granulares por cada célula mitral es de cerca de 100:1, cada

célula granular tiene de 50 a 100 gémulas recíprocamente conectadas a las dendritas de las células mitrales, lo que aporta un elevado parámetro de contacto e interacción funcional entre ambas neuronas.

Las células del glomérulo también reciben señales de las zonas centrales mediante las proyecciones centrifugas que participan en la modulación de las señales, mediante la excitación de las células granulares que inhiben a la célula mitral y las adyacentes, así como fibras que son dirigidas al glomérulo en donde puede modular el grado de excitación de la célula mitral, mediante sinapsis dendrodendrítica [14, 32].

2.3.2.7.- Vía olfatoria central

Los axones de las células mitrales y de penacho se agrupan en la cinta o tracto olfatorio lateral que se proyectan a cinco regiones denominadas en conjunto corteza olfatoria primaria, cuyo principal papel es la codificación de la intensidad del odorante, estas no tienen un relevo talámico como en el resto de las estructuras sensoriales por lo que los axones olfatorios se proyectan manera directa con el núcleo olfatorio anterior, núcleos corticales anteriores de la amígdala, núcleos corticales posteriores de la amígdala, tubérculo olfatorio y corteza entorrinal.

La corteza piriforme; es la estructura de mayor área, y es la encargada del procesamiento olfatorio de la memoria y reconocimiento de los olores, es una especie de arquicorteza, constituida por tres capas, respecto al resto de la corteza, se considera filogenéticamente como una de las estructuras más primitivas, se compone principalmente de células piramidales cuyas dendritas apicales terminan en la primera capa, a su vez se divide en dos subcapas la primera que corresponde a los axones de las células mitrales superficiales y la subcapa b compuesta por los axones de asociación originados desde las capas rostrales (segunda capa) y caudales (tercera capa) de las células piramidales. Antes de entrar a la primera capa, los axones de asociación hacen sinapsis con las dendritas basales de otras

células piramidales, por lo que se puede apreciar una intrincada red de sinapsis con las dendritas basales de otras células, además, contiene neuronas inhibitorias que reciben el ingreso de la señal olfatoria, las cuales terminan sobre las dendritas apicales de las células piramidales cerrando un circuito inhibitorio, en la segunda y tercera capa se localiza el penacho dendrítico de las dendritas basales, distribuidas alrededor de los cuerpos celulares. En la tercera capa existen, un segundo circuito inhibitorio, integrado por pequeñas interneuronas y axones largos que regresan al bulbo olfatorio, otras áreas de la corteza olfatoria y estructuras terciarias de la vía olfatoria. Excepto el tubérculo olfatorio el cual está considerado como un elemento del núcleo estriado ventral, las demás estructuras cuentan con una configuración muy similar, cuya principal variación es la conectividad externa [19, 31, 32].

Respecto a la corteza olfativa secundaria; hipocampo y amígdala son activados durante la discriminación, identificación y memoria. La corteza orbitofrontal participa en la percepción y significancia hedónica del olor, siendo el principal receptor de las proyecciones olfatorias directas desde la corteza olfatoria primaria y la vía indirecta desde el núcleo dorso-medial del tálamo. La ínsula está relacionada con el sistema límbico.

Es importante destacar que la función olfatoria involucra una compleja y extensa red neuronal, por lo que las funciones antes descritas no son exclusivas de cada estructura sino del conjunto. Además, la información olfatoria aparece basada en dos principales maneras de procesamiento, uno serial con la participación sucesiva de las áreas olfatorias primaria y secundaria, y otro paralelo (hemisferio derecho versus hemisferio izquierdo) donde las estructuras en el hemisferio derecho se encuentran más involucradas en la memoria, mientras que las del hemisferio izquierdo, en los procesos emocionales.

La disposición de la vía olfatoria inicia con la proyección del bulbo a través del tracto a las regiones de la corteza que se caracteriza por la dispersión de las regiones corticales de la corteza olfatoria secundaria.

La codificación de la información olfatoria cambia perdiendo el patrón espacial como el que sucede en el bulbo olfatorio, encontrando una dispersión aleatoria de actividad, por lo que a la fecha se desconoce los patrones de codificación neuronal del olor a nivel de la corteza, sin embargo, si se observan diferencias de actividad cuando el individuo se expone a diferentes odorantes [19].

2.3.2.8.- Órgano Vomeronasal (OVN) y Feromonas

El segundo componente del sistema olfatorio es el órgano vomeronasal (OVN) que está dividido en un área ventral y una dorsal, encontrando dos diferentes receptores (V1R y V2R), estructuralmente son muy similares a los receptores del epitelio olfativo. Jakobson se dedicó a describir el OVN, en forma detallada, en diferentes especies de mamíferos, advirtió la falta de desarrollo del OVN en humanos, señalando que: "El OVN es un órgano sensorial del cual los seres humanos no tienen conciencia" [35, 36, 37, 38].

Al OVN se le atribuye la capacidad de detectar sustancias químicas volátiles producidas por el organismo modulando conductas parentales, sociales o reproductivas, desencadenando respuestas con cierta similitud a las respuestas motoras viscerales como náusea o salivación, motilidad gástrica, en el caso de las feromonas el componente volátil que parece ser el responsable de la atracción sexual entre ambos sexos y la conducta de monta en el macho es el dimetil sulfóxido o Bisulfito de Metilo, el componente no volátil, es una proteína denominada afrosidina [35].

Existen fuentes que documentan la sincronización menstrual de grupos de mujeres a partir de la emanación de cierto tipo de olor provocado por la exposición a feromonas, detectadas por receptores (GPCR) del OVN, también son receptores acoplados a Golf; el trabajo de Clive Jennings-White demuestra la inducción de respuestas orgánicas mediante la exposición a cierto tipo de esteroides epiteliales [35].

El OVN puede percibir señales químicas liberadas en el medio ambiente y del sabor de los alimentos, también está relacionado con la "reacción de Flehmen", una retracción peculiar del labio superior. Las neuronas que lo integran están estrechamente relacionadas con el hipotálamo y participan en su activación a través del bulbo olfativo accesorio (BOA) y la amígdala [38].

El OVN consiste en un par de conductos mucomembranosos ciegos, tubulares, de epitelio olfativo que se encuentran a cada lado de la base rostral del tabique nasal, se comunica con la cavidad nasal a través de un orificio situado en el borde anterior del hueso vómer. Está rodeado por una delgada placa de cartílago y se abre rostralmente en el conducto incisivo del mismo lado que conecta las cavidades nasal y oral, se encuentra parcialmente recubierta por un epitelio que contiene neuronas receptoras bipolares. El acceso de los estímulos hacia los receptores, está regulado por un mecanismo de bomba vascular autónomo, consistente en grandes vasos sanguíneos que, al contraerse por la acción vasomotora, expanden el lumen del órgano, atrayendo los estímulos a través del pasaje [35, 38, 39].

Embriológicamente se observa el llamado primordio vomeronasal como un delgado epitelio bilateral ubicado en el área del *septum* nasal; el cual sufre una invaginación, formando una estructura tubular, en el sector medial de la placoda olfatoria, en donde se observa desde el primer trimestre de la vida intrauterina en humano, una intensa migración de neuronas inmunorreactivas a la acción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) en dirección al cerebro a través de la zona del tabique nasal, proveyendo las conexiones entre dicho órgano y el SNC [39].

Hay una segunda familia de quimiorreceptores que también se expresan en el epitelio olfatorio, son los denominados TAAR (GPCR) o "receptores asociados a trazas de aminas" también acoplados a Golf, su secuencia peptídica es diferente y solo se han encontrado en humanos, ratones y peces, se encargan de reconocer aminas volátiles presentes en la orina por lo que posiblemente estén vinculadas a las relaciones sociales y reproductivas, similar a las feromonas.

Estos receptores no dependen de la Adenil ciclasa III ni activan al AMP cíclico, siendo el principal mecanismo de activación los canales de receptores de potencial tipo 2, que regulan la permeabilidad Ca-Na, el receptor V1R regulado por el Diacil glicerol, mientras que en el V2R aún no se tiene claro el mecanismo de regulación. Las diferencias V2R tiene un dominio extracelular muy grande comparte dominios con proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad.

La transducción de la señal de la neurona olfatoria del OVN activa una región del bulbo olfatorio accesorio (BOA) en donde termina también en compartimentos separados de los glomérulos; sin embargo; a diferencia del glomérulo olfatorio; en el BOA las células mitrales se ramifican recibiendo información de varios glomérulos, existiendo una interconexión [35].

Las neuronas de segundo orden se proyectan a estructuras límbicas: Hipotálamo y amígdala mediando las respuesta sexuales y reproductivas.

Las rutas de olfacción coinciden, evidenciando la importante influencia del BOA en la amígdala, hipotálamo, algunas áreas de la paleocorteza especialmente el núcleo del tracto olfatorio lateral y por lo tanto en la corteza cerebral; por lo anterior ambas rutas tienen ciertos patrones en paralelo, existiendo información de que el aparato vomeronasal puede identificar ciertos odorantes comunes y viceversa algunas feromonas pueden ser detectadas por el epitelio nasal; existiendo la capacidad de expresión común de receptores en el OVN y en el epitelio olfativo [39].

2.3.2.9.- Otros componentes neurales

Existen estructuras complementarias cuyas funciones aun no se encuentran plenamente identificadas:

Sistema trigeminal, que inerva toda la cavidad nasal destinada a la sensibilidad somática de las fosas nasales encargada de la percepción de sensaciones no

olorosas evocadas por las sustancias olientes: prurito, escozor, hormigueo, frescor, ardor o pinchazos.

Nervio terminal que inervan receptores olfatorios, trigeminales y vomeronasales. Hasta la conclusión del presente trabajo, no se encontró material que sustente documentalmente su función, aunque se asume que es un quimiorreceptor complementario del sistema vomeronasal, cuyo origen embrionario está en la placoda olfatoria, su trayecto sirve de guía para la migración de las neuronas hipotalámicas que secretan la hormona liberadora de hormona luteinizante y estimulante de los folículos (LH, FSH). Dichas neuronas se originan también en la placoda olfatoria, durante el desarrollo embrionario, terminan alojándose en los núcleos supraóptico y paraventricular del hipotálamo, áreas que controlan la secreción hipofisaria de la hormona luteinizante (LH) y hormona estimulante de los folículos (FSH) (ambas controlan el desarrollo y la función gonadal) [14].

Órgano septal de Maser, presente en algunos mamíferos, con aferencias que terminan en el bulbo olfatorio y cuyas proyecciones centrales son desconocidas, al igual que su papel funcional [14].

Ganglio de Gruneberg, se ubica en la punta rostral de la nariz, consiste en un grupo de neuronas, que expresan la proteína marcadora olfatoria, sus axones se proyectan a los glomérulos del área caudal del bulbo olfativo principal, se expresa un gen V2R y algunos TAAR; recientemente se ha observado la existencia de conexiones neuronales con el prosencéfalo olfatorio, pero su función no ha sido definida del todo, algunos trabajos han demostrado que las neuronas existentes en esta estructura poseen características termosensoras especializadas que detectan la disminución de la temperatura dentro de una ventana dada, concluyendo que su función sensorial está abocada a la detección del frío y posiblemente a otras señales sociales químicas relacionadas con el estrés o el miedo [40].

2.3.2.10.- Neurogénesis adulta

La mucosa olfatoria es un tejido adulto que, durante toda la vida está en proceso de regeneración y reparación con la finalidad de mantener la integridad física y funcional del sentido del olfato, de manera que cuando las neuronas olfatorias mueren, son reemplazadas por la proliferación de células madre asistidas por las células olfativas envolventes (COE) [19].

En la lámina propia, se han identificado células madre multipotentes con capacidad para diferenciarse en células neurales. Mediante el empleo de diferentes marcadores específicos, se observó que estas células madre de la mucosa nasal están muy relacionadas con las células mesenquimales de la médula ósea. Se pudo apreciar que estas células madre olfatorias presentan un alto grado de proliferación, e inclinación a la diferenciación en células óseas y poca propensión a la transformación en condrocitos y adipocitos. Por las características de estas células madre olfatorias recientemente se ha propuesto llamarlas células madre olfatorias ectomesenquimales [30].

Las COE, provienen de la cresta neural, son células gliales que solo se encuentran en el sistema olfativo con características parecidas a las células de Schwann, recubren los axones de las neuronas olfativas periféricas o primarias, conformando canales perineurales continuos llenos de líquido, desde la capa epitelial hasta el bulbo olfatorio, donde se encuentran restringidas al nervio olfatorio y a los glomérulos del bulbo olfatorio a donde migran durante su desarrollo. Estas células retienen características que favorecen la neurogénesis, tanto en axones intactos como lesionados induciendo neuroprotección, engrosamiento de axones, activación de la angiogénesis e inducción de la remielinización axonal después de lesiones desmielinizantes [41, 42, 43].

La vía rostral migratoria (VRM) es la única estructura del cerebro que posee una ruta larga de migración. Se inicia en la zona subventricular con la partida de las

células tipo A y finaliza con la llegada de las nuevas interneuronas al bulbo olfatorio. Los neuroblastos presentes en la VRM forman cadenas entre ellos, facilitando su migración hacia el bulbo olfatorio; desplazándose entre estructuras tubulares integradas por células gliales (astrocitos), las cuales secretan factores de crecimiento que favorecen el proceso de migración. Los tubos de células gliales (conocidos también como glía radial o glía de Bergmann) sirven de soporte direccional y contribuyen a la supervivencia de los neuroblastos, presentan conos de crecimiento muy desarrollados y en proceso activo de extensión y retracción, lo que sugiere que estas células utilizan los mismos mecanismos de locomoción usados por los axones en crecimiento. Distintos estudios han demostrado la importancia de las moléculas de adhesión (como las integrinas) y de la matriz extracelular (como la tenascina y el sulfato de condroitina) en la migración de los neuroblastos a lo largo del proceso de migración; al parecer las isoformas polisialiladas de la Molécula de Adhesión Celular Neural están implicadas en el establecimiento de contactos entre los neuroblastos de las cadenas migratorias y las células gliales que forman los tubos de neuroblastos; en el área septal están presente factores quimiorrepulsivos (inhibidores migratorios Slits) que previenen la migración de los neuroblastos hacia ciertas zonas cerebrales. Estas interneuronas, presentan potenciales de acción de forma espontánea, reciben contactos sinápticos hasta que se integran a la red neuronal del bulbo olfatorio. Las nuevas interneuronas que se integran a la capa periglomerular expresan marcadores neuronales y reciben contactos sinápticos una vez que se integran en los circuitos neuronales.

En el caso del bulbo olfatorio accesorio las nuevas interneuronas generadas se incorporan de manera asociada al comportamiento sexual, existen reportes del incremento de la neurogénesis durante la fase estrogénica, como respuesta a la prolactina secretada a finales del embarazo y por factores hormonales asociados con el comportamiento sexual por el incremento de la liberación de feromonas, reguladas por el sistema límbico o por el hipotálamo.

El continuo recambio de las interneuronas del bulbo olfatorio se modifica por cambios en el microambiente o por modificaciones significativas en los olores percibidos; de tal manera que no solo hay una renovación celular continua, sino una modificación acorde a las condiciones ambientales mejorando la sensibilidad olfativa, en función de las experiencias previas [44].

3.0.- Olfato y aprendizaje

En la naturaleza un elevado porcentaje de estímulos olfativos están asociados a mecanismos de defensa, en menor grado a la alimentación o reproducción; sin embargo; en un entorno controlado o artificial, se ha observado la capacidad de relacionar olores sin ningún significado fisiológico (estímulos neutros) con experiencias emotivamente definidas, por lo que un odorífero determinado puede usarse para inducir una respuesta de tipo hedónico o aversivo; por lo que se asume que la modificación del comportamiento ante la presencia de un olor es el resultado de una asociación previa entre ese olor en particular y el estado emocional existente en ese momento específico, por lo que en la siguiente exposición al olor se repetirá de manera automática la conducta aprendida [6, 44].

Harper propone que la combinación simultánea entre un estado emotivo específico y un olor determinado, induce al sistema nervioso a otorgarle un significado único, influyendo así en la percepción hedónica, de manera que después de una primera experiencia la siguiente exposición al olor tendrá un impacto en el estado de ánimo y en consecuencia la modificación espontánea del comportamiento; esta es la explicación fundamental del aprendizaje emocional asociado al olor (AEA); mostrando un comportamiento afectivo o aversivo [46].

Desde el punto de vista neuroanatómico el sentido del olfato está especialmente preparado para aprender, debido al involucramiento en el procesamiento olfativo de la corteza orbitofrontal haciendo capaz al individuo de asignar valor afectivo (hedónico o aversivo) a estímulos odoríferos específicos, otra estructura vinculada con el olfato es la amígdala, estructura especialmente ligada con el AEA [47].

Los experimentos con la rata marrón común (*Rattus norvegicus*) demostraron que pueden aprender a exhibir comportamientos de alerta únicos al identificar una variedad de olores, otros estudios con la rata gigante de África (*Cricetomys gambianus*) demostraron que el uso de estas para evaluar el riesgo de minas terrestres es un método de detección de minas muy prometedor [2, 48].

En los animales no humanos los procesos de aprendizaje cumplen una función adaptativa y de supervivencia con el propósito de mejorar la interrelación con el entorno al facilitar la clasificación de diversas experiencias con un "significado similar", sustentadas en asociaciones comunes, mediante diversos tipos de aprendizaje:

Conceptual, basado en la percepción de semejanzas que permiten clasificar los estímulos que comparten propiedades físicas comunes. El desarrollo de conceptos perceptivos parece ser en gran medida bajo el control de los principios conductuales de la generalización del estímulo primario y discriminación.

Relacional, que implica la comparación entre objetos o estímulos bajo el concepto de igualdad/diferencia, en donde se ha observado que los animales cuentan con una habilidad de usar conceptos de este tipo y,

Asociativo que involucra la capacidad de formar categorías en condiciones específicas, debido a la asociación previa con un evento, respuesta o resultado común, consecuencia de estímulos ajenos desde el punto de vista de su percepción, con la capacidad de ser intercambiables entre sí [48].

Por lo que el AEA puede explicar la respuesta de agrado o desagrado de un individuo como consecuencia de la asociación simultánea de un olor y una experiencia; lo anterior se ha demostrado en diferentes trabajos en humanos, por ejemplo, la exposición de adultos al olor característico de los consultorios dentales

(eugenol), manifestando miedo fisiológico solo de aquellos individuos que habían declarado previamente su miedo al dentista [3, 45].

Gerritsen y Haak, registraron en perros cuatro patrones de inhalación, los cuales están directamente relacionados con la presencia y dificultad de localización del olor (Figura 4):

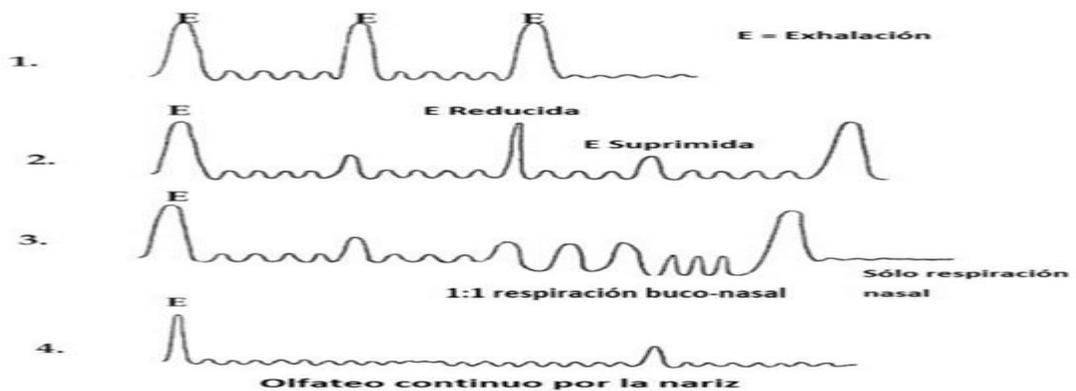


Figura 4.-Patrones de inhalación en perros relacionados con la presencia y complejidad de localización de algún olor. [51]

1. Para rastreos sencillos (por ejemplo, detectar rastreos de un olor de 30 minutos de antigüedad del guía bajo condiciones favorables) la imagen mostraba inhalaciones regulares durante el rastreo. Las ondas de las diferencias de presión son más pequeñas, lo cual indica que la velocidad del aire que pasa por la nariz es baja. Las exhalaciones en sí son intensas y regulares. En casi todos los rastreos sencillos este patrón de la respiración fue consistente desde el inicio hasta el fin.

2. El patrón de respiración anterior se desvanece cuando el rastreo incrementa su dificultad. Las ondas de las ráfagas de exhalación a través de la nariz se hacen más pequeñas y el tiempo entre ellas incrementa. En otras palabras, el perro olfatea más prolongadamente, generando más presión del aire en la nariz.

3. La siguiente fase muestra en principio el mismo patrón que el anterior. Los periodos de olfateo son, aún más prolongados dándose periodos cortos y característicos en los que el perro está visiblemente respirando a través de la boca y la nariz. No fue inusual ver algunos perros exhalar por la nariz en ráfagas dobles.
4. En las partes difíciles del rastreo, la imagen de la respiración mostraba que el perro estaba olfateando casi sin interrupción [51].

La exhalación por la nariz probablemente realiza una especie de limpieza de las células olfativas en la membrana mucosa de la nariz, que aparentemente es menos necesaria para concentraciones de olor más bajas. Parece como si los perros respirasen al olfatear de la misma manera que lo hacen al jadear bajo temperaturas cálidas. Pero a diferencia del jadeo, que es más una ventilación sin respiración, aquí la alta frecuencia de olfateo contribuye de hecho a la inhalación. En rastreos sencillos, los perros logran fácilmente combinar la respiración y el escaneo de olores. La inspiración que tiene lugar durante el olfateo y la exhalación ocurre en forma de ráfagas a través de la nariz. Cuando el olor del rastreo disminuye, entonces el perro resuelve este problema de dos maneras: la velocidad de la corriente de aire en la nariz aumenta, aumentando así la capacidad. El perro también prolonga la duración total del período de olfateo. La exhalación retardada tiene lugar en parte a través de la nariz y en parte a través de la boca ligeramente abierta del perro de rastreo. La tendencia a retrasar la exhalación perjudica la respiración. Pero al olfatear durante más tiempo, crea una ventaja al obtener más información sobre los olores entrantes. Cuando la dificultad del rastreo aumenta debido a condiciones más extremas, la exhalación por la nariz se suprime por completo. Durante rastreos con un mínimo de olor, la exhalación se realiza con mayor frecuencia por la boca. La menor resistencia y la mayor apertura de la boca permiten que pasen un mayor volumen de aire que mediante la exhalación por la nariz. Por eso, la exhalación lleva menos tiempo. Y, por lo tanto, rastrear con la boca abierta es una ventaja, en la medida en que ahorra tiempo para oler y analizar olores. Por su parte Settles determino que el volumen de aire inhalado por unidad de tiempo durante la

búsqueda ($\approx 60 \text{ mL} \cdot \text{s}^{-1} / 5 \text{ Hertzios}$), equivalente a 300 mL de aire muestreado por segundo [50, 51].

En la actualidad, el AEA se relaciona a olores que se vinculan con diversas actividades; por ejemplo en humanos el diseño de firmas odoríferas que identifican una organización, productos comerciales, religiosos e incluso políticos [52, 53]; en el caso de los animales esta principalmente dedicado al uso de la capacidad olfativa de los perros para la búsqueda y localización de olores característicos de personas, sustancias y mercancías, esto a partir de la similitud de la química de vapor y firma molecular de las sustancias diana y en función de la conservación de las propiedades fisicoquímicas de la sustancia o compuesto problema [46], durante su uso se expone a los perros a diferentes materiales existentes en los distintos entornos en donde se desenvuelven; lo que representa un reto por la exposición a una infinidad de variaciones de olor, por lo que los perros deben tener la capacidad de discriminar entre los diferentes efluvios y el olor de la sustancia o mercancía a detectar [54, 55, 56], el uso de las sustancias reales representa en algunos casos riesgos tóxicos y legales por su posesión, transporte y almacenamiento, en otros casos la posible presencia de contaminantes odoríferos que interfieran el proceso de condicionamiento [57, 58]. Una segunda condición es la necesidad de animales sensibilizados a más de un olor; es decir; que identifiquen o localicen los olores característicos de diferentes sustancias o mercancías [59, 60, 61].

Los sistemas de condicionamiento de perros detectores están basados en el AEA al olor y un elemento satisfactor de algún impulso como comida (técnica ingestiva) o la cacería o recobro de un objeto (técnica predatoria), la inclusión de los olores a detectar se puede llevar a cabo mediante la asociación de un olor a la vez o bien mediante un método de asociación simultanea de varios olores; denominado generalización que consiste en la exposición de un estímulo compuesto por un procesamiento de asociación codificando respuestas similares para cada elemento del estímulo original; en el caso del proceso olfativo, si la combinación de dos o más olores no altera sus propiedades individuales y conservan la cualidad de

estimulación de cada elemento, las respuestas condicionadas a cada uno de los olores deben generalizarse. Si los odorantes que se combinan crean una nueva señal con características individuales que alteran a cada odorante creando la percepción de un olor nuevo y único, el condicionamiento de la mezcla no produce generalización; de manera que el compuesto es percibido como una nueva configuración; el grado de generalización es influenciado por diversos factores entre ellos las propiedades fisicoquímicas de cada compuesto, las cualidades del estímulo emanado de cada elemento o el enriquecimiento olfativo [56, 59]; ejemplos de aplicación de la generalización son el sistema denominado 4:1; desarrollado por Felix Fisher y Bernard Pauly en 1981, consistente en la exposición de cuatro olores a la vez; cuyo argumento principal de los creadores es la considerable reducción del tiempo dedicado al condicionamiento de olores, mejorando la eficiencia del proceso [60].

Otro sistema que recurre a este supuesto son los productos denominados Sokks MPTS®, creado por Wolf A. Kafka; dentro de sus características son contener todos los olores de la especialidad en un solo producto, formando perros capaces de detectar diversas proporciones aromáticas y por lo tanto obtener un mayor rendimiento del canino adiestrado [61, 62].

4.0.- Sustancias de ayuda para el condicionamiento olfativo

En 1965 Francia se constituyó como el país fundador en el uso de equipos hombre-perro especializados en la detección de narcóticos; a partir de 1970 se difundió a nivel mundial usando como odorantes de referencia principalmente drogas de abuso [4], en la actualidad la búsqueda y localización de mercancías y sustancias abarcan drogas ilícitas, armas de fuego, artefactos explosivos, personas desaparecidas, restos humanos, fosas clandestinas, olor del responsable de un acto criminal mediante la conservación de evidencias que contienen la huella odorífera perteneciente al posible culpable, plagas (Chinches (*Cimex sp*), Polillas (*Hylotrepus bajulus*)), etc.; existiendo evidencia abundante de la versatilidad, economía y

confiabilidad en su rendimiento [4, 58, 63]. En 1989 la empresa Sigma Aldrich® desarrolló odorantes imitadores de cocaína, heroína y marihuana con el fin de brindar una mayor seguridad de la salud de los caninos y eliminar las responsabilidades jurídicas por su posesión y transporte [64].

Las Say para el condicionamiento son diseñadas con el propósito de emanar un vapor formado por uno o varios de los componentes de la “firma odorífera” de la sustancia objetivo; la cual se integra del conjunto de “compuestos orgánicos volátiles” (COV) que forman parte del “gas sobrenadante”, estos, tienen la capacidad de producir respuesta en métodos instrumentales y biológicos [57, 65].

Las Say se clasifican por diferentes criterios, en primer lugar, por su estado físico, sólido (polvos o gránulos), líquido y semisólido este último mediante el uso de petrolato como vehículo [66], un segundo criterio es el número de olores contenidos en cada producto; al respecto hay marcas cuyos compuestos contienen un olor por cada presentación; otros incluyen varios olores en un solo producto [67, 68, 69]. Desde el punto de vista de las fuentes de olor, las Say pueden clasificarse en tres grupos: muestras reales (grupo 1), esencias imitadoras (grupo 2 y 3) y “pseudo” esencias (grupo 4).

El grupo 1 lo integran los compuestos o muestras reales, son sustancias de no fácil acceso debido a las regulaciones en su posesión, uso y riesgos toxicológicos [71, 72]; además de contener muchos otros olores en el vapor que emanan, algunos de estos pueden ser más definidos que el ingrediente objeto del condicionamiento. Estos otros olores provienen de subproductos y rellenos que son parte de la imagen de olor ofrecido al perro para su condicionamiento; generando imprecisiones en el resultado final; un ejemplo de este tipo de ayuda son los productos destinados a la detección de explosivos de las marcas NESTT^{MR}, Truescent k9^{MR} y en el caso de drogas el producto de la marca SOKKS® [66, 69].

Los grupos 2 y 3 denominados sustancias imitadoras y el grupo 4 denominadas "pseudos", tienen una disponibilidad comercial, fácil adquisición, manejo y mínimas restricciones legales lo que los convierte en una opción atractiva para los manejadores y entrenadores de perros. Sus principales desventajas son el elevado costo y en el caso específico de México la complicada gestión para su importación.

Grupo 2: Contiene uno de los subproductos más importantes de la descomposición de la sustancia; por ejemplo, el metil benzoato es el subproducto de la descomposición isotérmica de la cocaína (benzoilmetilecgonina), este compuesto no tiene restricciones legales, ni efectos psicoactivos o tóxicos, además de ser de bajo costo; las marcas que se encuentran dentro de este grupo son los productos para entrenamiento canino de la empresa Sigma Aldrich® (Cuadro 3) [73, 74, 75].

Grupo 3, Contiene uno de los elementos aditivos de las sustancias ofrecidas a la venta de manera ilegal (adulterantes, sustancias de corte, diluentes, etc.) estos productos se encuentran en diversos materiales de uso común, por lo que el resultado en el condicionamiento es la generación de respuestas falsas en los perros condicionados [28].

Grupo 4 o pseudo es un "químico alternativo o sustituto", a diferencia de un imitador tipo 1, 2 o 3, el imitador Tipo 4 es a menudo un compuesto protegido por una patente se diseña intentando imitar "el olor" del producto o sustancia objetivo, su composición no es necesariamente un integrante directo del compuesto a detectar. En general; la bibliografía menciona que muchos de estos productos no han sido probados o evaluados de forma independiente o científica; por lo que es limitado el acceso a información de su composición, desarrollo y eficacia [76, 77, 78].

Se ha demostrado que el cono de olor integrado por COV en muestras reales como en compuestos relacionados, es muy similar, por ejemplo, existe evidencia que el metil benzoato es la firma de olor dominante del análisis del vapor sobrenadante (Vapor que reside sobre una muestra en un vial sellado) de la cocaína por lo que

los detectores biológicos muestran un comportamiento condicionado (alerta) similar ante su presencia, a continuación en la Cuadro 3 se muestra una lista de otras drogas ilícitas y sus olores dominantes [69, 76, 79].

Cuadro 3.- Compuestos del olor primario y secundario imitadores de drogas, Adaptado de Macias, 2009; Macias et. al., 2008 y Lorenzo et. al. 2003. [57, 64, 78].

Sustancia	Fase gaseosa identificada	Olor primario	Olor secundario
Cocaína	Metil benzoato Ácido Benzoico	Metil benzoato	Ácido benzoico
Heroína	Ácido Acético	Ácido Acético	
Marihuana	Hidrocarburos poli cíclicos aromáticos	α -pineno; β -pineno; mircenol; limoneno; y, en muchos casos, β -cariofileno	

Las fuentes odoríferas de adiestramiento contienen uno o varios COV's de las sustancias que se pretenden localizar, su composición es acorde a una necesidad denominada "especialidad" (drogas, explosivos, cadáveres, etc.), los productos existentes se componen de acuerdo al criterio del fabricante o equipo técnico que colabora en el diseño de los formulados [78], existiendo en el mercado productos elaborados a partir de la obtención de los COV's de drogas reales o de "imitaciones olorosas" de cada sustancia, cuya condición más importante es el significado del estímulo emanado para el olfato del perro [57, 61], por lo que técnicamente es viable el uso de drogas reales; siempre y cuando no exista incorporación orgánica por ninguna vía de administración; sin embargo; los riesgos a la salud y de la potencial presencia de una multitud de contaminantes ajenos a la sustancia que se pretende condicionar representan riesgos y/o factores de error durante el proceso de condicionamiento; y por otro lado existe una responsabilidad legal por la posesión en cualquiera de sus modalidades [66, 79, 72].

Una Say es en esencia un "perfume" constituido principalmente por una mezcla de sustancias odorantes que genéricamente son denominamos esencias, combinadas con disolventes y fijadores; siendo estos últimos los que permiten que el tiempo de

volatilización se extienda y por tanto resulte más duradero; por lo que se requiere del diseño de “perfumes” u odorantes que contengan el o los olores primarios o secundarios (Cuadro 3) de las drogas que se mencionan; cuyo comportamiento odorífero permita que las formulaciones de olores remplazados coincidan con el impacto odorífero de los compuestos clave de la droga que se intenta “imitar” [70, 80].

Un primer objetivo del presente trabajo fue realizar formulaciones de las esencias de cocaína, heroína y marihuana (Cuadro 3) sobre una matriz formando un odorante sólido con fragancia persistente buscando la liberación proporcional inmediata y el sostenimiento de emanación odorífera posterior, hasta alcanzar el equilibrio en el medio en el que se encuentre [80]. Por lo que los diseños de estos compuestos estarán integrados por las sustancias que emanan una fracción característica de la “firma odorífera” de las drogas objetivo y una matriz o excipiente sólido que conserve y condicione la liberación del olor, siendo medular esta última parte en las primeras fases del presente trabajo, con el fin de seleccionar un excipiente con presión de vapor baja, alta capacidad de absorción y retención de COV’s [82].

5.0.- Diseño del sistema odorífero integral (SOI)

En el presente trabajo se incluyeron los olores imitadores de cocaína, heroína y marihuana en presentaciones de cada sustancia problema con la concentración suficiente para alcanzar el umbral del estímulo olfativo, evaluando la capacidad de moldear el condicionamiento mediante la presentación simultánea de los olores (generalización), y asegurar la ausencia de conductas condicionadas por la emanación de olor del excipiente [69], con la posibilidad de reducir el tiempo de adiestramiento, e incrementar la eficiencia, eliminando factores de error por la presencia de componentes ajenos a la “firma odorífera”, eliminando los riesgos de salud y legales, por lo que un objetivo complementario de este trabajo es el diseño de “matrices específicas” cuya principal función es permitir la emanación de un estímulo odorífero nítido, constante e inconfundible, cuyas características

principales son la conservación de las sustancias odorantes, control de liberación del olor, los enfoques actuales para resolver este problema están dirigidos a la elección de materiales adsorbentes inespecíficos como lo son la sílica, derivados de celulosa, polímeros inespecíficos, polipropileno, principalmente, solos o combinados [82, 83, 84], cualidad que permite en algunos casos el diseño de productos con olores compuestos [69, 85]. La propuesta del presente trabajo es el diseño mediante tecnología de impronta molecular, con liberación mixta, es decir, una desorción parcial inmediata, seguida de una prolongada de sostén hasta alcanzar el equilibrio que permita un estímulo constante [25].

6.0.- Polímeros de impronta molecular (MIP's)

La tecnología del diseño de MIP's se basa en la confección de preparados para el reconocimiento selectivo de un sustrato, se lleva a cabo compartiendo una geometría dimensional, estructural o incluso una correspondencia electrostática con una estabilidad dependiente de grupos funcionales mediante el diseño de una matriz polimérica a partir de una molécula denominada horma, molde o plantilla; su diseño está basado en los modelos de funcionamiento de los sistemas biológicos de los seres vivos con relación al reconocimiento molecular selectivo como lo son la relación antígeno-anticuerpo (Ag/Ac), enzima-sustrato, hormona-receptor; cuya relación molecular se da por su especificidad geométrica o eléctrica; otro ejemplo con cierta similitud es la huella que produce la inclusión de un organismo en un sedimento antes de su desintegración, dando lugar a un fósil paleontológico [9, 86, 87].

Los MIP se obtienen mediante la síntesis de una estructura macromolecular de alto entrecruzamiento por polimerización en torno de una molécula plantilla que al extraerla genera la existencia de cavidades compatibles dimensional y estructuralmente; así como; por la distribución de grupos funcionales; lo que hace posible un reconocimiento selectivo; esto se da debido a que moléculas con mayor peso molecular no son capaces de incorporarse en estos espacios y las de menor

masa atómica no cuentan con las características geométricas de la molécula plantilla que permita su interacción, por lo que la interacción entre el MIP y la molécula plantilla se encuentran en condiciones de interacción óptima, generalmente de carácter reversible debido a que el diseño más usual es mediante relaciones no covalentes, donde la molécula a imprimir funge como un complemento de uno o varios monómeros funcionales a través de relaciones electrostáticas no covalentes, por lo tanto reversibles, generalmente mediante una relación entre dipolos, electrostática, o enlace de hidrógeno, etc. [88, 89], interactuando con monómeros funcionales a manera de una estructura preorganizada, a la cual se expone a un entrecruzador y un iniciador de la polimerización, formando estructuras por la relación entre radicales libres, de tal manera que el resultado de retirar la molécula plantilla mediante lavados específicos es la permanencia de espacios o poros definidos para la molécula utilizada; conociendo la capacidad máxima de retención y mediante procedimientos específicos conocer con elevada confiabilidad y precisión el comportamiento de desorción; el principal parámetro que describe la eficacia del proceso de impronta se llama factor de impresión; que se define como una relación de la capacidad de unión de la plantilla en el polímero impreso con respecto a la capacidad de unión de la plantilla en el polímero de referencia no improntado. Por lo tanto, la síntesis del polímero no improntado tiene que llevarse a cabo en las mismas condiciones omitiendo la adición de la molécula horma [90]. Como se comentó anteriormente los MIP cuentan con uniones preferentemente reversibles, elevada afinidad y especificidad por la molécula plantilla [91, 92]; otras ventajas que ofrecen los MIP son su elevada estabilidad química que permite una vida media prolongada, capacidad de reutilización, síntesis relativamente sencilla, reproducible y económica [93].

Los polímeros de impronta molecular han demostrado ser un método poderoso de separación de especies y catálisis [86]; si bien su selectividad y especificidad son características que identifican esta técnica, también cuentan con excelente

versatilidad, robustez, resistencia y estabilidad a cambios físicos (temperatura y presión), en general son químicamente inertes a ácidos, bases, iones metálicos y disolventes orgánicos; otro beneficio es su bajo costo. Los MIP son compuestos sólidos que se pueden diseñar en forma de partículas molidas, partículas esféricas regulares, nanopartículas, monolitos en una columna de acero inoxidable o en capilar, capas tubulares abiertas en capilares, capas delgadas unidas a la superficie y membranas por lo que son un instrumento muy valioso en el área del análisis químico, aplicaciones para el cuidado ambiental, diseño de productos farmacológicos y de la salud. Constituyéndose en una herramienta útil para la identificación, recolección o control de liberación de sustancias específicas como proteínas, derivados de aminoácidos, azúcares y otros derivados, vitaminas, nucleótidos; en relación a contaminantes ambientales, pesticidas; respecto a productos farmacéuticos se cuenta con MIP's se han diseñado presentaciones de liberación controlada de teofilina, morfina, diclofenaco, ciprofoxacina, ibuprofeno diazepam, naproxeno, cortisol, pentamidina, butilparabenos. a continuación, se dará una breve reseña de estas aplicaciones y se hará énfasis en su uso como preconcentradores de muestras cualidad útil para el objeto de este invento [94, 95].

6.1.- Utilidades de los Polímeros de impronta molecular (MIP's)

Sensores: Se han desarrollado tecnologías selectivas de identificación cuantitativa y cualitativa de compuestos de interés medioambiental como pesticidas, hormonas, antimicrobianos y químicos contaminantes, incluso con una sensibilidad mayor a la establecida por las normas establecidas.

En ciencias forenses se han utilizado para coleccionar trazas de sustancias ilícitas en los entornos en donde se cometió algún crimen con el fin de determinar si el delito está vinculado al uso o tráfico de drogas [96, 97], principalmente como agentes adsorbentes enfocados a la detección de trazas de metil benzoato principal compuesto resultado de la degradación de la cocaína en fluidos orgánicos, mediante un MIP luminiscente; también existen propuestas para el diseño de MIP con cristales

de cuarzo para la detección de marihuana dado el contenido de terpenos que contiene el espacio de cabeza de esta sustancia de abuso [98]. A pesar de estos antecedentes a la fecha no se ha reportado el uso de polímeros de impronta molecular como sistemas de liberación de olores.

Catalizadores: Se han utilizado como catalizadores en diversas reacciones químicas imitando a las enzimas, utilizando como molécula molde un análogo estructural del estado de transición o intermedio de una reacción química, mostrando un efecto catalítico análogo al de las enzimas [99].

Formas farmacéuticas de liberación modificada de fármacos: En los últimos años se han enfocado los esfuerzos de la investigación a la utilización de los MIP's como controladores de la liberación de principios activos; cuyos objetivos son asegurar que el fármaco llegue al lugar, en la dosis y lapso de tiempo correctos. Los MIP's tienen las cualidades fisicoquímicas para resistir los diferentes compartimentos orgánicos, sus limitaciones están vinculadas con la solubilidad y compatibilidad orgánica, dentro de ellas están las limitaciones por la presencia de puentes de hidrogeno en su estructura y su predisposición a las interacciones electrostáticas con el agua, reduciendo la afinidad por el analito, se han utilizado en el control de liberación de nicotina en parches transdérmicos y así como en la investigación en formas farmacéuticas de presentaciones de insulina de liberación controlada [59, 95].

Cromatografía: Esta es una de las principales actividades vinculadas con los MIP's especialmente en la técnica de extracción de fase sólida (SPE) la técnica cromatográfica en donde más se ha investigado y desarrollado; al respecto existe una técnica específica de estos compuestos denominada MISPE (Molecularly Imprinted Solid Phase Extraction), usando los MIP's como fase estacionaria para la adsorción, preconcentración y purificación de compuestos, especialmente importante en la extracción, diseñada para el análisis de mezclas complejas que

requieren un tratamiento complejo previo. Otra técnica en donde se han ocupado MIP's es HPLC [9].

Pre concentradores: Usando los MIP's en la fase de análisis que requiere de la extracción y purificación del analito problema; en ocasiones esta es la parte más complicada del análisis por lo que es esencial el diseño de MIP's altamente selectivos que recolecten el analito a detectar, en fechas recientes se han desarrollado técnicas para la detección de trazas contaminantes como hormonas, fármacos, especialmente antimicrobianos, analgésicos, pesticidas, iones e inclusive metales pesados cuya residualidad tienen un impacto en diversos tipos de entornos e incluso aplicado en organismos que presentan concentraciones que ponen en riesgo la salud, reteniendo el tóxico y eliminándolo del plasma o por excreción urinaria [9].

Se ha encontrado que los MIP pueden ser agentes adsorbentes de sustancias en fase gaseosa y líquida; incluso se han utilizado con fines de control de la calidad del aire, detección de sustancias psicotrópicas, explosivas o agentes utilizadas en la guerra; también se han utilizado para el diseño de filtros con alta especificidad de alcoholes y ácidos grasos denominados MIFA; mediante capas de MIP's para la discriminación de olores mediante la combinación de un adsorbente (polidimetilsiloxano) combinado con ácido poliacrílico (PAA) y ácido metacrílico (MAA) [96, 97]. Su selectividad y relación no covalente entre un MIP y la molécula molde motivó el diseño de MIP's que permitieran a una molécula plantilla presentar un comportamiento de liberación de COV similar a la emanación de la firma odorífera de cocaína (metil benzoato), heroína (ácido acético) y marihuana, adicionando al bajo costo y resistencia a los factores del medio ambiente, posibilidad de rehusó y garantía en la calidad de estímulo olfativo [64, 78].

7.-Hipotesis y Objetivos

7.1.- Hipótesis:

Si se diseñan Polímeros de Impronta Molecular capaces de controlar la desorción de los COV propios de las firmas odoríferas de narcóticos (cocaína, heroína y marihuana), permitirá el aprovechamiento zootécnico de perros detectores de drogas mediante su adiestramiento y mantenimiento en condiciones de campo.

7.2.- Objetivo General

Desarrollar un Sistema Odorífero Imitador (SOI) mediante Polímeros de Impronta Molecular que controlen la desorción de COV característicos de las firmas odoríferas de narcóticos para el aprovechamiento zootécnico de perros detectores de drogas con insumos inocuos y eficaces.

7.3.- Objetivos Específicos

1. Identificar los COV's característicos de las firmas odoríferas de narcóticos (cocaína, heroína, marihuana) que faciliten el adiestramiento y mantenimiento de perros detectores.
2. Seleccionar los componentes para el diseño de Polímeros de Impronta Molecular capaces de adsorber y desorber los vapores sobrenadantes de narcóticos.
3. Determinar en un modelo biológico (ratas) las cualidades odoríferas para el condicionamiento conductual.
4. Determinar en un modelo biológico (ratas) las cualidades atóxicas de los formulados propuestos.
5. Evaluar en grupos de perros no adiestrados y adiestrados con Say diferentes a las propuestas, la respuesta condicionada ante la presencia de los compuestos propuestos (SOI).

7.4.- Justificación

Siendo la industria química internacional la principal productora de los insumos con mejores cualidades odoríferas; ocasiona que México dependa principalmente de tecnología extranjera para disponer de estos insumos; lo que entorpece y encarece la formación y mantenimiento de los caninos detectores utilizados en los diferentes niveles de gobierno e iniciativa privada, representando una seria deficiencia de recursos para la tarea de búsqueda y localización de drogas de abuso, actividad importante para la seguridad.

8.0.- Material y métodos (Figura 5)

- 1) Investigación y recopilación de información del diseño y manufactura de sustancias similares a los propuestos en el presente trabajo; así como de los reactivos y sustancias utilizadas para su manufactura, con énfasis en la determinación de las cualidades de los excipientes potencialmente útiles.
- 2) Caracterización de formulaciones determinando su viabilidad mediante pruebas de carga odorífera, comportamiento de liberación de odorante, estabilidad. Aplicando el análisis del vapor sobrenadante contenido en una matriz [100], haciendo uso de la tecnología de caracterización de la fracción volátil mediante tecnologías útiles para el desarrollo del presente trabajo.
- 3) Evaluar en un modelo biológico la inocuidad y la eficacia de los odorantes desorbidos para el condicionamiento de los compuestos propuesta.
- 4) Comparar en la especie blanco la inocuidad y respuesta inducida por los odorantes emanados.

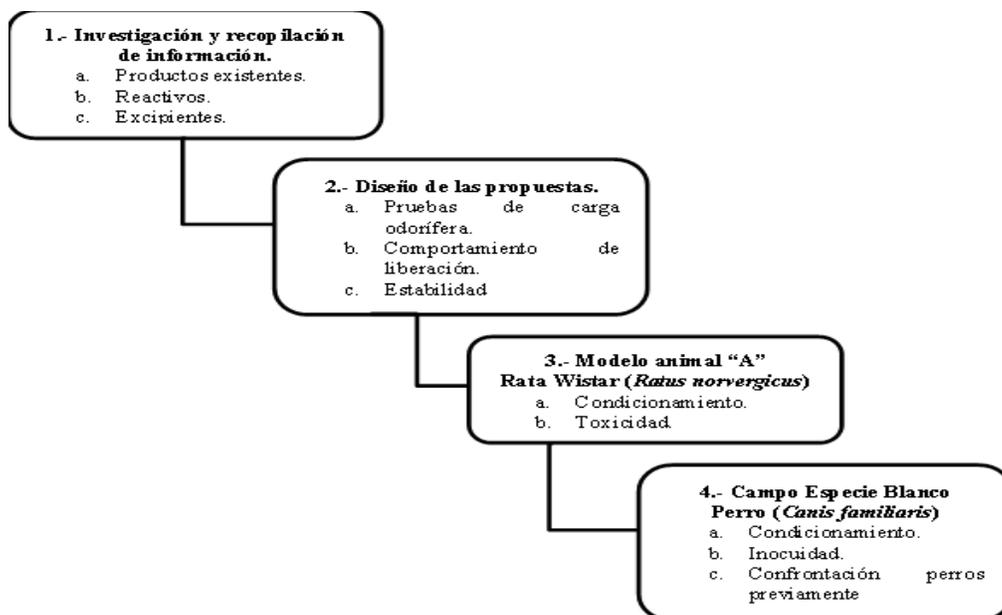


Figura 5.- Metodología del ensayo: Fases que integraron el diseño y caracterización de los Sistemas Imitadores de Olor (SOI) de cocaína, heroína y marihuana.

Para los SOI cocaína y heroína, se sintetizaron dos polímeros impresión molecular, uno para cada sistema odorífero imitador (SOI):

8.1.- Reactivos y equipos

Ácido acetilsalicílico (AAS) 90%, 5200-500, Reactivos Química Meyer® , 4-vinilpiridina (4-VP) al 97%, Thermo Fisher Scientific®, Dimetilacrilato de etilenglicol (EGDMA) al 98%, Sigma-Aldrich®, Gel de sílice 60 para Cromatografía Merck®, Acrilamida (AA) al 98% Thermo Fisher Scientific®, Azobisisobutironitrilo (AIBN) al 98% Marca Sigma-Aldrich®, Metil benzoato (MB) al 99% Marca Alfa Aesar, Ácido acético glacial (CH_3COOH) 99.7% Thermo Fisher Scientific®, Acetona 99.5%, Marca Carl Roth®, Etanol (EtOH) 99.91%, J.T. Baker®, Ácido fosfórico 65%, Reactivos Química Meyer®, Metanol (MeOH) grado QP, Merck Millipore®, CBD Isolate (Cannabidiol) 97.87%, tetrahidrocannabinol por debajo del 0.2% ICAN VETS® de la empresa ICAN GREEN S.A. de C.V., Silica Gel 60, Merck, para Cromatografía, 0.063 – 0.2 mm.

8.2.- Propiedades de los compuestos usados

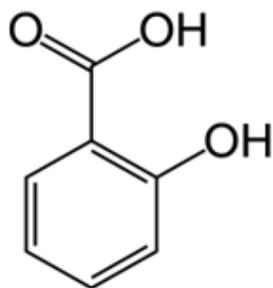
Los compuestos responsables de la desorción de los COV's que integran el estímulo odorífero son el metil benzoato (Cocaína), ácido acetyl salicílico y ácido acético (Heroína) incluidos cada uno en una estructura polimérica específica y α -pineno; β -pineno; mirceno; limoneno y β -cariofileno contenido en CBD amplio espectro 97.8% de pureza, THC 0.05%, ICANVETS, lote JMT0006339 incluido en silica gel 60, son los compuestos que tienen contacto directo con los perros destinados al adiestramiento y del personal responsable del manejo de los animales; el resto de los componentes que se mencionan a continuación se utilizan para la formación de los polímeros o la inclusión de las moléculas improntadas; por lo que los riesgos de contacto desaparecen; sin embargo a continuación se mencionan las cualidades de todos los compuestos utilizados en el diseño.

8.2.1.- Ácido acetilsalicílico (Número CAS: 50-78-2) [103]

Otros nombres: AAS, Ester salicílico del ácido acético, Acidum acetylsalicylicum, Ácido -2-(acetilhidroxi) benzoico.

Formula: $C_9H_8O_4$

Se usa en el tratamiento de condiciones inflamatorias diversas, también tiene efectos antitrombóticos útiles para la prevención de infarto y ataques transitorios de isquemia, también reduce el riesgo de cáncer de colon por sus efectos antiproliferativas (igb.es/cbasicas/farma/farma04/a015.htm).



Nombre IUPAC: Ester salicílico del ácido acético

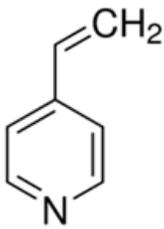
Solubilidad y miscibilidad con agua a 20 °C: 3,3 g/l

Toxicidad aguda: no; Corrosión/irritaciones cutáneas: Sí; Lesiones oculares graves/irritación ocular: Sí; Sensibilización respiratoria o cutánea: Sí; mutagenicidad en células germinales: No; (Hoja de seguridad del ácido acetyl salicílico)

8.2.2.- 4-vinilpiridina (CAS: 100-43-6) [104]

Sinonimos: 4-VP, PVNO; Poli vinil piridina-N-óxido, PVNO

Formula: C_7H_7N



Nombre IUPAC: Poli vinil piridina-N-óxido

Toxicidad: puede causar irritación muy leve de la piel, los ojos o el sistema respiratorio en personas sensibles. No se observó sensibilización de la piel; aunque se observó que los efectos sobre la salud relacionados con este compuesto son mínimos. (Hoja de seguridad 4-vinilpiridina)

8.2.3.- Dimetilacrilato de etilenglicol (CAS: 97-90-5) [105]

Otros nombres: EGDMA, ácido metacrílico, éster de etileno; 1,2-Bis (metacrilato) etano; dimetilacrilato de 1,2-etanodiol; dimetilacrilato de diglicol; dimetilacrilato de etanodiol; dimetilacrilato de etileno; bis etilenglicol (metacrilato); Dimetilacrilato de etilenglicol; metacrilato de etileno.

Formula: $C_{10}H_{14}O_4$

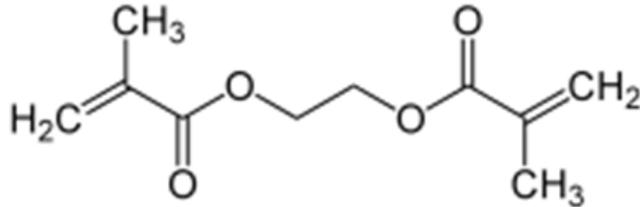
Descripción: Es un diéster formado por la reacción de condensación de dos moles de ácido metacrílico con uno de etilenglicol.

El dimetilacrilato de etilenglicol (EGDMA) es un monómero metacrílico difuncional insoluble en agua que se emplea bastante como agente de entrecruzamiento de copolímeros, sobre todo en algunos hidrogeles que se usan como lentes de contacto y materiales absorbentes.

Es una materia prima útil para la síntesis química, porque experimenta fácilmente reacciones de adición con una amplia variedad de compuestos orgánicos e inorgánicos.

El EGDMA ya se ha comentado que se utiliza como un agente entrecruzante para polímeros acrílicos o copolímeros

Estructura química:



Nombre IUPAC: 2-(2-Metil-acriloiloxi) etil 2-metil-acrilato

Toxicidad: DL50 rata: 3,300 mg/kg (RTECS),

Síntomas: Irritaciones de las mucosas en la boca, garganta, esófago y tracto estomagointestinal., Existe riesgo de aspiración al vomitar, posible obstrucción pulmonar tras aspiración del vómito. Toxicidad aguda por inhalación puede causar irritación de las mucosas, Tos, Insuficiencia respiratoria, Consecuencias posibles en las vías respiratorias, no irrita los ojos (Ficha de datos de seguridad Merck Dimetilacrilato de etilenglicol)

8.2.4.- Acrilamida (CAS: 7774-29-0) [106]

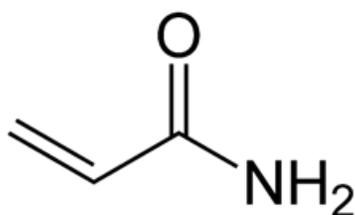
Otros nombres: Amida acrílica, etilencarboxamida, propenamida

Formula: C_3H_5NO

Descripción: Es una sustancia sólida cristalina, incolora e inodora que puede reaccionar violentamente cuando se derrite. Cuando se calienta, puede emitir vapores penetrantes. La acrilamida se usa para fabricar poliacrilamida, la cual se usa principalmente para tratar descargas de aguas residuales de plantas de tratamiento de aguas y procesos industriales. Además, la acrilamida y las poliacrilamidas se utilizan en la producción de tinturas y sustancias químicas

orgánicas, lentes de contacto, cosméticos y artículos de tocador, telas que no se arrugan, papel y textiles, en la producción de pulpa, en el procesamiento de minerales, en la refinación de azúcar, y como agente químico en la lechada y como estabilizador de suelos para la construcción de túneles, alcantarillas, pozos y embalses. La acrilamida se forma en alimentos ricos en carbohidratos cuando éstos se fríen o al asarse en la parrilla o en el horno.

Estructura química:



Nombre IUPAC: prop-2-enamide

Toxicidad: Inhalación: Puede ser nocivo si se inhala. Provoca una irritación del tracto respiratorio. Piel: Nocivo si es absorbido por la piel. Provoca irritación de la piel. Ojos: provoca irritación de ojos. Ingestión: Nocivo por ingestión (Hoja de datos de seguridad del INR: Acrilamida)

8.2.5.- Azobisisobutironitrilo (CAS: 78-67-1) [107]

Otros nombres: AIBN; 2,2'-azobis(2-metilpropionitrilo); 2,2'-azobisisobutironitrilo, genitron, aivn.

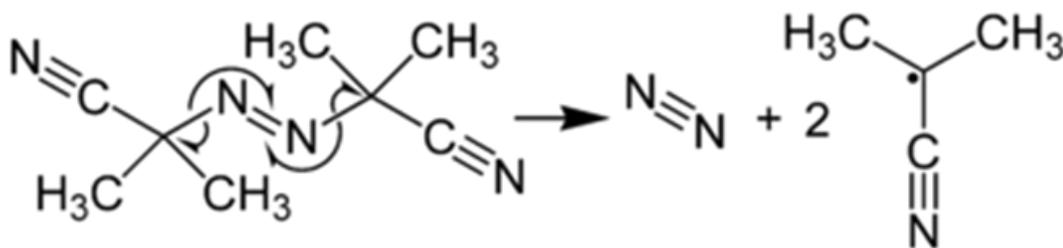
Formula: $C_8H_{12}N_4$

Descripción: A temperatura ambiente, el azobisisobutironitrilo es un sólido que suele presentarse como polvo o cristales columnados de color blanco. <https://es.wikipedia.org/wiki/Azobisisobutironitrilo> - cite_note-ChemBook-4 A 102 °C funde y se descompone, desprendiendo nitrógeno y otros nitrilos. Tiene

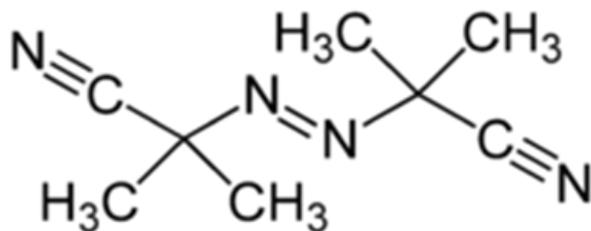
una densidad mayor que la del agua, $\rho=1,110 \text{ g/cm}^3$. Es prácticamente insoluble en agua pero soluble en la mayor parte de los disolventes orgánicos como alcoholes, acetona, éter y anilina; su solubilidad en metanol es de 50 g/L y en etanol 20 g/L.

El azobisisobutironitrilo se descompone lentamente a temperatura ambiente, por lo que debe ser almacenado a una temperatura inferior a 10°C . Es explosivo si se mezcla con oxidantes e igualmente explosiona cuando se calienta con heptano o acetona.

Es un excelente iniciador de radicales libres, pues a unos 70°C el nitrógeno es liberado y se forman dos radicales 2-cianoprop-2-il de acuerdo al siguiente esquema:



Estructura química:



Nombre IUPAC: 2-(2-cianopropan-2-ildiazenil)-2-metilpropanonitrilo

Solubilidad: en agua 0.3 g/L, metanol 50 g/L

Toxicidad:

El azobisisobutironitrilo es un compuesto inflamable que puede arder fácilmente si entra en contacto con chispas o flama. Arde de forma intensa y persistente y, durante su combustión, puede generar óxidos tóxicos de nitrógeno. El polvo de esta sustancia puede formar una mezcla explosiva con el aire. Su descomposición también puede provocar una explosión o fuego. El azobisisobutironitrilo alcanza su temperatura de autoignición a 260 °C.

En cuanto a su toxicidad, es muy peligroso en caso de contacto con piel, ojos y pulmones debido a su efecto irritante. La inflamación de la piel se caracteriza por picazón, descamación, enrojecimiento y, ocasionalmente, ampollas. La sobreexposición severa puede causar la muerte. En organismos vivos, se metaboliza en ácido cianhídrico en la sangre, hígado, cerebro y otros tejidos de animales (<https://es.wikipedia.org/wiki/Azobisisobutironitrilo>)

8.2.6.- Metil benzoato (CAS: 93-58-3) [108]

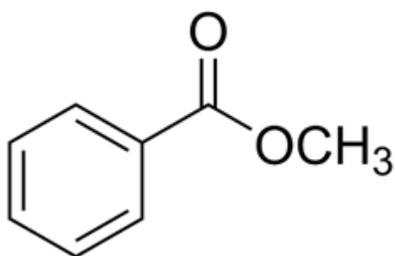
Otros nombres: Benzoato de metilo, Ester metílico del ácido benzoico, Esencia de niobe

Formula: $C_9H_{10}O_2$

Descripción: Es el éster formado por la condensación de ácido benzoico y el etanol. Es un líquido incoloro que es parcialmente soluble en agua, pero miscible en solventes orgánicos.

Como con muchos ésteres volátiles, el benzoato de etilo tiene un olor agradable descrito como dulce, gaulteria, frutal, medicinal, cereza, y uva. Es un componente de algunas fragancias y sabores de fruta artificial. Compuesto utilizado con frecuencia en perfumería y pesticidas por su olor agradable.

Estructura química:



Nombre IUPAC: Benzoato de metilo

Solubilidad: En agua a 30°C 0.157 g/L

Toxicidad: Toxicidad oral aguda DL50 Rata: 1.625 - 2.000 mg/kg, síntomas son trastornos del estómago/intestinales, Náusea, Vómitos; no irrita la piel (Ficha datos de seguridad Merck Metil benzoato)

8.2.7.- Ácido acético (CAS: 64-19-7) [109]

Otros nombres: Ácido metilcarboxílico o ácido etanoico

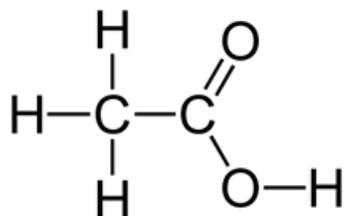
Formula: $C_2H_4O_2$

Descripción: Se usa en apicultura, se utiliza para el control de las larvas y huevos de las polillas, en la industria química van muy ligadas a sus ésteres, como son el acetato de vinilo o el acetato de celulosa (base para la fabricación de nylon, rayón, celofán, etcétera).

Son ampliamente conocidas sus propiedades como mordiente en soluciones fijadoras, para la preservación de tejidos, en el revelado de fotografías en blanco y negro, era utilizado en una solución muy débil como "baño de paro": al sumergirse en él material revelado, se neutralizaba la alcalinidad del baño revelador y se detenía el proceso; posteriormente el baño fijador eliminaba el resto de material no revelado. También se usa en medicina como tinte en las colposcopias para detectar la infección por virus de papiloma humano, cuando el tejido del cérvix se tiñe de blanco con el ácido acético es positivo para infección de virus de papiloma humano,

a esta tinción se le conoce como aceto blanco positivo. También, mezclado con alcohol, es útil para la prevención de otitis externa; sirve en la limpieza de manchas en general y en radiología en las procesadoras de revelado de placas radiográficas.

Estructura química:



Nombre IUPAC: ácido etanoico

Toxicidad: Oral (LD-50) 3310 mg/kg (rata), Dermal (LD-50) 1060 mg/kg (conejos), Inhalación (LC-50) 5620 ppm /1h (ratones), 16000 ppm/4h (rata).

Inhalación: Irritaciones en vías respiratorias. Puede provocar bronconeumonía, edemas en el tracto respiratorio. Piel: Provocar quemaduras. Ojos: quemaduras, trastornos de visión, ceguera (lesión irreversible del nervio óptico). Quemaduras en mucosas. Ingestión: Quemaduras en esófago y estómago. espasmos, vómitos, dificultades respiratorias. Riesgo de perforación intestinal y de esófago. Riesgo de aspiración al vomitar. No se descarta: shock, paro cardiovascular, acidosis, problemas renales a las dosis anteriormente citadas (Hoja de datos de seguridad del INR)

8.2.8.- Acetona (CAS: 67-64-1) [110]

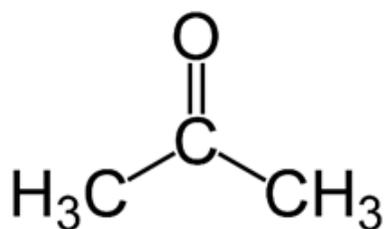
Otros nombres: 2- Propanona, Acetona, Dimetil acetona, DMK, Propano cetona.

Formula: CH_3COCH_3

Descripción: Toxicidad agua: Peligroso para la vida acuática aun en condiciones bajas. Mortal para peces.

Corrosión/irritación cutánea, lesiones oculares graves e irritación ocular, sensibilización respiratoria, mutagenicidad en células germinales en bacterias y levaduras, carcinogenicidad no clasificable en humanos ni animales, toxicidad para la reproducción, toxicidad sistémica específica de órganos diana, peligro por aspiración en vías de exposición, piel mucosa oral y respiratoria con efectos inmediatos.

Estructura química:



Nombre IUPAC: Propanona

Toxicidad: Oral (LD-50) 5800 mg/Kg (rata), Dermal (LD-50) 20 mg/Kg (conejo), Inhalación (LC-50) 76 mg/L (rata) (Hoja de seguridad Acetona MSDS)

8.2.9.- Etanol (CAS: 64-17-5) [111]

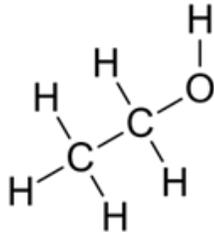
Otros nombres: Alcohol anhidro, Metil carbinol, Alcohol Desnaturalizado

Formula: $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$

Descripción: Disolvente para resinas, grasa, aceites, ácidos grasos, hidrocarburos, hidróxidos alcalinos. Como medio de extracción por solventes, fabricación de intermedios, derivados orgánicos, colorantes, drogas sintéticas, elastómeros,

detergentes, soluciones para limpieza, revestimientos, cosméticos, anticongelante, antisépticos, medicina.

Estructura química:



Nombre IUPAC: Etanol

Toxicidad:

Inhalación: Altas concentraciones del vapor pueden causar somnolencia, tos, irritación de los ojos y el tracto respiratorio, dolor de cabeza y síntomas similares a la ingestión.

Ingestión: Sensación de quemadura. Actúa al principio como estimulante seguido de depresión, dolor de cabeza, visión borrosa, somnolencia e inconsciencia. Grandes cantidades afectan el aparato gastrointestinal. Si es desnaturalizado con metanol, puede causar ceguera.

Piel: Lavar la piel con abundante agua. Retirar la ropa contaminada y lávela con abundante agua y jabón.

Ojos: Lavar con abundante agua, mínimo durante 15 minutos. Levantar y separar los párpados para asegurar la remoción del químico. Si la irritación persiste repetir el lavado. Buscar atención médica.

DL50 (oral, ratas) = 7.06 g/kg (Hoja de seguridad Acetona MSDS)

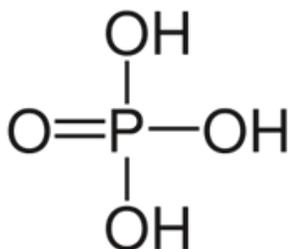
8.2.10.- Ácido fosfórico (CAS: 7664-38-2) [112]

Otros nombres: Acido ortofosfórico, Ácido fosfórico blanco, Acido monofosfórico

Formula: H_3PO_4

Descripción: Fertilizantes, detergentes de polifosfatos, químicos farmacéuticos, carbón activado, cerámicas, aditivos para comidas, procesamiento de comidas, tratamiento de aguas, limpieza de metales.

Estructura química:



Nombre IUPAC: Ácido tetraoxofosfórico

Toxicidad:

Inhalación: Los vapores son corrosivos; pueden causar problemas severos en la garganta y los pulmones.

Ingestión: Quemaduras en la boca, garganta y estómago. En caso severo, diarrea con sangre, dificultad respiratoria, colapso, shock e incluso la muerte.

Piel: Es corrosivo. Puede causar severas quemaduras.

Ojos: Es corrosivo y puede causar daños permanentes e irreversibles.

Efectos crónicos: Se ha reportado dermatitis (Hoja de seguridad Ácido fosfórico MSDS).

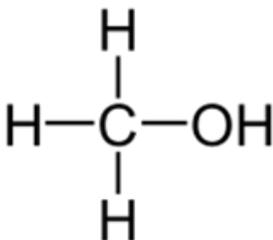
8.2.11.- Metanol (CAS: 67-56-1) [113]

Otros nombres: Carbinol, Alcohol metílico, Alcohol de madera, Hidrato metílico, Monohidroximetano, Alcohol o Espíritu de madera

Formula: CH_4O

Descripción: Solvente, combustible, plastificante, reactivo de laboratorio, extracción de aceites vegetales y animales, anticongelante, elevador de octano, manufactura de productos químicos y farmacéuticos, agente de extracción, producción de formaldehído, monometil, dimetilamina, sulfato dimetílico, matil antraquinona y metil ésteres, desnaturalización de etanol, deshidratación de gas natural, en la producción de pinturas, barnices, cementos, tintas.

Estructura química:



Nombre IUPAC: Metanol

Toxicidad: El envenenamiento puede efectuarse por ingestión, inhalación o absorción cutánea. Y se debe, posiblemente, a su oxidación a ácido fórmico o formaldehído, esta oxidación se sabe que puede ser inhibida por etanol, pues el etanol es metabolizado de manera muy específica y desintoxica al organismo de metanol por medio de la respiración. Después de la muerte, el efecto más grave de este producto, es la ceguera permanente.

Oral (LD-50) 5628 mg/kg, Dermal (LD-50) 64000 ppm/4h, Inhalativa (LC-50) 15800 mg/kg (Referencia: Hoja de seguridad metanol MSDS).

8.2.12.- CBD Amplio Espectro (10G) Lote JMT0006339.

Análisis del perfil de compuestos volátiles de una muestra de 10 gramos de CBD de amplio espectro, sólido con características de granulado, contenido en un envase solido de color negro con la etiqueta:

La documentación del compuesto reportó la siguiente información (Anexo I):

Denominación de la muestra: 104.2 After Roto

Tipo de Prueba: Destilado (Sample Type: Distillate)

Lab. ID: 1911132

Fecha de recepción: diciembre 12 2019

Fecha de análisis: diciembre 13 2019

Total (%): THC LOQ

Total (%): CBD 97.87

8.3.- Equipo de laboratorio

Multiagitador IKA modelo RO5PS1, centrifuga Gilson GMC Lab modelo F Moledora Cole Palmer. Espectrofotómetro UV/visible Ocean optics DT-mini 2GS. Termo agitador Biobase modelo BJPX-1008.

8.4.- Equipo condicionamiento

Bebedero para ratas (SDRD) de diseño propio, consistente en un soporte de madera para bebedero cuenta con un bajo relieve circular de 2 mm de profundidad que permite el alojamiento de los sobres conteniendo los SOI's de cada olor y un orificio en medio de donde sale el tubo de acero que suministra el agua del bebedero que contiene como fuente de hidratación enriquecida con sacarina sódica a una concentración de 0,005 M (Figura 6), exponiendo simultáneamente los olores para el condicionamiento y el reforzador [62].

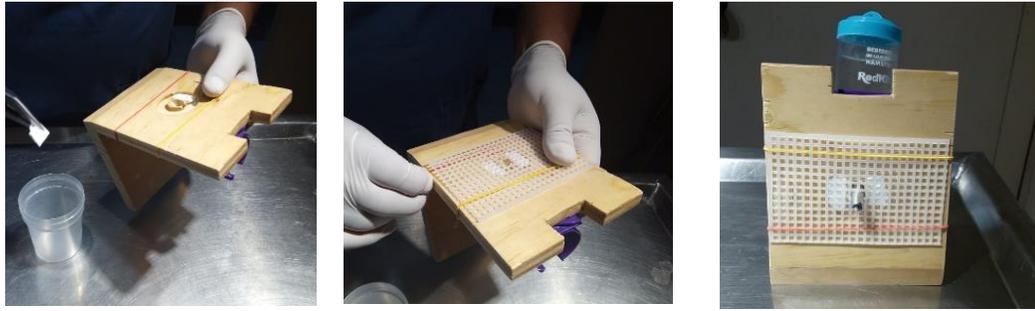


Figura 6.-Bebedero para ratas (SDRD) especialmente diseñado para exponer los olores durante el condicionamiento. Diseño del autor.

Pelota de bote irregular manufacturada en caucho (JBB) (Figura 7) [7, 101].



Figura 7.-Pelota de bote irregular manufacturada en caucho (JBB)

Cajas de condicionamiento odorífero (CCO) manufacturadas en MDF (Medium density fibreboard), madera y plástico rígido, todas con un orificio en una cara de 10 cm de diámetro (Figura 8).



Figura 8.-Cajas de condicionamiento odorífero (CCO) manufacturadas en MDF, madera y plástico rígido, con un orificio en una cara de 10 cm de diámetro.

8.5.- Revisión ética:

El estudio fue revisado y aprobado por el subcomité institucional para el cuidado y uso de animales experimentales de la Universidad Nacional Autónoma de México (SICUAE.DC-2019/1-3).

8.6.- Método de polimerización

Se diseñaron dos polímeros de impronta molecular (MIP), uno con base en el monómero 4-vinil piridina, para el control de la desorción de metilbenzoato con el fin de imitar los “espacios de cabeza” de cocaína, otro usando la acrilamida como monómero para el control de la desorción de ácido acético por ser uno de los principales componentes del “espacio de cabeza” de la heroína; validando y caracterizando la desorción de ambos compuestos, confrontando su comportamiento contra los obtenidos de una silica impregnada con los mismos compuestos, con el fin de determinar las diferencias entre un material específico (MIP) y un adsorbente inespecífico [114, 115].

El método de síntesis de MIP se llevó a cabo por radicales libres, usando la estequiometría de monómero, entrecruzador y horma para adsorber metil benzoato: 4:20:1 denominado MIP_{4-VP} (SOI_c) para adsorber ácido acetilsalicílico 3:15:0.5 para el denominado MIP_{AA}, (SOI_h) mediante la siguiente reacción (Figura 9) [116].

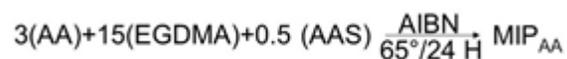
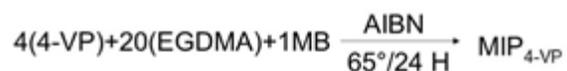




Figura 9.-Reacción de polimerización para el diseño de MIP's imitadores del olor de cocaína y heroína. Adaptado [116, 131]

MB: Metilbenzoato; AAS: Ácido acetilsalicílico; 4-VP: 4-vinilpiridina; AA: Acrilamida; EGDMA: Dimetilacrilato de etilenglicol; AIBN: azobisisobutirinitrilo [116, 117, 119].

8.6.1.- Polimerización

La relación del monómero-entrecruzador-horma utilizada fue 4:20:1, proporción más utilizada en el diseño de MIP's. La horma es quien genera el poro dentro de las cavidades, una vez extraída la horma se espera que permanezca el poro en la matriz polimérica (Figura 17), el monómero se coloca en exceso respecto a la horma para asegurar las interacciones, el entrecruzador se coloca en una alta proporción ya que forma la mayor parte del cuerpo del polímero [116].

Se disuelve el monómero, entrecruzador, plantilla e iniciador de la polimerización en recipiente resistente a temperaturas mayores a 70°C, conforme al esquema 1

Se cubre con un tapón de rosca.

Sonicación durante un mínimo de 10 minutos.

Desoxigenación con nitrógeno durante 5 minutos.

Incubación a 65°C durante 24 horas.

8.6.2.- Molienda y tamizaje

Posterior a la incubación, se obtiene el monolito, se tritura en el molino y se lava con etanol y acetona para eliminar los residuos sin reaccionar. El polvo resultante se tamiza por una malla de 250 micras.

8.6.3.- Lavado:

SOIc

Se remueve la horma por sucesión de lavados con etanol a temperatura ambiente durante 3 horas.

La presencia de MB eliminada se monitorea mediante espectrofotometría UV a longitud de onda 273.75 nm

SOIh

Se remueve la horma en un aparato Soxhlet con una mezcla de MeOH/ CH₃COOH (7: 3, v / v) durante 48 h a 105°C.

La presencia de AAS eliminada se monitorea mediante espectrometría UV a longitud de onda 274.66 nm.

8.6.4.- Carga de la Molécula Molde:

SOIc

Solución en agua destilada de metil benzoato a 0.6µL/mL

Proporción de 9 mL de volumen de solución de metil benzoato por 20 mg de polímero durante 20 minutos a temperatura ambiente.

Con una carga máxima de 103.633mg*g⁻¹



MIP_{4-VP}: Polímero formado a base de 4 Vinilpiridina

MB: Metilbenzoato

SOIh (MIP_{AA})

La mayor parte del espacio de cabeza de heroína consiste en ácido acético, los estudios de Macias, encontraron que los perros reconocían como heroína la combinación de ácido salicílico con ácido acético, por lo que se plantea tener un sistema de liberación modificada ya que el ácido acetilsalicílico produciría ácido acético como producto de degradación y dejaría el ácido salicílico, un compuesto que también es objetivo de discriminación odorífera para perros detectores, las estructuras están mostradas en la figura 10 [63, 64].

La síntesis del polímero de impronta molecular se realizó utilizando el método de polimerización para remoción de AAS en sistemas acuosos [119].

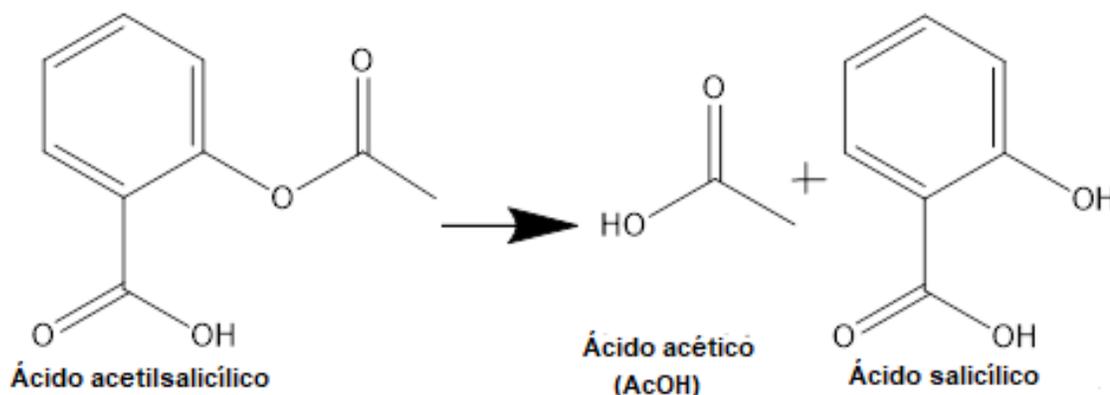


Figura 10.- Descomposición isotérmica del ácido acetilsalicílico. [119]

La carga del polímero se llevó a cabo en dos fases, debido a la capacidad de interacción similar de la molécula del ácido acético con la acrilamida y la relación ácido acetilsalicílico-acrilamida que se muestra en la figura 11.

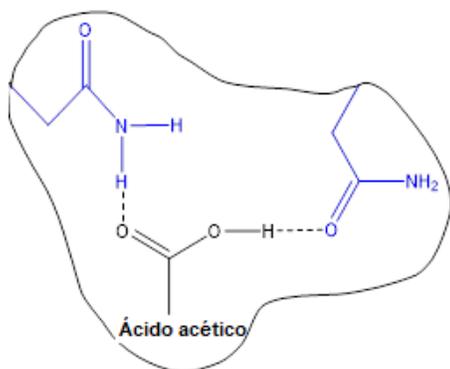


Figura 11.-Posible interacción de enlaces de hidrógeno del monómero acrilamida con ácido acético dentro de la matriz polimérica. Adaptado [116, 131].

Fase 1. Ácido acético:

Se realizó la carga del polímero a razón del 10% v/p de ácido acético, mediante una solución de acetona y ácido acético, incorporando el soluto por inmersión y posterior evaporación del solvente durante 24 horas, para alcanzar una concentración máxima del 12% y el equilibrio esquematizado a continuación



Fase 2. Ácido acetilsalicílico

Solución de ácido acetilsalicílico 1000 mg/L⁻¹ en agua destilada ajustada a pH=3 para asegurar que la mayoría de las moléculas de AAS estén protonadas en el medio. Incluyendo a una proporción de 20 mg de polímero por 9 mL de solución en movimiento constante con multiagitadores magnéticos a temperatura ambiente durante 7 horas. Concluyendo con un filtrado de la solución.

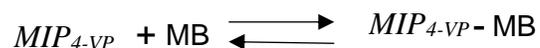


Fase 3: Mezcla

Combinación de polímeros a razón de $MIP_{AA} - CH_3COOH / MIP_{AA} - AAS$ (1:1) p/p.

8.6.5.- Caracterización del MIP imitador de Cocaína (SOIc)

La capacidad de adsorción del MIP y el NIP se realizó en un sistema acuoso en un multiagitador magnético con control de temperatura a 25°C, determinando la concentración de equilibrio a lo largo del tiempo; de acuerdo a la siguiente reacción:



Se depositaron en un vaso de precipitados muestras de 20 mg de MIP y NIP con 9 mL de una solución en agua destilada de metil benzoato a una concentración de 0.6 µL/mL durante 3 horas, se tomaron muestras de 2 mL del sobrenadante en cada tiempo y se centrifugaron durante 3 minutos a 6000 RPM, se filtraron con filtro pirinola 0.22 µm y se monitorearon los cambios a través del tiempo mediante absorbancia por espectroscopía UV visible. Para la determinación de la concentración se preparó una curva de calibración que oscilo entre 0.075 y 0.018 µL/mL a una longitud de onda de 273.75 nm y un coeficiente de determinación (r^2) >99.87 (Figura 12).

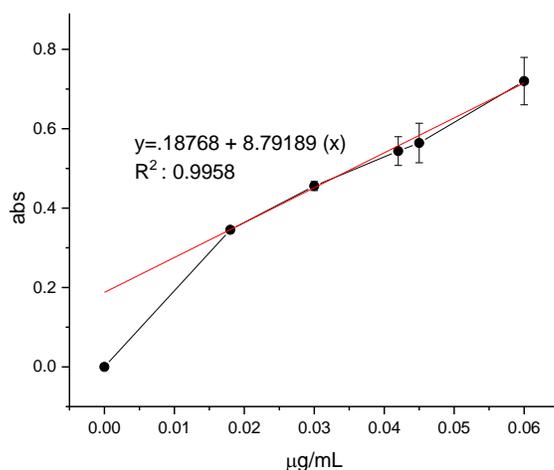


Figura 12.-Curva y espectro de calibración de soluciones de metil benzoato en agua

8.6.6.- Adsorción:

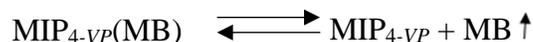
Se observó la capacidad de adsorción mediante la interpolación en la curva de calibración, interpretada como mg de soluto adsorbidos por gramo de MIP_n; determinando la concentración final de la concentración inicial de la solución conforme a la siguiente ecuación;

$$\frac{[(\text{concentración inicial} - \text{concentración a } t^n) * (\frac{1.08 \text{ mg mb}}{1 \text{ ml}}) * \text{volumen en vaso}]}{g \text{ NIP/MIP}} = \frac{mg \text{ adsorbidos}}{g \text{ MIP/NIP}}$$

Nota: El volumen se corrigió de acuerdo con el volumen que había en el tubo antes de la toma de muestra.

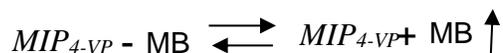
Medidos por triplicado (n = 3) a diferentes intervalos de tiempo. Las desviaciones estándar se representan como barras de error (Figura 8).

Los perfiles de adsorción de metil benzoato se llevaron a cabo utilizando una concentración inicial de metil benzoato a 0.6µL/mL en agua destilada, puesto que se encuentra cercano al límite de solubilidad lo que permite que se favorezca la interacción MIP_{4-VP}-metil benzoato, como se muestra en el siguiente equilibrio:



8.6.7.- Desorción:

Se evaluó la liberación del metil benzoato desde la matriz polimérica a través del tiempo, como se muestra en la siguiente reacción:



En el entendido que la cantidad liberada o desorbida es la diferencia que existió entre la cantidad inicial adsorbida y la cantidad adsorbida a un tiempo “n”.

Se vertió sobre el SOIc 70% de metilbenzoato con respecto al peso de la muestra de polímero disuelta en 3 partes de etanol, se dejó evaporar durante 24 horas hasta secar la matriz.

Se colocaron muestras de 40 mg de SOIc, bajo las siguientes condiciones: temperatura ambiente en envase abierto, en el cual se monitoreó la desorción de 0-9 horas el primer día y el resto cada 24 h hasta completar una semana, en refrigeración y a temperatura ambiente en envases cerrados, se evaluó la desorción durante 7 días.

Se colocó cada muestra de 40 mg de SOIc cargado, en un saco de celulosa, se introdujo en un vaso de 50 mL donde se adicionaron 20 mL de una solución metanol: agua (1:1), posteriormente se selló el vaso con parafilm y se metió en un agitador orbital a 100 rpm a temperatura ambiente, cada dos horas se tomó una muestra de 2 mL, se determinó la concentración de metilbenzoato por espectrofotometría UV y se reemplazó el medio, repitiendo el procedimiento hasta que no se detectó el sustrato.

Preparado del compuesto de cotejo: Se impregno sílice gel 60 mediante la adición de una solución de metil benzoato en acetona a una concentración similar al del MIP, se prepararon muestras para la determinación de la desorción en las mismas condiciones del MIP [82].

Con el objeto de beneficiar la interacción entre MIP-metilbenzoato se eligió una concentración cercana al límite de solubilidad (0.6µL/mL en agua destilada), la cantidad adsorbida se interpretó en mg de metil benzoato por gramo de SOIc, determinado mediante la sustracción de la concentración final de la concentración inicial de la solución, mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{[(\text{concentración inicial} - \text{concentration a } t^n) * (\frac{1.08 \text{ mg mb}}{1 \text{ ml}}) * \text{volumen en recipiente}]}{g \text{ NIP/MIP}} = \frac{\text{mg adsorbidos}}{g \text{ MIP/NIP}}$$

Con el fin de observar el comportamiento de desorción, se desarrolló un método de determinación del metilbenzoato, mediante la remoción del sustrato remanente al exponer el MIP a una solución de H₂O:Metanol (1:1) mejorando la solubilidad del sustrato, se evita por un lado una evaporación rápida de la solución y por otro la generación de pequeñas señales adicionadas a las longitudes de onda [97], durante el ensayo, se controlaron factores como la agitación, temperatura que tiene un efecto directamente proporcional con la cinética molecular y por ende la volatilización del metilbenzoato, lo que arroja resultados erróneos, también se estandarizó a tres lavados del polímero para extraerlo por completo, se calculó la cantidad adsorbida del sustrato mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{[(\sum_{i=1}^3 i) * V]}{g_{MIP}} = \frac{mg_{MB}}{g_{MIP}}$$

En donde *i* es la concentración de cada lavado

Se calculó el porcentaje de desorción de metilbenzoato mediante la siguiente formula:

$$\text{Pérdida (\%)}: 100 - \left[\left(\frac{\text{Concentración total } t^n}{\text{Concentración inicial } t=0} \right) * 100 \right]$$

8.6.8.- Espectrofotometría de infrarrojo de 4 vinil piridina y SOIc

Se utilizó un estudio de FT-IR con el fin de caracterizar el MIP mediante la evaluación de la incorporación de grupos funcionales en el polímero y su comparación con los espectros de polímero y monómero funcional mediante la reducción o eliminación de señales, como estiramiento de doble enlace de carbono de un monómero con funcionalidad vinilo, como resultado de la polimerización del grupo polimerizable del monómero [99].

8.7.- Caracterización del MIP imitador de heroína (SOIh)

8.7.1.- Capacidad máxima de retención MIP imitador de heroína (SOIh)

En los estudios de adsorción se determinó la cantidad de molécula molde adsorbida por el MIP_{AA} al llegar al equilibrio en sistemas acuosos, de la misma forma se utilizó para evaluar el efecto de impronta comparando su capacidad de adsorción contra un polímero no improntado. Los equilibrios referidos se muestran a continuación.



Se realizaron estudios por triplicado en un multiagitador magnético con control de temperatura a 25°C con muestras de 20 mg de MIP o NIP en un vaso con 9 mL de solución estándar de AAS para el polímero de poliacrilamida (1000 mg AAS/L), monitoreando mediante espectroscopía UV-visible los cambios registrados en la absorbancia a través del tiempo hasta que no hubo un cambio en la misma. El experimento se siguió de acuerdo a las siguientes condiciones: Curva de calibración de AAS entre 50-160 mg/L en agua destilada ajustada a pH 3 con ácido fosfórico, con una solución estándar de 1000 mg AAS/L en agua destilada ajustada a pH 3, observando el comportamiento a lo largo de 7 horas; con muestras de 2 mL en cada tiempo, siendo centrifugadas a 6000 rpm durante 3 minutos, y filtrado del sobrenadante con filtro de pirinola de 0.22 µL, se usó una dilución 200 µL/2000 µL, usando espectrofotometría UV/vis a una longitud de onda de 274.66 nm.

8.7.2.- Cromatografía de espacio de cabeza para análisis de ácido acético.

Se realizó estudio cromatográfico en un cromatografo de gases Agilent Technologies serie 7890A equipado con un detector de ionización de flama (FID) y con una columna capilar Stabilwax-DA (l:30 m, DI:0.25mm, Df:25µm.) a una temperatura de inyector a 250°C, temperatura de horno a 145°C, temperatura de detector 250°C., gas acarreador nitrogeno, presión constante, velocidad lineal de 40 cm/sec., inyección manual de 500 µL de muestra en fase gas. La inyección fue en modo split con un ratio de 1:50 y tiempo de la corrida de 5 minutos.

Se tomó una muestra de 1 g de MIP_{AA}, colocándolo en un vial de 10 mL, cerrado mediante un septum de PTFE, ajustado con un arillo metálico mediante una pinza engargoladora, sumergiéndolo en un baño de aceite a 85°C controlada por un termopar durante 10 minutos, transcurrido el tiempo se inserta la jeringa cromatográfica Hamilton (modelo 750N) a través del septum para tomar un volumen de 500 µL de gas del espacio de cabeza el cual se inyecta inmediatamente al cromatografo. La jeringa se debe mantener a la misma temperatura del horno para prevenir la condensación en la pared.

8.7.3.- Infrarrojo de acrilamida y MIP_{AA}

Se compararon los espectros de infrarrojo por ATR de muestras de acrilamida y SOIh a fin de detectar la existencia o no de bandas entre ellos.

8.7.4.- Estudios de adsorción de AAS a MIP_{AA}

Se determinó la capacidad máxima de carga o adsorción que del polímero SOIh, usando como referencia el trabajo de Meischl, determinando las lecturas de los muestreos mediante espectrofotometría UV interpolando los valores de absorbancia con la curva de calibración mostrada en la figura 13 [119].

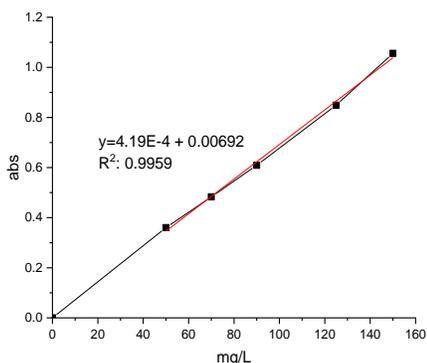


Figura 13.- Curva de calibración de AAS en agua ajustada pH=3

Se utilizó agua destilada ajustada a pH=3 con el fin de asegurar que las moléculas de AAS estén protonadas en el medio (pKa de ASA es 3.49) como se muestra en la figura 14, a una concentración de 1000 mg/L⁻¹; misma que se utilizó para la determinación de la adsorción del AAS, lo anterior debido a que la cercanía del valor del límite de solubilidad agua-AAS favoreció el equilibrio AAS-polímero; el proceso de adsorción se realizó a 25°C de temperatura durante 7 horas.

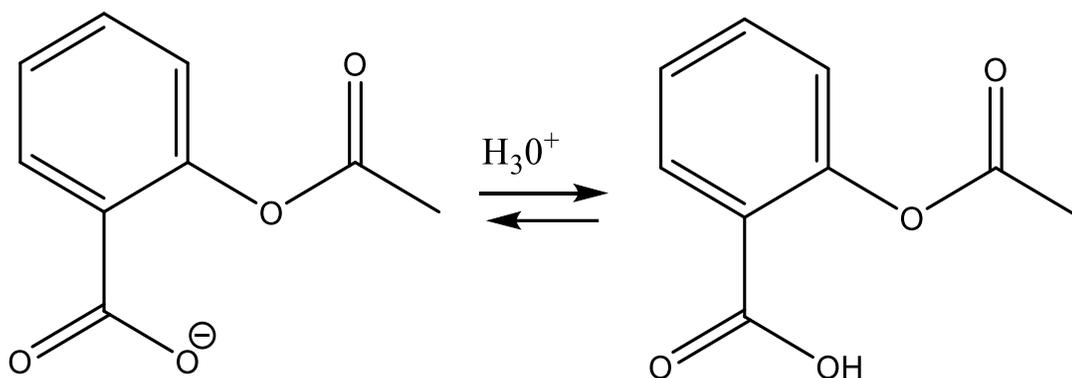


Figura 14.-Protonación del ácido acetilsalicílico en un medio ácido. [116, 131]

8.8.- Imitador de cannabis (SOIm)

Con el fin de imitar los “espacios de cabeza” de la marihuana (*Cannabis sativa*) y sus derivados se realizó la impregnación húmeda de sílice gel 60 usando etanol como solvente, a fin de controlar la desorción de los COV’s producidos por una brea de CBD amplio espectro 97.87% de pureza [63, 120].

Para determinar la concentración de brea capaz de emanar un estímulo odorífero capaz de provocar una respuesta, se realizó una evaluación con muestras de 2 gramos en 3 concentraciones diferentes (5%, 10%, 20%) exponiendo una sola ocasión cada preparado a tres perros previamente condicionados a la detección marihuana mediante el uso de almohadillas de algodón impregnados con sustancia real.

8.9.- Fase Biológica

8.9.1.- Fase biológica

Se analizó la calidad odorífera y toxicidad de los compuestos propuestos por medio de:

Modelo biológico "A" Se utilizaron ratas macho adultas raza Wistar (300–360 g de peso corporal), donadas por el Instituto de fisiología celular de la UNAM; se alojaron en un área ventilada, limpia, seca, en condiciones ambientales bajo los siguientes parámetros (18-26 ° C y 40-70 % de humedad relativa), con luz natural no modificada, permanecieron en cajas con cama (tipo Aspen), respetando los requerimientos de espacio (387 cm² y 18 cm de alto), satisfaciendo las necesidades nutricionales mediante el aporte de alimento comercial balanceado formulab Diet 5001 (LabDiet St. Louis, MO)® México, alimento y agua a libre acceso [102], excepto cuando se priva para aprendizaje y pruebas como se describe más adelante, para los SOI_c y SOI_h: en 12 ratas, dividido en un grupo de 8 animales sometidos a condicionamiento asociado al olor y un segundo grupo de 4 animales como testigo, a la conclusión del procedimiento se comparó el estado fisiológico y orgánico mediante estudios de hematología.

Para el imitador de marihuana en 8 ratas, 6 animales sometidos al condicionamiento asociado al olor y un grupo de 2 como testigo para la comparación del estado fisiológico y orgánico mediante estudios hematológicos y patológicos a la conclusión del procedimiento.

Se determinó la seguridad de los SOI's, mediante la toma de muestra de sangre, en el caso de las ratas por punción cardíaca directa, induciendo previamente un estado anestésico profundo con pentobarbital sódico de Lab. Pisa®, a una dosis de 60 mg/kg, por vía intraperitoneal, a la conclusión de la toma se administró una sobredosis del fármaco para inducir la eutanasia, comparando el resultado de un grupo control y las ratas expuestas a los odorantes.

Modelo biológico "B" en perros sometidos a un proceso de condicionamiento odorífero por el método de recompensa directa (Integración del satisfactor y las

fuentes odorantes por el método 4 en 1 del método de 4 en 1 desarrollado por Felix Fisher y Bernard Pauly [60].

Modelo Biológico “C”: Desafío de la respuesta de los diferentes imitadores en perros previamente adiestrados con Say diferentes a las diseñadas en el presente trabajo.

Los ejemplares del modelo biológico “B” y “C” provienen de cuatro empresas especializadas en el adiestramiento y uso de perros detectores (Cuadro 4), para el DBMT se utilizaron 20 caninos (quince machos y cinco hembras), de entre 1 y 5 años de edad de las razas cobrador de labrador (1), pastor alemán (5), pastor belga malinois (13), pastor holandés (1), Los animales estaban adiestrados para la detección de narcóticos.

Modelo Biológico “B”, Condicionamiento (CO), se utilizaron 3 ejemplares (machos de entre 1 y 3 años de edad), uno de la raza pastor belga malinois y dos pastores alemanes, sin adiestramiento previo de detección, con una marcada tendencia a perseguir y poseer una pelota de bote irregular manufacturada en caucho (JBB) [7, 101].

Los caninos fueron resguardados en estancias individuales secas, ventiladas en condiciones ambientales dentro de los parámetros (18 - 29 °C y 40-70% de humedad relativa), luz natural no modificada, administrando alimento concentrado superpremium y agua a libre acceso acorde a los lineamientos de experimentación animal y normatividad mexicana sobre bienestar animal [102].

Al grupo CO al inicio y final del proceso de condicionamiento se tomó una muestra de 5 mL de sangre por punción de la vena cefálica mediante sujeción física de cada ejemplar.

8.9.1.- Fase modelo animal A (Ratas)

Condicionamiento de ratas Wistar (Modelo biológico "A"), mediante un proceso de aprendizaje asociando el olor emanado de los imitadores y una solución endulzada contenida en un bebedero con un diseño especial, considerando como éxito la permanencia en el bebedero que contiene el olor/reforzador permitiendo el contacto e hidratación durante un período de 10 segundos cada vez, después de 14 días de condicionamiento, a la conclusión se realizaron estudios de hemograma y química sanguínea con el propósito de detectar cambios que sugirieran algún efecto colateral adverso relacionado.

Los objetivos de esta fase son validar la capacidad de condicionamiento de los SOI's en las diferentes fases de aprendizaje mediante el análisis de la tasa de aciertos/repeticiones (SR), conocer la solidez del aprendizaje por medio de la observación de la persistencia de la conducta adquirida y evaluar la inocuidad de los productos propuestos a partir de análisis hematológico.

Durante catorce días se sometió a ratas machos de la raza Wistar al condicionamiento a los olores emanados por los MIP's diseñados, asociados a una solución edulcorada [62] usando muestras de 20 ± 1.6 mg de cada producto (SOI*h*, SOI*c*) conservados por separado en envoltorios de una capa de papel filtro, realizando un proceso similar únicamente con el preparado SOI*m*.

Para la exposición de los estímulos odoríferos, se utilizó un BBCO que contenía como reforzador agua edulcorada a base de sacarina de sodio (0.005 M), los SOI's, en el bajo relieve circular de 2 mm de profundidad ubicado en el centro del soporte se colocó la muestra del odorante de donde emana el olor, las muestras se protegieron con una malla de polietileno con abertura de 3 X 3 mm, para impedir la ingestión de los odorantes durante las sesiones de condicionamiento (Figura 6), teniendo al alcance la fuente de hidratación edulcorada y los olores emanados por los SOI's. [62, 121].

8.9.2.- Fases de aprendizaje

El proceso de condicionamiento olfatorio, se llevó a cabo mediante la exposición simultánea de los odorantes [60, 61], se compuso de las siguientes las fases de:

Preestimulación: Con el fin de predisponer la a la conducta de búsqueda de la fuente de hidratación las ratas fueron privadas de agua 8 horas antes de los ejercicios de cada sesión.

Asociación (Día 1-4; 8 repeticiones por sesión): Se induce la asociación entre los olores y “reforzador” al ofrecer como única fuente de hidratación el BBCO (Figura 6) con los odorantes, una vez que tienen contacto con el bebedero se mantiene la exposición por un período de 10 segundos, se retira y se cambia aleatoriamente la ubicación en alguna posición de la reja, variando la duración de los tiempos entre cada exposición y ubicación del BBCO, estimulando la conducta de investigación y localización de la fuente de hidratación, estimulando la asociación del olor contenido en el BBCO [46, 62, 121, 122,]. Los primeros 4 días, se utilizó el reforzamiento de grupo, haciendo uso de la habilidad de la *Rattus norvegicus* de adquirir, aplicar y transferir conocimiento estructural a sus congéneres [123].

Verificación (Día 5-6; 8 repeticiones por sesión): Se comprobó la existencia del comportamiento con el fin de continuar con el ensayo.

Discriminación (Día 7-9; 8 repeticiones por sesión): Fase de exposición a la fuente de olores asociados al reforzador gustativo (BBCO), con el incremento gradual de hasta cuatro bebederos sin olor ni “reforzador”, variando aleatoriamente la ubicación de todos los BBCO, así como de los tiempos de exposición, por lo que se incrementó la duración de las sesiones. En esta fase el ensayo de *SOI_h/SOI_c* se formaron dos grupos de ratas compuestos de tres y cuatro animales. En el caso del *SOI_m* se formaron dos grupos de tres animales.

Individualización de los olores para el ensayo de *SOIh/SOlc* (Día 10; 4 repeticiones por sesión): para los MIP's *SOIh/SOlc*, se separaron los olores de la mezcla en bebederos similares con "reforzador gustativo" (BBCO), variando la ubicación de los BBCO, los tiempos de exposición, además de la duración entre sesiones; evaluando el comportamiento de cada olor, en sesiones de cuatro repeticiones. Respecto a *SOIm*, se extendió la fase de discriminación para iniciar el proceso de extinción del reforzador a partir del día 11. En esta fase los compuestos *SOIh/SOlc* se formaron tres grupos de ratas: dos con dos animales y uno con tres y para *SOIm* se integraron 3 grupos de 2 animales cada uno.

Extinción (Día 11-14; 4 repeticiones por sesión): Durante los días once al trece se llevó a cabo la reducción gradual del reforzador gustativo (solución edulcorada) hasta su completa eliminación, sustituyéndola por agua potable, realizando sesiones por cada olor de cada uno de los grupos.

El día catorce, se llevó a cabo la evaluación de la respuesta de cada olor por separado en ausencia de sacarina, con el objetivo de evaluar si existe diferencia de la respuesta y persistencia del comportamiento, aun en ausencia del estímulo reforzador (solución edulcorada).

8.9.3.- Modelo Biológico "B" (Especie blanco): Condicionamiento de perros (CO)

Se sometieron a condicionamiento de perros (Modelo biológico "B") mediante el método de exposición de olores múltiples y separación progresiva, evaluando la eficacia del condicionamiento y la toxicidad por la exposición repetida a los odorantes después de 14 días.

Con el propósito de escalar el rendimiento de los compuestos propuesta se implementó una fase de evaluación del condicionamiento en la especie blanco, bajo criterios muy similares a las del modelo biológico "A" se evaluó mediante análisis hematológico la inocuidad de los productos propuestos, en esta fase se sometió al

grupo al condicionamiento durante catorce días con la exposición simultánea de los tres compuestos. Al inicio y a la conclusión del proceso se obtuvieron muestras de sangre por punción de la vena cefálica mediante sujeción física de cada ejemplar. El grupo se compuso de 3 machos de entre 1 y 3 años de edad, uno de ellos de la raza pastor belga malinois y dos pastores alemanes, sin adiestramiento previo de detección, cuya característica común era una marcada tendencia a perseguir y obtener una pelota de bote irregular manufacturada en caucho (JBB) (Figura 7) [7, 101].

Usando muestras de 120 ± 3 mg de cada producto (SOI*h*, SOI*c*, SOI*m*) contenidos en frascos de cristal con tapa de acero inoxidable con siete orificios de 1 mm de diámetro cubierta en su interior con una capa de espuma polietileno de baja densidad de 2 mm de grosor. Se almacenaron en refrigeración (4°C) con una capa de Parafilm "M" sobre la cara externa de la tapa, cada uno dentro de un segundo frasco plástico rígido con cerrado hermético al cual se le adiciono un segundo empaque de espuma de polietileno para mejorar el sellado.

Para la exposición de los estímulos odoríferos, se utilizó un BBCO (Figura 8) que contenía como reforzador agua edulcorada a base de sacarina de sodio (0.005 M), los SOI's se colocaron en el bajo relieve circular de 2 mm de profundidad ubicado en el centro del soporte de donde emana el estímulo odorífero, protegidos con una malla de polietileno con abertura de 3 X 3 mm, para impedir la ingestión de los odorantes durante las sesiones de condicionamiento (Imagen 1), teniendo al alcance la fuente de hidratación edulcorada y los olores emanados por los MIP's [62, 121].

8.9.4.- Proceso de condicionamiento

a) Preestimulación: (14 días de adaptación/repeticiones por sesión 10) Durante el período de adaptación los caninos fueron sometidos a sesiones individuales de lanzamiento y recuperación a la vista del JBB (Figura 7) [7, 101].

b) Asociación: (Días 1-4/repeticiones por sesión 8) A cada ejemplar se le expuso a un conjunto de 4 CCO's agrupadas (Figura 8), en donde solo una contiene los tres imitadores (SOI_h, SOI_c, SOI_m) y un JBB. En cada repetición, a la vista del ejemplar, se simuló el ocultamiento del JBB en las CCO's agrupados estimulando el impulso de olfacción e inspección del grupo de objetos (Estimulación previa), permitiendo posteriormente que el canino inspeccione las CCO's. Cuando el canino olfatea y permanece atento al orificio de la CCO que contiene los odorantes e incluso intenta extraer el JBB que se encuentra en el interior, se le otorga un segundo JBB simulando que el reforzador sale de la fuente de emanación de los olores, promoviendo la permanencia e insistencia para obtener el JBB contenido en la CCO con los SOI's, en cada repetición se cambia el punto de inicio del ejercicio.

c) Extinción: (Días 5-11/repeticiones por sesión 8) Una vez que el ejemplar ubica olfativamente la CCO con los odorantes se reduce gradualmente el tamaño del JBB que se encuentra en su interior, hasta eliminarlo, continuando con la entrega externa del reforzador cuando el canino localiza el área de emanación de los odorantes. A partir de esta fase, se alinearon los CCO's junto a un muro con el fin de promover el orden de inspección de los objetos, realizando la estimulación previa referida en el párrafo anterior. Durante esta fase también se indujo que los ejemplares adquirieran la posición estática (Indicación), preferentemente la posición de sentado, otorgando el JBB cuando el ejemplar adquiere una postura inmóvil, extendiendo progresivamente el tiempo de entrega del JBB y en consecuencia incrementando el período de permanencia en el foco de emanación del odorante.

d) Discriminación: (Días 5-11/repeticiones por sesión 8) Simultaneo a la fase de extinción, se cambió aleatoriamente el tipo de material de construcción de la CCO que contiene los odorantes, además de incrementar progresivamente el número de CCO's vacíos, con el fin de evitar que el tipo de material, las dimensiones o la ubicación del olor sean factores que predispongan a la respuesta del ejemplar.

e) Separación: (Día 12-14/repeticiones por olor 4) Se inició realizando ejercicios similares a la fase de asociación con CCO por cada SOI; si el ejemplar muestra una conducta similar a las fases anteriores se incrementó progresivamente el número y tipo de CCO's vacías. Durante esta fase se realizaron sesiones de adiestramiento por separado con 4 repeticiones por cada olor [3, 56, 57, 60, 63, 124, 125, 126, 127].

8.9.5.- Modelo Biológico "C" (Campo): Ensayo DBMT

Los 20 ejemplares usados provienen de cuatro empresas especializadas en el adiestramiento y uso de perros detectores (Cuadro 4), de los cuales quince fueron de sexo macho, cinco hembras, con una edad que oscila entre 1 y 5 años, respecto a las razas uno era cobrador de labrador, cinco de la raza pastor alemán, trece de la raza pastor belga malinois y un pastor holandés, todos ellos estaban adiestrados para la detección de narcóticos, para su condicionamiento se utilizaron 3 modalidades diferentes:

- A) Say comercial y materiales impregnados con sustancias reales.
- B) Materiales impregnados con sustancias reales.
- C) Sustancias comerciales.

Cada uno de los centros de adiestramiento, aplican normas de condicionamiento y criterios de operación con adecuaciones propias incluso en el tipo de reforzador usado.

8.9.6.- Estímulos odoríferos:

Se usaron los SOI's para retener benzoato de metilo (SOIc), ácido acético/ácido acetilsalicílico (SOIh) y brea de CBD (SOIm), con un tamaño de muestra de 120 ± 3 mg contenidos en frascos de cristal de 6 por 4 cm con tapa de acero inoxidable con siete orificios de un mm de diámetro cubierta en su interior con una capa de espuma polietileno de baja densidad de dos mm de grosor. Se almacenaron en refrigeración (4°C) con una capa de Parafilm "M" sobre la cara externa de la tapa, cada uno dentro de un segundo frasco plástico rígido con cerrado hermético al cual

se le adiciono un segundo empaque de espuma de polietileno para mejorar el sellado [116, 131].

Desafío de la respuesta de los imitadores propuestos a perros previamente adiestrados con otras fuentes aromáticas. Con el propósito de validar la respuesta a la exposición de los odorantes propuestos (SOI*h*, SOI*c* y SOI*m*) en una sesión de adiestramiento rutinario en los entornos en donde comúnmente son adiestrados.

La prueba se efectuó en el entorno donde normalmente desarrollan su actividad detectora, el orden de localización se llevó a cabo aleatoriamente, colocando muestras individuales en 3 ubicaciones diferentes, dando un tiempo de reposo que oscilo entre 5 y 20 minutos. La colocación se hizo de acuerdo al procedimiento de cada instructor, ya sea realizando la inspección olfativa en un solo recorrido o bien efectuando una inspección por cada olor.

Previo a la búsqueda y localización de los compuestos propuesta, se realizó una búsqueda con una fuente de olor con la que comúnmente son condicionados, retirando posteriormente el objeto y la muestra testigo. Se solicitó a los conductores de los caninos evitar manejos y emitir voces que ayuden a la localización, recomendando que solo se acompañe al ejemplar en las áreas de búsqueda.

El estudio se llevó a cabo observando una de tres conductas posibles ante las fuentes de olor:

Alerta e indicación (Completa) Respuesta del canino al primer contacto con el olor (alerta) con la posterior señalización del área de donde emana el efluvio (Indicación).

Alerta: (Parcial): Respuesta del canino al primer contacto con el olor (alerta).

Deficiente: No mostrar ninguna de las conductas anteriormente mencionadas.

Cuadro 4.- Relación de caninos (Modelo biológico “B” y “C”) y su procedencia

Centro	Nombre	Raza	Edad	Sexo	Material usado para el condicionamiento
SSIA/CA	Drago	PH	3	M	Combinación de Say comercial y exposición con sustancias reales
	Chueco	PBM	3	M	
SSIA/AICM	Perry	CL	5	H	
SSIA/SLP	Asia	PBM	3	H	
	Farbeg	PA	3	M	
	Fasar	PA	3	M	
CIKAN	Khabiv	PBM	1	M	Materiales impregnados con sustancias reales.
	Abel	PBM	1	M	
	Hassan	PBM	3	M	
	Once	PBM	3	M	
	Aida	PBM	3	H	
	Nala	PBM	1	H	
	Drako	PBM	2	M	
Prototipo	Chance	PBM	2	M	Say comerciales
	Max	PA	2	M	
	Naenia	PBM	2	H	
	Reyes	PBM	2	M	
PD	Jako	PA	2	M	Combinación de Say comercial y exposición con sustancias reales
	Chaco	PA	2	M	
	Reno	PBM	5	M	
(CO)	Jako I	PA	1	M	SOI
	Chaco I	PA	1	M	
	Reno I	PBM	2	M	

9.- Resultados

El presente trabajo evaluó la eficacia y seguridad del olor emanado por los imitadores de clorhidrato de cocaína, heroína y marihuana (SOI*h*, SOI*c* y SOI*m*), diseñados y caracterizados instrumentalmente para el control de la desorción de los principales compuestos volátiles de su firma odorífera.

9.1.- Fase Instrumental:

Se obtuvieron granulados que emanaron un olor característico y perceptible al olfato, los monolitos obtenidos del proceso de polimerización se trituraron y tamizaron permitiendo un granulado homogéneo, los estudios de espectrofotometría de ambos MIP's arrojaron registros que sugieren afinidad e interacción reversible entre el monómero y la molécula horma, así como preservación de las cualidades de las moléculas que integran el compuesto. En los tres preparados se observó una adsorción dependiente de la concentración, lo que sugieren amplia superficie de unión inespecífica entre las matrices y odorantes.

9.1.1.- Caracterización del Imitador (SOI*c*)

DOI: [10.3923/ijp.2022.171.181](https://doi.org/10.3923/ijp.2022.171.181)

URL: <https://scialert.net/abstract/?doi=ijp.2022.171.181>



Research Article

Designing and Preclinical Evaluation of a Molecular Imprint Polymer-Based Cocaine Odor Mimic for Conditioning Detection Dogs

¹Alonso Sierra-Resendiz, ²Berenice Robles-Heredia, ³María J. Bernad-Bernad, ⁴Roberto Díaz-Torres, ¹Sheila I. Peña-Corona, ¹Dinorah Vargas-Estrada and ²Jesús Gracia-Mora

¹Department of Physiology and Pharmacology, Veterinary Medicine School, National Autonomous University of Mexico, Mexico

²Department of Inorganic Chemistry, Faculty of Chemistry, National Autonomous University of Mexico, Mexico

³Department of Pharmaceutical Technology, Faculty of Chemistry, National Autonomous University of Mexico, Mexico

⁴Multidisciplinary Research Unit, Faculty of Chemistry, FES Cuatitlan, National Autonomous University of Mexico, Mexico

Abstract

Background and Objective: The use of trained dogs to detect illegal or dangerous substances and goods is an increasingly used tool. The present work proposed to design a polymer that imitates the odor of cocaine HCl using molecular printing technology, with a mixed release to maintain a balance of the volatile compound between the medium and the MIP, intended for the conditioning of detector dogs. **Materials and Methods:** Design of a Molecular Imprinting Polymer (MIP) based on the monomer 4-vinyl-pyridine and ethylene glycol-dimethacrylate (EGDMA) crosslinker for the controlled desorption of methyl benzoate to mimic the "headspace" of cocaine-HCl, comparing its behaviour with a preparation based on the non-specific adsorbent most used in commercial products, impregnated with the same desorbent at the saturation point of each material. Its function was tested in Wistar rats and assessed its acute toxicity. **Results:** Odor desorption was tested over seven days of environmental exposure, considerably longer desorption was achieved than with the challenged commercial product (49.117% MIP vs. 90.810% challenge compound). The rats were trained with the designed prototypes and no toxicity was found in the blood chemistry results. **Conclusion:** The designed MIPs are innocuous and has better performance, reaching a faster and more sustained equilibrium of the supernatant vapour, showing a quality, intensity and duration of the odor stimulus useful for the conditioning of biosensors, demonstrating that the MIP design technology represents a broad, versatile and solid option for the design of odor imitators.

Key words: Molecular imprint polymers, odoriferous signature, odor mimics, selective adsorption, controlled desorption

Citation: Sierra-Resendiz, A., B. Robles-Heredia, M.J. Bernad-Bernad, R. Díaz-Torres, S.I. Peña-Corona, D. Vargas-Estrada and J. Gracia-Mora, 2022. Designing and preclinical evaluation of a molecular imprint polymer-based cocaine odor mimic for conditioning detection dogs. *Int. J. Pharmacol.*, 18: 171-181.

Corresponding Author: Dinorah Vargas, Department of Physiology and Pharmacology, Veterinary Medicine School, National Autonomous University of Mexico, Mexico

Copyright: © 2022 Alonso Sierra Resendiz *et al.* This is an open access article distributed under the terms of the creative commons attribution License, which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Competing Interest: The authors have declared that no competing interest exists.

Data Availability: All relevant data are within the paper and its supporting information files.

INTRODUCTION

The use of trained dogs to detect illegal or dangerous substances and goods is a tool used by government institutions in charge of public safety¹. The origin of this activity dates back to the sixties of the last century^{2,3}, to achieve conditioning as a consequence of the simultaneous connection of an odoriferous stimulus emanating from the "aid substances" (conditioned stimulus) and a satisfier that triggers an emotion from which a determine behavior or is molded. At the beginning of the conditioning, the smell has a neutral physiological meaning but in the end, the close association between the two elements will induce the nervous system to give it a particular meaning, the odorant must guarantee an appropriate quality, constant intensity and purity that avoid confusion in the learner and consequently a successful change of emotion, so that the succession of exposures, causes the individual to spontaneously repeat the learned behavior, until the consolidation of conditioning⁴.

To date, a sector dedicated to this activity is inclined towards using real substances, which represents several inconveniences: Risks of ingestion and intoxication of canines, presence of contaminants, special storage requirements, legal risks derived from its possession, transfer and use. Another sector shows a marked interest in developing "aid odorant substances" that allow inducing optimal conditioning with less complex conditions of use and storage, avoiding the risks of using real substances⁵. There are different "helper substances" on the market, designed for the conditioning of different specialties, such as the search and location of drugs, explosives, people and pests: bed bugs (*Cimex* sp.), moths (*Hylotrupes bajulus*), etc⁶. A first challenge in the design of mimicking substances is to identify "the characteristic odor" or "odoriferous signature" of the substance to be detected, which is made up of a set of "dominant volatile compounds" that are part of the "supernatant gas," these have the ability to produce a response in instrumental and biological methods⁶. Cocaine, the drug of interest in this study, is composed of an ester of benzoic acid and a base that contains nitrogen, its maximum stability is presented at a pH close to 3.0, so depending on the temperature and pH, it undergoes hydrolysis reactions⁶⁻⁹. In various works of gas chromatography and mass spectrometry, it is reported as the main product of the decomposition of cocaine hydrochloride to methyl benzoate, which is highly detectable since it has a very high vapor pressure, 0.38 Torr at 25 °C, a dissipation rate of 62 ng min⁻¹ at 40 °C and with 80% relative humidity^{10,11}.

The second challenge for the design of aid substances are the so-called "matrices" whose characteristics are the

preservation and control of odor release, its main function is to allow the emanation of a constant and unmistakable odorous stimulus, the approaches to solve this problem are directed to the choice of non-specific adsorbent materials such as silica, cellulose derivatives or non-specific polymers, alone or in combination¹²⁻¹⁴, the quality that in some cases allows the design of products with compound odors, with imitators with one and with several odors contained in the same product¹⁵⁻¹⁷.

Molecular Imprint Polymerization (MIP) is a technology that has existed since 1931¹⁸ which consists of the design of compounds that have the ability to adsorb and desorb specific molecules, through the design of high-crosslinking macromolecular structures for the selective recognition of a substrate, its design is based on the functioning models of biological molecular recognition systems such as the antigen-antibody ratio (Ag / Ac), enzyme-substrate, hormone-receiver, etc.^{19,20}. MIPs are obtained by the polymerization of a monomer around a template molecule that, when extracted, generates dimensionally and structurally compatible cavities as well as a distribution of functional groups, which makes possible a selective recognition, so that molecules with different molecular weight, which do not have the geometric characteristics or functional groups of the template molecule, they are not capable of being incorporated into these spaces, so the MIP and the template molecule are in optimal interaction conditions, generally reversible because the most frequent design is through non-covalent relationships.

The molecule to be imprinted acts as a complement to one or more functional monomers through reversible non-covalent electrostatic relationships, such as the relationship between dipoles, electrostatics or hydrogen bonding, etc.^{21,22} that interacts with functional monomers, in the manner of a preorganized structure, which is exposed to a crosslinker and a polymerization initiator. The relationship between free radicals forms structures, when the template molecule is removed, the spaces or pores specifically to the molecule used will remain. Its selectivity allows to know the maximum retention capacity and through specific procedures, it is possible to know the desorption behavior with high reliability and precision the desorption behavior. MIPs are adsorbent materials par excellence due to their affinity, specificity and generally reversible binding with the substrate, they allow efficient adsorption and prolonged or controlled desorption through specific washes, in addition to offering high chemical stability, they are generally inert to acids, bases, metal ions and organic solvents, high stability to physical changes such as temperature and pressure, giving them a long half-life with reuse capacity^{23,24}. MIPs are solid compounds that can be

designed in-ground particles, regular spherical particles, nanoparticles or monoliths of relatively simple, reproducible synthesis, with excellent versatility and robustness²⁵.

This technology is used in the design of sensors, catalysts, modified release pharmaceutical forms, chromatography, among others, even the adsorption of residues resulting from the decomposition of illicit drugs such as cocaine, this work represents an opportunity for innovation in using this technology for the controlled desorption of odorants useful for the odorant conditioning of biosensors^{26,27}.

The proposed MIP is considered an imitator because the odorant emanated is the product of the isothermal decomposition of real drugs, so the lack of legal restrictions, the absence of psychoactive or toxic effects, represents extremely interesting elements for its use^{28,29}.

In the present study, a Molecular Imprinting Polymer (MIP) based on the monomer 4-vinyl pyridine was designed to control the desorption of methyl benzoate to imitate the "headspaces" of cocaine, it was validated and characterized the desorption of methyl benzoate and was compared against that obtained from silica, to determine the differences between a specific material and a non-specific adsorbent.

MATERIALS AND METHODS

Study area: The design of the molecular imprinting polymer as a cocaine odor mimic was carried out in Laboratory 100 of the Department of Inorganic and Nuclear Chemistry of the Faculty of Chemistry of UNAM, The rheological study Department of Pharmacy, Faculty of Chemistry, National Autonomous University of Mexico, Mexico City, Mexico, from January, 2018-December, 2019.

The release study was carried out at the Department of Physiology and Pharmacology, Faculty of Veterinary Medicine, National Autonomous University of Mexico, Mexico City, Mexico, from January-November, 2020.

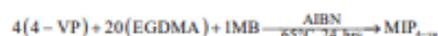
Materials

Reagents: 4-vinyl pyridine (4-VP) 97%, Silica gel 60, brand products Sigma Aldrich, (DEU. GER), ethylene glycol dimethyl acrylate 98%, (EGDMA), Acetonitrile 99.5% (ACN), Methanol (MeOH) QP grade, brand products Merck, (DARM, GER), acrylamide 98% (AA), Fluka analytical, ethanol (EtOH) reagent grade, brand products J.T Baker, (NJ USA), Azobisisobutyronitrile 98% (AIBN) Akzonobel (CAU, COL), Methyl benzoate 99% (MB) Alfa Aesar, (MA, USA), acetone, phosphoric acid 85%, Supelco, (DEU. GER) were used. The reagents and solvents were not purified before use.

Equipment: Multi-shaker IKA, RO-5-P-51 (ILM, USA), centrifuge Gilson GMC Lab, model F (WI, USA), Grinder Cole Palmer (IL, USA), Spectrophotometer UV/vis Ocean optics, DT-mini 2GS(NY, USA), Thermo shaker Biobase, BJPX-1008 (Braunsch, GER).

Experimental method

Synthesis of MIP: The polymerization method was carried out by free radicals, using the stoichiometry of monomer, crosslinker and last (4: 20: 1), the synthesis was carried out by the following reaction:



The 4-vinyl pyridine polymer was prepared from the solution of the monomer (4-vinyl pyridine) (0.181 μL), with a template molecule (Methyl benzoate) (66 μL), cross linker (Ethylene glycol dimethyl acrylate) (1.84 μL) and initiator of polymerization (Azobisisobutyronitrile) (11.62 mg). In a 10 mL test tube, 5 mL of acetonitrile were added, it was closed with a screw cap, the sample was sonicated for 10 min and oxygen was removed by including nitrogen for 5 min. It was incubated for 24 hrs at 65°C in Fig. 1.

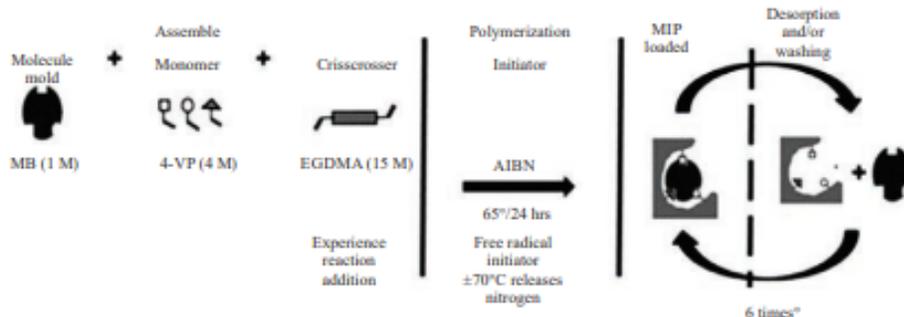


Fig. 1: Reaction of a molecular impression polymer based on the 4-VP monomer to control the desorption of MB to mimic the "headspaces" of cocaine

MB: Methyl benzoate, (4-VP) 4-vinylpyridine, EGDMA: Ethylene glycol dimethyl acrylate, AIBN: Azobisisobutyronitrile, MIP: molecular impression polymer

The result of the process is a monolith, requiring the rupture of the test tube to obtain it, the stone was crushed in a mill, the pulverized produced was washed with 20 mL of ethanol and acetone alternately to eliminate the residues that did not react. Finally, the powder obtained was sieved through a 250-micron mesh.

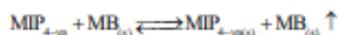
Successive washes removed the template molecule with ethanol at room temperature for 3 hrs, the presence of methyl benzoate was monitored by UV spectrometry. Finally, the powder obtained was dried at 50°C. As part of the MIP adsorption evaluation methodology, an unprinted polymer (NIP) was prepared with a similar procedure in the absence of the template molecule.

Maximum retention capacity: The adsorption capacity of MIP and NIP was carried out in an aqueous system in a magnetic multi-stirrer with temperature control at 25°C, determining the equilibrium concentration over time, according to the following reaction:



Samples of 20 mg of MIP and NIP with 9 mL of a solution in distilled water of methyl benzoate at a concentration of 0.6 μL mL⁻¹ were deposited in a beaker for 3 hrs, 2 mL samples of the supernatant were taken at each time and they were centrifuged for 3 min at 6000 RPM, filtered with 0.22 μm sterile syringe filter. Changes were monitored over time by absorbance by UV visible spectroscopy. To determine the concentration, a calibration curve was prepared that ranged between 0.075 and 0.018 μL mL⁻¹ at a wavelength of 273.75 nm and a coefficient of determination (r²)>99.87.

Desorption: The release of methyl benzoate from the polymeric matrix was evaluated over time as shown in the following reaction:



With the understanding that the amount released or desorbed is the difference that existed between the initial amount adsorbed and the amount adsorbed at a time "n".

The 70% methyl benzoate based on the weight of the polymer sample dissolved in 3 parts of ethanol was poured onto the MIP_{4-VP}, it was left to evaporate for 24 hrs until the matrix was dry.

Samples of 40 mg of MIP4-VP were placed, under the following conditions: Room temperature in an open container, in which the desorption was monitored for 0-9 hrs on the first day and the rest every 24 hrs until completing one week and in refrigeration, at room temperature in closed containers, desorption was evaluated for 7 days.

Each loaded MIP4-VP sample was placed in a cellulose bag, It was introduced into a 50 mL beaker where 20 mL of a methanol: Water solution (1: 1) were added, Subsequently, the glass was sealed with parafilm and placed on an orbital shaker at 100 rpm at room temperature, a 2 mL sample was taken every two hrs, the concentration of methyl benzoate was determined by UV spectrophotometry and the medium was replaced, repeating the procedure until no substrate is detected. Repeating the procedure until no substrate is detected.

Preparation of the confrontation compound: Silica gel 60 was impregnated by adding a solution of methyl benzoate in acetone at a concentration similar to that of MIP, samples were prepared to determine desorption under the same conditions of MIP.

To benefit the interaction between MIP-methyl benzoate, a concentration close to the solubility limit (0.6 μL mL⁻¹ in distilled water) was chosen, the adsorbed amount was interpreted in mg of methyl benzoate per gram of MIP4-VP, determined by the subtraction of the final concentration from the initial concentration of the solution, using the following Eq.²⁵:

$$\frac{\text{Initial concentration} - \text{Concentration at } t^n \times \left(\frac{10.8 \text{ mg mb}}{1 \text{ mL}} \right) \times \text{Volume in glass}}{\text{NIP/MIP (g)}} = \frac{\text{Adsorbed (mg)}}{\text{MIP/NIP (g)}}$$

The volume must be corrected according to the volume in the tube prior to sampling.

To avoid erroneous results, it was standardized to three washes of the polymer for the complete extraction of the solute, determining the amount adsorbed from the substrate by the following equation:

$$\text{MB desorbed} = \frac{\sum_{i=1}^3 i \times V}{\text{MIP (g)}} = \frac{\text{MB (mg)}}{\text{MIP (g)}}$$

where, i is the concentration of each wash.

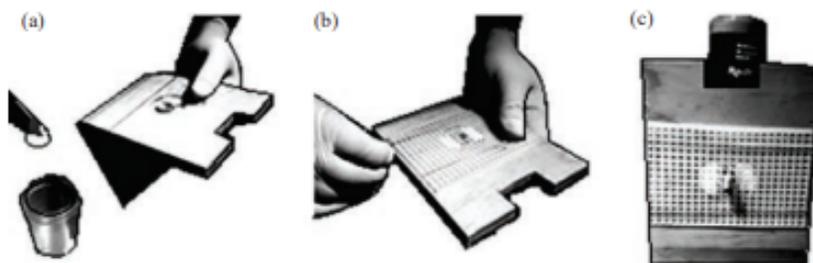


Fig. 2(a-c): Specially designed rat drinker to expose odors to rats during conditioning, (a) Whatman Grade 41 filter paper with odorous sample, (b) Plastic mesh to protect the filter and (c) The sprue is placed in the center of the wooden base
SDRD: Specially designed rat drinker

The methyl benzoate desorption percentage was calculated using the following Eq.:

$$\text{Lost (\%)} = 100 - \frac{\text{Total concentration at } t^*}{\text{Initial concentration at } t = 0} \times 100$$

Acute toxicity assessment

Subjects: 20 adult male Wistar rats 300-360 g of body weight, donated by the Institute of Cellular Physiology of the National Autonomous University of Mexico, Mexico, were randomly divided into two groups of seven rats (Conditioning groups) and another two groups of three specimens per box (Control groups). They were housed in a clean, dry and ventilated area under environmental conditions under the following parameters: 18-26 °C and 40-70% relative humidity, with unmodified natural light. Were kept the rats in boxes provided with a bed (Aspen type), the space requirements were respected (387 cm² and 18 cm in height). The nutritional needs were to provide the balanced commercial food BDL-7100 Abene® (Mexico) and free access water, except when the rats were deprived for testing as described below. The rats were kept in this space 14 days before the experiment to achieve a period of adaptation to the new environment, The housing and feeding conditions maintained were by animal experimentation guidelines and Mexican regulations on animal welfare (NOM-062-ZOO-1999).

Apparatus

Drinkers with a special design (SDRD) for rats: For the present study, the molecular imprinting polymer to mimic cocaine HCl "headspaces" was placed in drinkers for rats with a special design (SDRD) which had a circular low relief that surrounds the outlet orifice of the hydration source, where was placed a cellulose bag with the MIP protected by a plastic mesh that prevented direct contact or ingestion of the product, so that every time the animal hydrates it has contact with the smell in Fig. 2(a-c).

Exposure to odorants: For the exposure of the odorants, a wooden support was used that holds the hydration source enriched with sodium saccharin at a concentration of 0.005 M, the outlet of the hydration tube is surrounded by a circular low relief of 4 cm in diameter and 2 mm deep where the odoriferous MIPs were placed, each one contained in an envelope of Whatman Grade 41 filter paper, the low relief was protected with a polyethylene mesh with 3 × 3 mm openings to avoid the risk of direct contact, ingestion, humidification of the MIPs in Fig. 1.

For groups A and B of rats were administered sources of hydration as follows: An SDRD loaded with the MIP and reinforcer was added as well as four empty SDRDs. Reinforcers were prepared with: Sweetened solution formulated with 99% saccharin sodium dihydrate from Merck (DARM, GER), (0.005 M)^{30,31}.

For control groups: C and D, an SDRD loaded with the MIP's was placed, water was added to all the SDRD of group C, to those of group D, a reinforcing solution (sweetened solution).

To evaluate the acute toxicity, after exposing them, during training for a period of 14 days to the odors emitted by the MIP, the animals were anesthetized with sodium pentobarbital to obtain blood by a direct puncture. Then they were induced to euthanize with an overdose of barbiturates. The institutional subcommittee reviewed and approved the study for the care and use of experimental animals of the National Autonomous University of Mexico (SICUAE.DC-2019/1-3).

RESULTS

Molecular Printing Polymers (MIP) were developed, whose function is to mimic the "headspaces" of cocaine, Fig. 1: Schematizes the reaction of MIP based on the monomer 4-vinyl pyridine (4-VP) to control desorption methyl benzoate (MB).

Table 1: Desorption (%) of methyl benzoate included in a molecular imprint polymer mimicking the odoriferous imprint of cocaine HCl for 7 days (168 hrs)

Time (hrs)	Desorption (%)
9	10.15±1.137
24	12.42±1.772
48	36.32±2.248
72	36.94±3.101
96	46.35±3.613
168	49.12±2.536

Percentage ±SD of the desorption of methyl benzoate included in a Molecular Imprint Polymer (MIP) designed from 4-vinyl pyridine

Figure 3(a-c) showed the possible interactions between monomer (4-VP) and methyl benzoate, they are marked in blue color. Different types of bonds are observed between molecules:

- π - π type bonds
- Interaction between electron pair of nitrogen and carbon with positive delta of the carboxyl group of methyl benzoate

- Interaction of the electronic pairs of nitrogen that of 4-VP with the benzene ring, favored by the existing electrostatic environment

Table 1 showed the percentage of desorption during 168 hrs that methyl benzoate had from a molecular fingerprint polymer designed from 4-vinyl pyridine. Desorption analysis was performed at room temperature (25°C). Desorption was 10.15% at 9 hrs, 12.42% (24 hrs), 36.32% (48 hrs), 36.94% (72 hrs), 46.35 (90 hrs), 49.12 (168 hrs). These results show equilibrium in desorption from 24 hrs and only desorption of 49.12% reached at seven days (168 hrs), which suggests a long useful life.

Figure 4 showed the comparative test of the release percentage of methyl benzoate from two matrices: MIP and a silica gel-based preparation at 168 hrs, under different storage conditions: Refrigeration (7°C), room temperature (25°C) and under the open or closed system (open or closed bottle). This evaluation was carried out

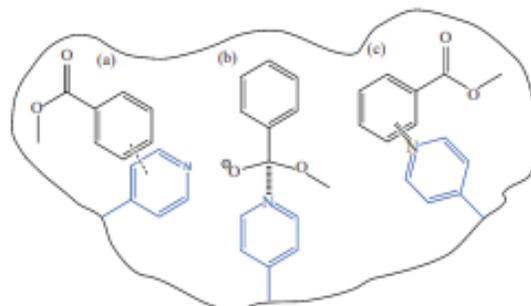


Fig. 3(a-c): Possible interactions between methyl benzoate and 4-vinyl pyridine in the polymer matrix, (a) π - π type bonds, (b) Interaction between electron pair of nitrogen and carbon with positive delta of the carboxyl group of methyl benzoate and (c) Interaction of the electronic pairs of nitrogen that of 4-VP with the benzene ring, favored by the existing electrostatic environment

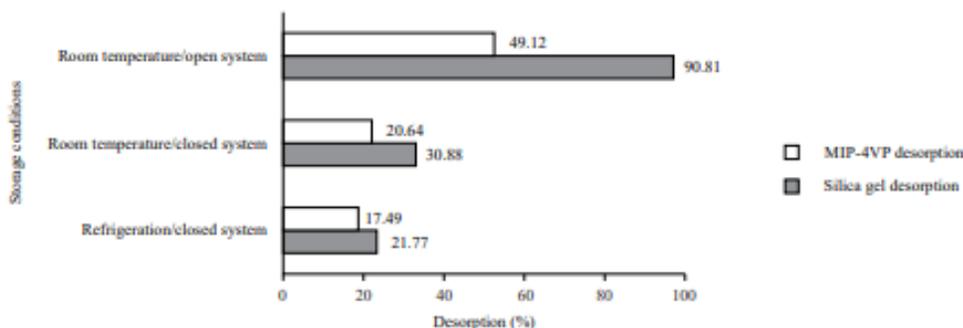


Fig. 4: Methyl benzoate desorption (%) occurred at 168 hrs under different storage conditions from a designed MIP and a non-specific adsorbent (a silica gel preparation)
4-VP: 4-vinylpyridine, MIP: Molecular impression polymer

simultaneously with the desorption study and with the same determination techniques described in the present study.

During the first 168 hrs, a desorption rate of 49.12% was achieved, demonstrating a continuous release of MIP4-VP odor, representing half of what was performed with the Silica gel (90.81%) in the "open system" at room temperature. In the "closed system," MIP desorption (%) was lower, at room temperature and refrigeration (20.64 and 17.49%), respectively, compared to that obtained from the gel of silica 30, 88 and 21.77%, respectively. Thus, the results show that the designed MIPs performed better, reaching a faster and more sustained equilibrium of the supernatant vapor, showing more extended and controlled desorption compared to Silica Gel, fulfilling the purpose for which the compound was designed.

The maximum loading capacity concentrations for MIP and NIP (unprinted polymer) were 103.633 and 106.818 mg g⁻¹ respectively, During the present study, factors such as agitation, temperature, which has a directly proportional effect with molecular kinetics and therefore the volatilization of methyl benzoate, were controlled.

The polymers were ground and sieved to control parameters such as surface area and the number of sites between the samples, the granule size was homogenized to favor reproducibility.

To benefit the interaction between MIP-methyl benzoate, a concentration close to the solubility limit (0.6 µL mL⁻¹ in distilled water) was chosen, the adsorbed amount was interpreted in mg of methyl benzoate per gram of MIP4-VP, determined by the subtraction of the final concentration from the initial concentration of the solution.

Figure 5(a-j) showed the blood chemistry results performed on the rats to detect signs that suggest the existence of acute toxicity, because of exposure for 14 days to MIP, using the specially designed Rat Drinker (SDRD) to expose odors (Fig. 2). To stimulate the rats to have a greater interest in seeking hydration, were removed conventional hydration sources for a period of 8 hrs before to exposure to the SDRDs was divided the lot into four groups: A and B subjected to conditioning associated with the odor emanating from MIP's and a sweetened solution, C with multiple SDRDs containing water with no source of odor emanation and one SDRD with MIP's, D with multiple SDRDs with a sweetened solution without MIP and one SDRD with MIP was evaluated values and their relationship within and between groups.

Figure 5a measurement of blood cholesterol in rats was measured to detect signs of toxicity by exposure for 14 days to MIP. The values seen in the groups of rats were: A: 2.1, B: 2, C: 2.1, D 1.8 mmol L⁻¹.

Figure 5b measurement of triglycerides in blood in rats was observed to detect signs of toxicity. The values observed in the groups of rats were A: 1, B: 1.1, C: 1.2, D 0.9 mmol L⁻¹.

The cholesterol and triglyceride results performed in rats do not suggest heart problems due to exposure for 14 days to MIP. In Fig. 5c, measurement of total bilirubin in blood in rats was done. The values observed in the groups of rats were A: 3.1, B: 3.4, C: 2.4, D 2.5 µmol L⁻¹.

Figure 5d showed the measurement of conjugated bilirubin in blood in rats to detect signs of toxicity. The values observed in the groups of rats were A: 1.1, B: 1.1, C: 1.2, D 1.3 µmol L⁻¹.

In Fig. 5e, measurement of unconjugated bilirubin in blood in rats was detected. The values observed in the groups of rats were A: 2.5, B: 2.4, C: 1.25, D 2.4 µmol L⁻¹.

The results bilirubin (Total, conjugated and unconjugated performed in rats do not suggest abnormalities related to oxidative metabolism and vascular conditions due to exposure for 14 days to MIP). Figure 5f showed measurement of proteins in blood in rats to detect signs of toxicity. The values observed in the groups of rats were A: 81, B: 78, C: 63, D 72 g L⁻¹. Figure 5g showed the measurement of albumins in blood in rats to detect signs of toxicity. The values observed in the groups of rats were A: 36, B: 37, C: 31, D 33 g L⁻¹.

Figure 5h measurement of globulins in blood in rats was observed to detect signs of toxicity. The values observed in the groups of rats were A: 45, B: 40, C: 30, D 40 g L⁻¹.

The results proteins and globulins performed in rats do suggest tissue degradation resulting from an increase in muscle activity due to competition between rats to reach hydration sources during the period of exposure to MIP's contained in the DRDS L⁻¹.

Figure 5i showed the measurement of urea in blood in rats to detect signs of toxicity. The values observed in the groups of rats were A: 7.9, B: 7, C: 7, D 7.9 mmol L⁻¹.

Figure 5j measurement of creatinine in blood in rats detected signs of toxicity. The values observed in the groups of rats were A: 49, B: 52, C: 50, D 49 µmol L⁻¹.

The blood chemistry values found in the experimental rats do not suggest alterations related to oxidative metabolism,

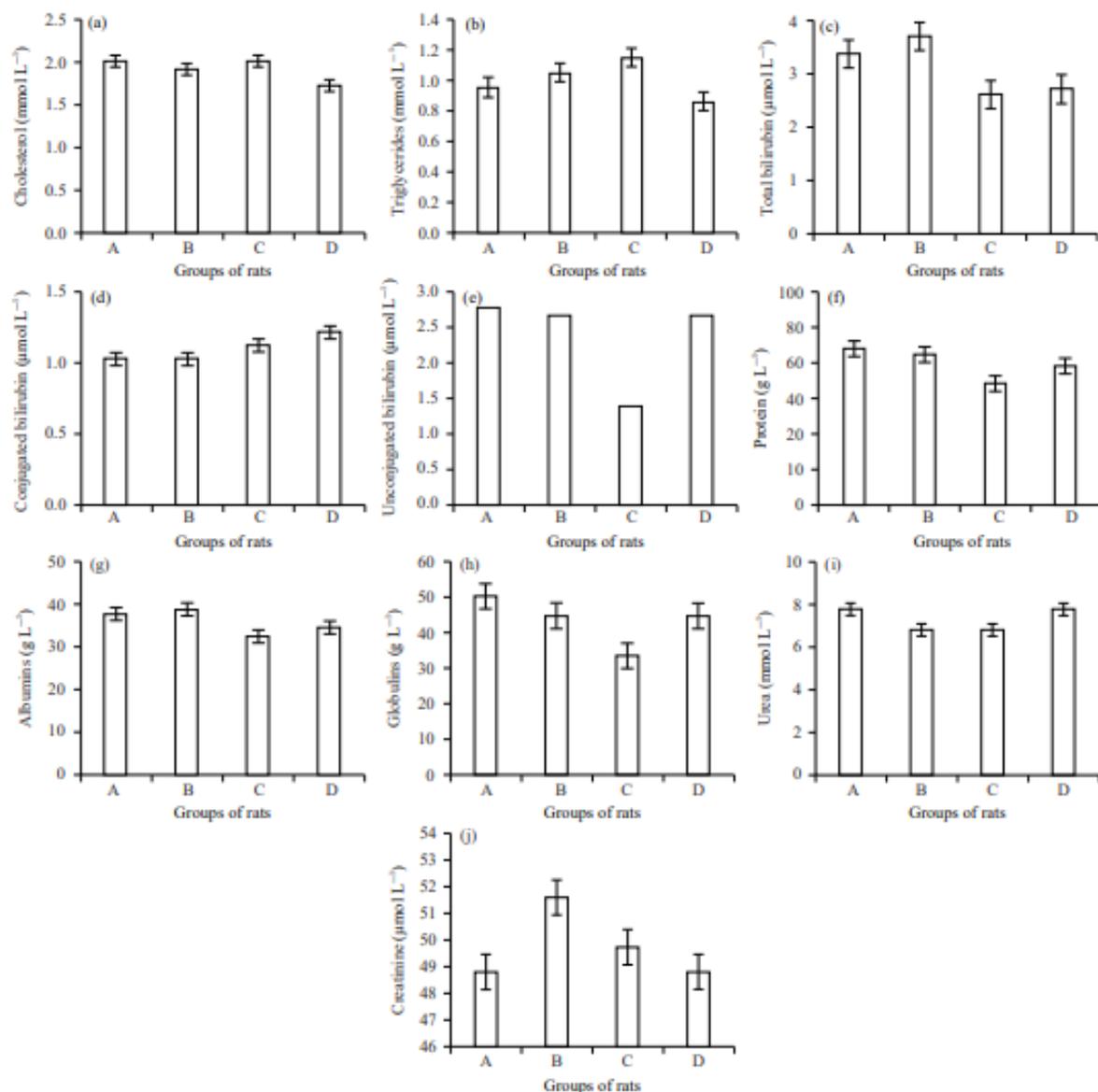


Fig.5(a-j): Complete blood analysis in rats to detect signs of toxicity (a) measurement of blood cholesterol in rats to detect signs of toxicity by exposure for 14 days to MIP, (b) measurement of triglycerides, (c) measurement of total bilirubin, (d) measurement of conjugated bilirubin, (e) measurement of unconjugated bilirubin, (f) measurement of proteins, (g) measurement of albumins, (h) measurement of globulins (i) measurement of urea (j) measurement of creatinine 4-VP: 4-vinylpyridine, MIP: molecular impression polymer. Average values of cholesterol in rats: 1.21-3.13 mmol L⁻¹. Groups A and B subject to conditioning associated with the odor emanated by MIP's and a sweetened solution; group C with multiple water-based hydration sources and a SDRD with MIP's; group D with multiple solution-based hydration sources sweetened and a SDRD with MIP's. Typical values of triglycerides in rats: 0.41-2.19 mmol L⁻¹, Average values of total bilirubin in rats: 2.0-9.0 μmol L⁻¹, conjugated bilirubin (normal values in rats): 0.08-1.33 μmol L⁻¹, average values of unconjugated bilirubin in rats: 1.92-7.67 μmol L⁻¹, typical values of proteins in rats: 36-77 g L⁻¹, typical values of albumins in rats: 21-46 g L⁻¹, average values of globulins in rats: 3.0-35.0 g L⁻¹, Average values of urea in this species: 4.64-7.49 mmol L⁻¹, Average values of creatinine in rats: 27-35 μmol L⁻¹

vascular disorders, signs of liver disease or the presence of inflammatory processes. However, the increase in globulin, urea and creatinine values suggests a tissue degradation resulting from an increase in muscle activity due to competition between rats to reach sources of hydration during the period of exposure to the MIP contained in the DRDS.

DISCUSSION

For the synthesis of MIP, the Brønsted-Lowry basic type 4-vinyl pyridine monomer was chosen, the nitrogen in its molecule can act as a donor of electron pairs and its benzene ring provides the necessary hydrophobicity to interact with the last molecule. The most common monomer: Crosslinker: Template ratio in molecular printing technology was selected²⁵.

The literature suggests using protic or polar solvents³², selecting acetonitrile for the present work as a solvent of medium polarity, avoiding competition between the medium and most of the interactions between monomer and the template as well as the hydrophobic forces involved in the monomer-template relationship.

The results obtained suggest that the adsorption is due more to the affinity between the monomer and the template than to the imprinting process, an adsorption phenomenon is observed in the surface area of the polymer, which assumes a discrete cross linking of low porosity and therefore a reduced adsorption area in the interior²⁵.

The concentration-dependent effect on the adsorption of MIPs was detected due to the existence of a wide surface area of nonspecific binding sites and limited molecular recognition sites.

In general, the effect of molecular imprinting is observed at low concentrations since the number of sites with molecular recognition capacity is always lower than the amount with which the polymer was molded, forming a large non-specific adsorption surface. Therefore, the process consists of two phases, the first consisting of the occupation of specific spaces and the second in the union of non-specific sites. Therefore, in low concentrations, the imprint effect can be appreciated³³.

To observe the desorption behavior, a method for determining the template molecule was developed by removing the remaining substrate by exposing the MIP to a solution of H₂O: Methanol (1: 1), improving the solubility of the substrate, prolonging evaporation time and preventing the generation of additional signals at the wavelengths³⁴.

The desorption of the MIP in three different environments, aimed to determine the viability of the emanation of a clear odorant stimulus, unmistakable and constant that allows its use for the conditioning of detector dogs in field conditions, therefore, the compound was subjected to extreme storage environments for 7 days in order to record the degradation or modification of the qualities of the proposed compound, for the batch contained in an open system, it was observed that between 0 and 6 hrs no detectable changes in concentration were recorded, MIP4-VP was able to retain in most of the adsorbed molecules, due to its monomer-template affinity, from 9 hrs the average desorption of methyl benzoate was 10%, at 24 hrs 12% of desorption, the highest proportion was up to 48 hrs with a value of 36%, subsequent desorption had a slower behavior as observed in Table 1 and Fig. 4, assuming that this behavior is attributed to desorption from the unspecified area as the solute was not associated, the acceleration of desorption was observed due to the incorporation of the substrate in the multilayer³⁵⁻³⁷.

During the first 168 hrs, a desorption rate of 49.12% was reached, in the period between 48 and 168 hrs, the reduction of desorption to only 12% was observed, attributed to greater stability in the interactions of the imprinted functional groups, in addition to the tendency to the equilibrium concentration of the released and desorbed substrate, demonstrating a continuous odorant emanation from MIP4-VP fulfilling the purpose for which the compound was designed.

The results of the hematological analysis show normal values, except for the elevated levels of globulins and creatinine, values that can be attributable to fatigue or muscle injury, caused by handling during the conditioning and competition sessions in the group to reach the source of hydration during each session^{38,39}.

CONCLUSION

The present study results demonstrate that the "molecular imprint polymer" design technology is a robust option for the controlled adsorption and desorption of a wide variety of odor signatures. The adsorption equilibrium was reached relatively quickly, whereas the desorption is considerably longer concerning most existing commercial products. Due to their affinity, substrate specificity and chemical stability, in addition to making polymer refills with practically similar performance possible, reducing costs and waste generation.

The adsorption specificity of MIP's provides an excellent ability to remove methyl benzoate, giving MIP an alternative

use as a sorbent in the removal of degradation products from real drugs, offering the opportunity of forensic use for the collection and identification of polluting residues even in aqueous media.

SIGNIFICANCE STATEMENT

The present study achieved the design of a matrix to control the desorption of the most important odoriferous component of the isothermal decomposition of Cocaine HCl, which simulates the odorous stimulus of this drug, its desorption behavior was characterized in different environmental conditions, guaranteeing the intensity, purity and harmlessness. It was possible to design a new conditioning adjuvant with great potential for the training of drug-detecting animals.

REFERENCES

1. Yáñez-Sedeño, P., L. Agüí, R. Villalonga and J.M. Pingarrón, 2014. Biosensors in forensic analysis. A review. *Analytica Chim. Acta*, 823: 1-19.
2. De Castro, A.C.V., Á. Araújo, A. Fonseca and I.A.S. Olsson, 2021. Improving dog training methods: Efficacy and efficiency of reward and mixed training methods. *PLoS ONE*, Vol. 16. 10.1371/journal.pone.0247321.
3. Haverbeke, A., B. Laporte, E. Depiereux, J.M. Giffroy and C. Diederich, 2008. Training methods of military dog handlers and their effects on the team's performances. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, 113: 110-122.
4. Kranz, W.D., N.A. Strange and J.V. Goodpaster, 2014. "Fooling fido"-chemical and behavioral studies of pseudo-explosive canine training AIDS. *Anal. Bioanalytical Chem.*, 406: 7817-7825.
5. Herz, R.S., 2005. Odor-associative learning and emotion: Effects on perception and behavior. *Chem. Senses*, 30: i250-i251.
6. Furton, K.G. and L.J. Myers, 2001. The scientific foundation and efficacy of the use of canines as chemical detectors for explosives. *Talanta*, 54: 487-500.
7. Sellergren, B. and C.J. Allender, 2005. Molecularly imprinted polymers: A bridge to advanced drug delivery. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 57: 1733-1741.
8. Udo, M.S.B., M.A.A. da Silva, S. de Souza Prates, L.F. Dal'Jovem and S. de Oliveira Duro *et al.*, 2021. Anhydroecgonine methyl ester, a cocaine pyrolysis product, contributes to cocaine-induced rat primary hippocampal neuronal death in a synergistic and time-dependent manner. *Arch. Toxicol.*, 95: 1779-1791.
9. Lapachinske, S.F., G.G. Okai, A. dos Santos, A.V. de Baires and M. Yonamine, 2015. Analysis of cocaine and its adulterants in drugs for international trafficking seized by the Brazilian federal police. *Forensic Sci. Int.*, 247: 48-53.
10. Lai, H., I. Corbin and J.R. Almirall, 2008. Headspace sampling and detection of cocaine, MDMA, and marijuana via volatile markers in the presence of potential interferences by solid phase microextraction-ion mobility spectrometry (SPME-IMS). *Anal. Bioanal. Chem.*, 392: 105-113.
11. Lorenzo, N., T. Wan, R.J. Harper, Y.L. Hsu, M. Chow, S. Rose and K.G. Furton, 2003. Laboratory and field experiments used to identify *Canis lupus var. familiaris* active odor signature chemicals from drugs, explosives and humans. *Anal. Bioanalytical Chem.*, 376: 1212-1224.
12. Mayes, A.G. and M.J. Whitcombe, 2005. Synthetic strategies for the generation of molecularly imprinted organic polymers. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 57: 1742-1778.
13. Spivak, D.A., 2005. Optimization, evaluation, and characterization of molecularly imprinted polymers. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 57: 1779-1794.
14. Simon, A., L. Lazarowski, M. Singletary, J. Barrow and K.V. Arsdale *et al.*, 2020. A review of the types of training AIDS used for canine detection training. *Front. Vet. Sci.*, Vol. 7. 10.3389/fvets.2020.00313.
15. Rice, S. and J.A. Koziel, 2015. Odor impact of volatiles emitted from marijuana, cocaine, heroin and their surrogate scents. *Data Brief*, 5: 653-706.
16. Rice, S. and J.A. Koziel, 2015. Characterizing the smell of marijuana by odor impact of volatile compounds: An application of simultaneous chemical and sensory analysis. *PLoS ONE*, Vol. 10. 10.1371/journal.pone.0144160.
17. D'Aurelio, R., I. Chianella, J.A. Goode and I.E. Tothill, 2020. Molecularly imprinted nanoparticles based sensor for cocaine detection. *Biosensors*, Vol. 10. 10.3390/bios10030022.
18. Turiel, E. and A.M. Esteban, 2020. Molecularly Imprinted Polymers. In: *Solid-Phase Extraction*, Poole, C.F. (Ed.), Elsevier Inc., pp: 215-233.
19. Alexander, C., H.S. Andersson, L.I. Andersson, R.J. Ansell and N. Kirsch *et al.*, 2006. Molecular imprinting science and technology: A survey of the literature for the years up to and including 2003. *J. Mol. Recognition*, 19: 106-180.
20. Bahrani, S., R. Aslani, S.A. Hashemi, S.M. Mousavi and M. Ghaedi, 2021. Introduction to Molecularly Imprinted Polymer, Adsorption: Fundamental Processes and Applications. In: *Interface Science and Technology*, Ghaedi, M. (Ed.), Elsevier, New York, pp: 511-556.
21. Pardo, A., L. Mespouille, P. Dubois, P. Duez and B. Blankert, 2012. Targeted extraction of active compounds from natural products by molecularly imprinted polymers. *Open Chem.*, 10: 751-765.

22. Xu, X., X. Chen, L. Yang, Y. Zhao and X. Zhang *et al.*, 2020. Film-like bacterial cellulose based molecularly imprinted materials for highly efficient recognition and adsorption of cresol isomers. *Chem. Eng. J.*, Vol. 382. 10.1016/j.cej.2019.123007.
23. Zhao, M., X. Chen, H. Zhang, H. Yan and H. Zhang, 2014. Well-defined hydrophilic molecularly imprinted polymer microspheres for efficient molecular recognition in real biological samples by facile raft coupling chemistry. *Biomacromolecules*, 15: 1663-1675.
24. Luliński, P., 2017. Molecularly imprinted polymers based drug delivery devices: A way to application in modern pharmacotherapy. *A review. Mater. Sci. Eng.-C*, 76: 1344-1353.
25. Guć, M. and G. Schroeder, 2017. The molecularly imprinted polymers. Influence of monomers on the properties of polymers-A review. *World J. Res. Rev.*, 5: 36-47.
26. Ansari, S., 2017. Application of magnetic molecularly imprinted polymer as a versatile and highly selective tool in food and environmental analysis: Recent developments and trends. *TrAC Trends Anal. Chem.*, 90: 89-106.
27. Soledad-Rodríguez, B., P. Fernández-Hernando, R.M. Garcinuño-Martínez and J.S. Durand-Alegría, 2017. Effective determination of ampicillin in cow milk using a molecularly imprinted polymer as sorbent for sample preconcentration. *Food Chem.*, 224: 432-438.
28. Figueiredo, L., G.L. Emy, L. Santos and A. Alves, 2016. Applications of molecularly imprinted polymers to the analysis and removal of personal care products: A review. *Talanta*, 146: 754-765.
29. Onuma, T. and N. Sakai, 2016. Higher-order conditioning of taste-odor learning in rats: Evidence for the association between emotional aspects of gustatory information and olfactory information. *Physiol. Behav.*, 164: 407-416.
30. Ruiz-Salas, J.C., L.G. de la Casa and M.R. Papini, 2020. Dimensions of sucrose solutions in the successive negative contrast effect. *Learn. Motivation*, Vol. 69. 10.1016/j.lmot.2020.101615.
31. Vasapollo, G., R.D. Sole, L. Mergola, M.R. Lazzoi, A. Scardino, S. Scorrano and G. Mele, 2011. Molecularly imprinted polymers: Present and future prospective. *Int. J. Mol. Sci.*, 12: 5908-5945.
32. Tamayo, F.G., E. Turiel and A. Martín-Esteban, 2007. Molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction and solid-phase microextraction: Recent developments and future trends. *J. Chromatogr. A*, 1152: 32-40.
33. Hillberg, A.L., K.R. Brain and C.J. Allender, 2005. Molecularly imprinted polymer sensors: Implications for therapeutics. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 57: 1875-1889.
34. Aihebaier, S., T. Muhammad, A. Wei, A. Mamat and M. Abuduaini *et al.*, 2019. Membrane-protected molecularly imprinted polymer for the microextraction of indole-3-butyric acid in mung bean sprouts. *ACS Omega*, 4: 16789-16793.
35. Wilson, D.A. and R.J. Stevenson, 2003. Olfactory perceptual learning: The critical role of memory in odor discrimination. *Neurosci. Biobehavioral Rev.*, 27: 307-328.
36. Holdsworth, C.I., M.C. Bowyer, C. Lennard and A. McCluskey, 2005. Formulation of cocaine-imprinted polymers utilizing molecular modelling and NMR analysis. *Aust. J. Chem.*, 58: 315-320.
37. Quignon, P., M. Giraud, M. Rimbault, P. Lavigne and S. Tacher *et al.*, 2005. The dog and rat olfactory receptor repertoires. *Genome Biol.*, Vol. 6. 10.1186/gb-2005-6-10-r83.
38. Ochiai, Y., A. Baba, M. Hiramatsu, N. Toyota and T. Watanabe *et al.*, 2018. Blood biochemistry and hematological changes in rats after administration of a mixture of three anesthetic agents. *J. Vet. Med. Sci.*, 80: 387-394.
39. Boehm, O., B. Zur, A. Koch, N. Tran, R. Freyhagen, M. Hartmann and K. Zacharowski, 2007. Clinical chemistry reference database for wistar rats and C57/BL6 mice. *Biol. Chem.*, 388: 547-554.

Una característica que se observó del SOI*h* fue su capacidad de desorber ácido acético presente en el ambiente con la capacidad de retener el odorante durante varios días. Por ello se decidió adsorber ácido acético en el SOI*h*, funcionando como un método de liberación retardada de ácido acético.

A) Infrarrojo de acrilamida y MIP_{AA}:

Se observó en el espectro IR del monómero, el MIP y el MIP cargado, en donde se aprecian las características del monómero acrilamida, el SOI*h*, en donde se observan las características descritas en la Figura 15, Cuadro 5.

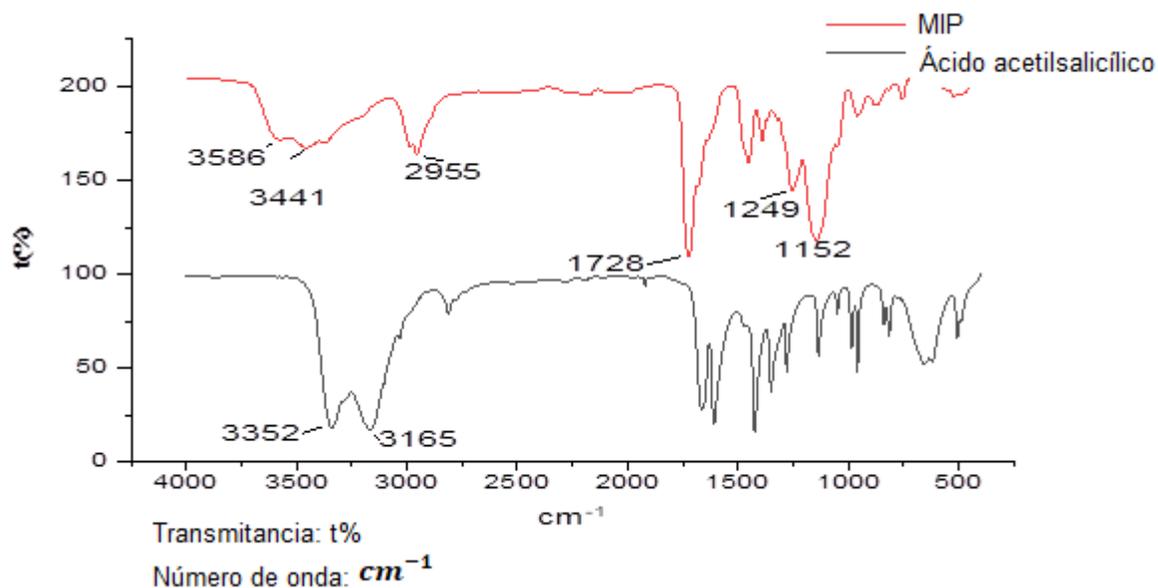


Figura 15.-Espectros infrarrojos del MIP de ácido acetyl salicílico.

Cuadro 5: Características de la Espectrofotometría de infrarrojo de acrilamida y SOlh cargado

Espectro	Señal (cm ⁻¹)	Cualidad	Grupo funcional
Acrilamida	3352	Pérdida en los infrarrojos de MIP por polimerización, dos bandas (simétrica y asimétrica). Grupo polimerizable en interacción con el entrecruzador. desaparece el infrarrojo por polímero formado	Aminas tensión N-H
	3615		
Entrecruzador EGDMA	1728	carboxilo del entrecruzador EDGMA característico de un éster.	C=O del grupo éster.
AAS		Posiblemente empalma al éster. No se precisa por la baja concentración del compuesto.	Grupo acetil

AA.- Acrilamida, MIPh: Sistema odorífero imitador de heroína

B) Ácido acético:

Se incluyó como desorbente principal, debido a la capacidad del MIP para desorberlo e incluso adsorberlo si está presente en el ambiente, cualidad atribuida a la capacidad de interacción del monómero acrilamida y el AA, logrando una formulación diseñada para la retención del 12% de ácido acético y 2% de ácido acetilsalicílico, observando el odorante como el principal componente en el análisis de cromatografía mediante la técnica de Head Space (Figuras 19 y 20), en el mismo estudio se observaron señales que pueden relacionarse con la presencia de contaminantes.

Adsorción:

La máxima capacidad de carga de AAS fue de 121.237 mg/g de AA equivalente a un valor aproximado al 12% de la superficie de un gramo de polímero, desafortunadamente, esta concentración no produce una cantidad importante de ácido acético como resultado de la degradación de la molécula molde.

Identificación de ácido acético:

La técnica de cromatografía denominada Head Space es una de las mejores opciones para cuantificar el ácido acético presente en el espacio de cabeza de muestras heroína, similar a la degradación del ácido acetilsalicílico, se determinó cualitativamente la presencia de ácido acético en el espacio sobrenadante de muestras de *SOIh* cargado con ácido acético al 10% y AAS al 3%, conforme a lo que se muestra en la figura 16 y 17; comparando el registro con AAS puro, observando la dominancia del odorante, con un tiempo de retención de 1.263 minutos [130].

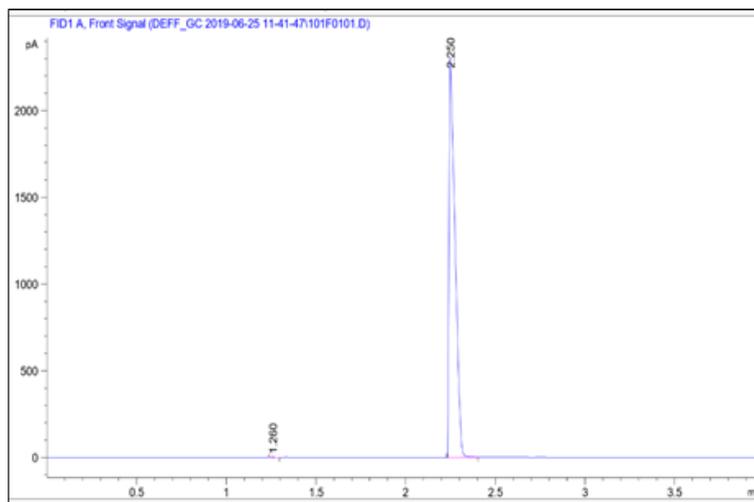


Figura 16.-Registro cromatográfico del espacio de cabeza de una muestra de ácido acético. [116, 131]

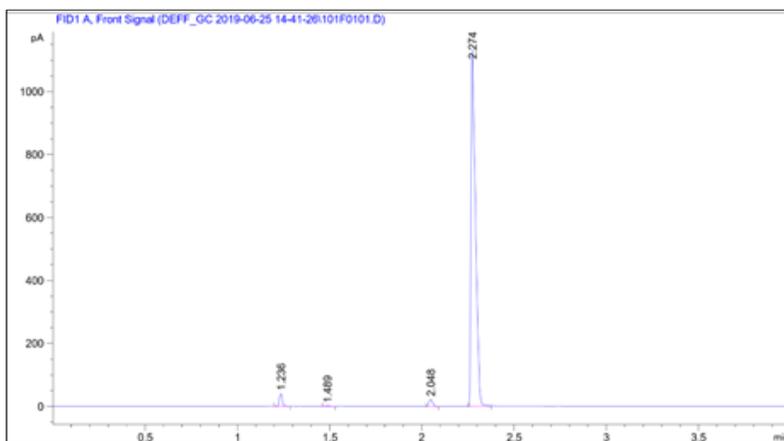


Figura 17.-Registro cromatográfico de los Compuestos encontrados en el espacio de cabeza de una muestra de SOIh. [116, 131]

La capacidad de retención del soluto, al parecer se debe a la presencia de puentes de hidrógeno similares entre el monómero acrilamida-AAS y acrilamida-CH₃COOH interactuando en los mismos grupos funcionales, conforme a la figura 18; adquiriendo un comportamiento de liberación extendida de ácido acético debido a un constante equilibrio entre la superficie polimérica y el entorno.

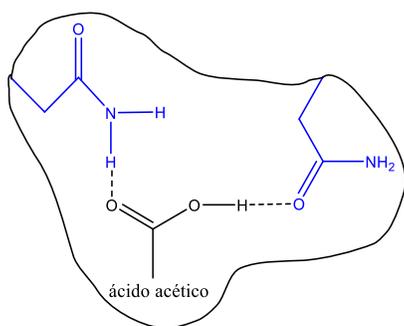


Figura 18.-Posibles interacciones de los enlaces de hidrógeno del monómero acrilamida y el ácido acético del SOIh. [116, 131]

Respecto al odorantes **SOIh**, las características de la cavidad, aunada a la generación de sitios de reconocimiento entre polímero y horma (Figura 18) ofrecen la oportunidad de no sufrir contaminación por odorantes ajenos como ocurre con otro tipo de matrices o desorbentes [93].

9.1.3.- Caracterización del imitador (SOIm):

Se observó que los tres ejemplares respondieron satisfactoriamente al producto con una concentración al 20%, por lo que fue el compuesto sujeto a la evaluación en: las fases de condicionamiento y toxicidad en ratas; condicionamiento y estudio hematológico en perros y la evaluación de la respuesta a la exposición del odorante en veinte perros previamente condicionados en la detección de marihuana.

9.2.- Modelo Biológico “A” “B” y “C”

Observando el comportamiento resultado del condicionamiento asociado al olor de ratas (Modelo Biológico “A”) y perros (Modelo Biológico “B”), además de la exposición a los odorantes a perros previamente condicionados (Modelo Biológico “C”) provenientes de cuatro diferentes centros especializados en el adiestramiento y uso de perros detectores, cuya principal característica es el uso de fuentes de olor diferentes a los diseñados para el presente trabajo. Se determinó la tasa de éxito/repetición (SRs):

Tasa SR= (éxito/repeticiones) *100

Porcentaje de la respuesta=Tasa SR*(100)

comparando los resultados mediante el método de Chi cuadrada (ver Cuadros 6, 7, 8, 9).

Cuadro 6.- Tasa de éxito/repetición (SR) y análisis de Chi cuadrada (Valor de $X^2:0.05$) en las diferentes fases de condicionamiento con imitadores de heroína (SOlh) y cocaína (SOlc) de ratas.

Olorante/Sujeto	Olor combinado		Individualización c/reforzador		Individualización s/reforzador	
	Condicionamiento	Discriminación	AA	MB	AA	MB
1	46	20	3	3	23	22
2	46	24	4	4	24	24
3	50	22	4	4	24	24
4	50	24	4	4	23	24
5	48	22	4	4	24	23
6	48	20	4	4	24	24
7	48	20	4	4	24	24
Total	336	152	27	27	166	165
Porcentaje	96%	95%	96.43%	96.43%	98.81%	97.62

Fases/Respuesta	SR
Discriminación	96%
Extinción	97%
SOlc (Reforzador)	96.43%
SOlh (Reforzador)	96.43%
SOlc	97.62%
SOlh	98.81%

$X^2: 34.26$
Cuadro: 3.84
SR combinado=91.96%

Cuadro 7.- Tasa de éxito/repetición (SR) y análisis de Chi cuadrada (Valor de $X^2:0.05$) en las diferentes fases de condicionamiento el imitador de cannabis (SOlm) de ratas.

	Discriminación	Extinción	Total	$X^2:5.66$ Cuadro: 3.84 Tasa SR: 96.82%
Acierto	634	280	914	
No acierto	28	2	30	
Total	662	282	944	
Porcentaje	95.77	99.29		

Cuadro 8.- Tasa de éxito/repetición (SR) y análisis de Chi cuadrada (Valor de $X^2:0.05$) en las diferentes fases de condicionamiento asociado a los olores emanados por imitadores de clorhidrato de cocaína (SOIc), heroína (SOIh) y cannabis (SOIm) de perros.

	Olor combinado			$X^2: 6.57$ Cuadro: 3.84 Tasa SR: Discriminación/Extinción: 90.14% Individualización: 98.15% General: 93.60%
	Acierto	No acierto	Total	
Discriminación/Extinción	128	14	142	
Individualización	106	2	108	
Total	234	16	250	

Cuadro 9.- Tasa de éxito/repetición (SR) y análisis de Chi cuadrada (Valor de $X^2:0.05$) de la respuesta a los olores emanados por los imitadores de clorhidrato de cocaína (SOIc), heroína (SOIh) y cannabis (SOIm) en un ensayo multicéntrico doble ciego (DBMT) realizado en cuatro diferentes centros de adiestramiento.

Empresa	SOIc					$X^2: 8.4556$ Tasa SR: 90%
	A	B	C	D	Total	
Completa	6	7	2	3	18	
Parcial	0	0	2	0	2	
Total	6	7	4	3	20	
Empresa	SOIh					$X^2: 3.6937$ Tasa SR: 90%
	A	B	C	D	Total	
Completa	6	5	4	3	18	
Parcial	0	2	0	0	2	
Total	6	7	4	3	20	
Empresa	SOIm					$X^2: 4.12$ Tasa SR: 95% Valor en Cuadro: 7.81
	A	B	C	D	Total	
Completa	6	7	3	3	19	
Parcial	0	0	1	0	1	
Total	6	7	4	3	20	

además de contrastar los parámetros hematológicos antes y después del período de condicionamiento (Cuadro 10 y 11).

Cuadro 10.- Química sanguínea en ratas, sometidas a un proceso de condicionamiento asociado días al olor de SOIc/SOIh y SOIm durante un período de 14 días.

Parámetro	Valores de referencia		Valores observados			
	Mínimo	Máximo	SOIc/SOIh		SOIm	
			Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
Colesterol (mmol/L)	1.21	3.13	1.68	2.15	1.63	1.89
Triglicéridos (mmol/L)	0.41	2.19	0.90	1.05	1.4	1.8
Bilirrubina total (µmol/L)	2.00	9.00	2.30	3.45	1.3	1.8
Bilirrubina conjugada (µmol/L)	0.08	1.33	0.60	1.20	0.4	1.4
Bilirrubina no conjugada (µmol/L)	1.92	7.67	1.20	2.55	0.4	1.4
Proteínas (g/L)	36.00	77.00	64.00	82.00	63	70
Albuminas (g/L)	21.00	46.00	33.00	37.50	32	34
Globulinas (g/L)	3.00	35.00	31.00	44.50	31	36
Urea (mmol/L)	14.00	22.00	7.3	8.75	9	10
Creatinina (µmol/L)	37.00	53.00	49.00	54.50	51	53

Cuadro 11.- Hemograma de perros, sometidos a un proceso de condicionamiento asociado al olor de SOIc, SOIh, y SOIm durante un período de 14 días.

Analito	Referencia		Unidad	Jordan I	Chaco I	Reno I	Media
Hematocrito	0.37	0.55	L/L	0,54	0,58	0,51	0.54
Hemoglobina	120	180	g/L	184	201	175	186.67
Eritrocitos	5,5	8.5	$x10^{12}/L$	7,9	9,1	7,5	8.17
VGM	60	77	fL	68	63	68	66.33
CGMH	320	360	g/L	340	346	343	343
Reticulocitos	< 60		$x10^9/L$	-	-	-	-
Plaquetas	200	600	$x10^9/L$	332	300	264	298.67
Solidos totales	60	75	g/L	78	76	72	75.33
Leucocitos	6	17	$x10^9/L$	12,7	8,4	12,0	11.03

Diferencial de leucocitos							
Neutrófilos	3	11,5	$x10^9/L$	6,1	5,8	7,1	6.33
Bandas	0		$x10^9/L$	0	0	0	0
Metamielocitos	0		$x10^9/L$	0	0	0	0
Mielocitos	0		$x10^9/L$	0	0	0	0
Linfocitos	1	4.8	$x10^9/L$	3.4	1,5	3,7	2.87
Monocitos	0.1	1.4	$x10^9/L$	0.5	0,5	0,7	0.57
Eosinófilos	0	0.9	$x10^9/L$	2.3	0,6	0,54	1.15
Basófilos	Raros		$x10^9/L$	0.4	0	0	0.13

10.- Discusión

El estímulo odorífero producido por los COV's deben ser capaces de producir una respuesta tanto en métodos instrumentales como en sistemas biológicos [78], al respecto, estudios de cromatografía de gases y espectrometría de masas muestran al ácido acético como compuesto dominante de la heroína y el metil benzoato del clorhidrato de cocaína [56, 73, 77], este principio no se cumple en el caso de la *Cannabis sativa* y sus derivados, dado que la firma odorífera se compone de diversos COV's (α -pineno, β -pineno, mirceno, limoneno y en muchos casos β -cariofileno), los cuales cambian en proporción de acuerdo a la variedad, tiempo de cultivo, cosecha, entre otros factores. Fedorkov propone en su trabajo un sistema mixto, mediante la combinación de materiales resultado de la industrialización del Cannabis y la adición de diversos odorantes, por el contrario, la empresa Sigma-Aldrich ofrece un compuesto formulado a base de P-Menta-1,4-dieno, diseñado bajo un criterio similar a los SOIc y SOIh, diseñados a partir de un odorante representativo de la firma odorífera de la sustancia a detectar (Cuadro 3) [63, 83,126, 132].

Dos de los imitadores propuestos se prepararon mediante el método de polimerización de impronta molecular y un tercero mediante impregnación húmeda, observando en el perfil de liberación de SOIc y análisis cromatográfico del volátil de SOIh, la emanación del odorante con una calidad, intensidad y pureza que demuestra el control de la liberación del volátil representativo de la firma odorífera, por lo que la fase instrumental expone la viabilidad de la formulación usando matrices específicas para cada compuesto. Los polímeros se molieron y tamizaron con el propósito de disponer de un granulado con un tamaño de partícula promedio de 250 micras, con el fin de controlar parámetros como área superficial y número de sitios entre las muestras y favorecer la reproducibilidad de los resultados.

Durante las fases del ensayo se observó la sensibilidad de los diferentes métodos de detección a tamaños de muestras que oscilaron entre 40 mg diluidos en 20 mL

(SOIc), 20 ± 1.6 mg para el condicionamiento de ratas y hasta 120 mg para el condicionamiento y ensayo multicéntrico de perros.

El 4-vinil piridina y la acrilamida usados para formar la horma del SOIc y SOIh, forman parte de un grupo de monómeros comúnmente usados en la tecnología de diseño de polímeros de impronta molecular, se cuenta con una base sólidamente documentada respecto a la relación estequiométrica entre monómero-entrecruzador-horma para alcanzar la polimerización y formación de los espacios, requerida para cada caso, los criterios de selección para uno u otro compuesto giran alrededor del punto central del polímero: la cavidad de la molécula que se desea hormar y la naturaleza de su unión.

El diseño de los polímeros propuestos permitió alcanzar los objetivos de desorción propuestos, superando las características de la tecnología más usada en la actualidad, además de agregar la posibilidad de reutilización debido al efecto de memoria [117, 119], reproducibilidad, bajo costo y un menor requerimiento para el condicionamiento de la especie blanco, dado que el tamaño de muestra utilizada fue de 120 mg.

La existencia de una considerable área de adsorción en el interior y la reducida proporción de sitios de reconocimiento molecular, se refleja en el requerimiento inferior de la horma respecto a la cantidad usada para su diseño, predominando la superficie no específica, ocupando primero las estructuras moldeadas y posteriormente la inespecíficas.

Se observó que la adsorción es dependiente de la concentración, debido a la existencia de una amplia superficie de unión inespecífica respecto a los sitios de reconocimiento molecular, que siempre son en menor cantidad [100]. Se determinó que SOIc muestra una desorción controlada durante más de 7 días en condiciones de campo, en la prueba de entornos diferentes de SOIc se observó una emanación constante del odorante durante más de 168 h garantizando un estímulo nítido, constante e inconfundible, que permite el condicionamiento y mantenimiento del

comportamiento en condiciones de campo, confrontando su rendimiento con un compuesto elaborado mediante impregnación húmeda en silica gel, siendo esta una tecnología común en la manufactura de estos de productos, observando claras desventajas respecto a los productos propuestos [64, 115, 126].

La desorción térmica es uno de los métodos más efectivo para liberar analitos de su matriz ya que aprovecha la energía cinética derivada del incremento de la temperatura para que haya una mayor presencia de moléculas volátiles liberadas de su matriz, mejorando la transferencia de masa que pasa a través de la matriz, aumentando su concentración en el espacio de cabeza, e incrementando a la vez la presión de vapor [133].

A la fecha existen pocas publicaciones dedicadas a la determinación de ácido acético incluido en matrices sólidas, incluyendo la técnica de Head Space; debido a que los sólidos tienden a tener poca homogeneidad en una muestra y por tal motivo una reproducibilidad pobre para su análisis. Por lo que se aplicó el método reportado por Adorno, para soluciones líquidas en donde se equilibra en un baño de aceite a 85°C durante 10 minutos, cabe hacer mención que la temperatura de ebullición del CH_3COOH es de 118°C, por lo que a temperaturas menores entra en equilibrio por incremento de presión, esta condición pone en riesgo al analista por la probabilidad de ruptura del vial, por lo que el ensayo se centró únicamente en la determinación cualitativa de la presencia de ácido acético [130].

En el registro del SOI*h* (Figura 17) se observaron señales que pueden relacionarse con la presencia de contaminantes derivados de los materiales de polimerización, esto no representa un riesgo, debido a que por el fenómeno de generalización el aprendiz es capaz de discernir el olor separado de la matriz [56]. Si el olor de la matriz interfiere en el proceso de condicionamiento, es posible exponer al ejemplar a la matriz sola sin odorante (Blanco), ni reforzador, recurriendo a la capacidad de discriminación olfativa del olor objetivo y el odorante de la matriz, esta es una práctica común en algunos productos comerciales [66].

La evaluación de la capacidad de condicionamiento de los SOI se realizó mediante el registro de seguimiento y discriminación del odorífero emanado en ratas condicionadas mediante AEA a los dos odorantes simultáneamente y su posterior separación. El condicionamiento consistió en la localización del BBCO con olor y reforzador, cambiándolo de ubicación en cada repetición además de variar los lapsos de contacto con el BBCO cargado.

La primera fase consistió en la asociación de ambos olores, simulando a pequeña escala, el procedimiento general de condicionamiento de perros detectores usado por un sector de adiestradores profesionales [60, 61]. A partir de la segunda etapa se evaluó la respuesta de las ratas al complicar la ubicación del BBCO cargado al adicionar factores, como el incremento de bebederos vacíos (discriminación), exposición a los olores separados (individualización del olor) y por último el retiro gradual del reforzador hasta su completa eliminación (extinción), determinando la dependencia entre el estímulo oloroso y ubicación de la fuente de hidratación mediante el análisis estadístico por el método de Chi cuadrada y expresando los resultados en porcentaje, expresado la tasa SR, como el índice de ocasiones en las que cada animal localiza la fuente de hidratación asociada al olor, respecto al número de ejercicios realizados en cada fase.

Primer grupo (SOI α /SOI h): Consistente en un proceso de condicionamiento simultáneo mediante el método de generalización.

Asociación: Al inicio del proceso los sujetos mostraron la mayor frecuencia de error, incluso en el cuarto día, en el 28.57% de las sesiones algún sujeto no respondió al condicionamiento, observando una tasa SR 97.09% en la ubicación de la fuente de hidratación, la diferencia entre la sesión con mayor y menor éxito fue de 12.5%.

Verificación: En los días cinco y seis los sujetos no incurrieron en error observando una tasa SR 100%, razón por la que se descartó del análisis estadístico.

Discriminación: Se incluyeron cuatro BBCO's similares, sin odorantes, en esta fase se observó que la mayor frecuencia de error fue en el primer día, a partir del segundo día, los sujetos no incurrieron en error, solo en el 14.28% de las sesiones algún sujeto no respondió al condicionamiento, mostrando una mejora respecto a la fase anterior, con una SR 95%.

Individualización de olores, en condiciones similares a la etapa anterior se prepararon BBCO's similares para cada odorante, realizando sesiones independientes para cada olor, los sujetos mostraron la mayor frecuencia de error en la primera exposición, sin embargo, a partir del segundo ejercicio ya no incurrieron en error, observando una tasa SR 96.43%; cabe hacer mención que esta etapa se llevó a cabo en una sola sesión, con el fin de observar la respuesta a cada olor por separado, con el propósito de evaluar el fenómeno de generalización producido por la combinación de los SOI's.

Extinción: El proceso de condicionamiento concluyó con la eliminación gradual del edulcorante o reforzador, sustituyendo por agua potable, a la conclusión de este período se ofreció únicamente agua, exponiendo olores por separado observando que en el 14.28% de las repeticiones algún sujeto no respondió al condicionamiento, resultando en una tasa SR 96.42%. En esta fase se analizó por separado la respuesta entre los odorantes, SOIc (SR 97%), SOIh (SR 98.81%), sin embargo, sus valores no representaron una diferencia estadística entre sí, resultados que se muestran en la Cuadros 6, 7.

Segundo grupo (SOIm): Bajo las mismas condiciones del grupo anterior el proceso de condicionamiento se integró de una fase de asociación, seguida de discriminación y extinción del reforzador, siendo estas las fases sujetas al análisis estadístico, con el fin de determinar en la discriminación y la extinción la capacidad de localizar la fuente de olor entre varios objetos similares y descartar la posible emanación de olor del soluto contenido en el reforzador, durante el ensayo se observó un una RS 96.82% , durante la fase de extinción se observó una SR 99.29%

en la ubicación de la fuente de emanación del odorante, El resultado del análisis estadístico permite inferir que la respuesta en la elección del bebedero en ambas fases está relacionada con la emanación del olor del SOI m contenido en el BBCO(Cuadro 7).

Se sometió a 3 perros a un programa de condicionamiento con una duración de 14 días, mediante el método de exposición de olores múltiples y separación progresiva, evaluando la eficacia del condicionamiento y la toxicidad por la exposición repetida a los SOI's, usando como reforzador un JBB, usando muestras de 120 ± 3 mg de cada odorante, contenidos en recipientes que impidieran el contacto directo entre los productos y los perros, por lo que se alojaron en una CCO.

El proceso se integró de 3 fases:

Asociación, en donde se expone simultáneamente a los 3 odorantes incitando en cada repetición el deseo de buscar y encontrar el JBB y los odorantes localizados en el interior de un CCO, durante esta fase el SR 100, por lo que el resultado no se incluyó en el análisis estadístico.

Discriminación/Extinción, consistente en el incremento de CCO's por olfatear y la reducción del tamaño del JBB ubicado en el interior del CCO con los odorantes, hasta retirar por completo el reforzador, durante esta etapa se observaron los menores valores de éxito con un SR 90.14%, debido posiblemente al incremento gradual de la complejidad y la reducción paulatina del tamaño del reforzador, por lo que el impacto en el comportamiento es mínimo, sin embargo conforme progreso el proceso el rendimiento de los ejemplares mejoro hasta alcanzar el SR 98.15%, el porcentaje de éxito durante el ensayo fue de SR 93.60%.

Individualización de los olores, presentando cada olor por separado por lo que se preparó un CCO por cada odorante, iniciando con ejercicios similares a la primera etapa, incrementando progresivamente el número y tipo de CCO's vacías hasta llegar al nivel de complejidad similar a la etapa anterior, alcanzando al final una SR del 98.15% (Cuadro 8) [6, 59, 101].

El método de condicionamiento de un olor compuesto es un método usado con frecuencia a nivel de campo, argumentando la reducción de tiempos de formación y mayor eficiencia en el proceso, el propósito de realizar la exposición simultánea fue verificar las cualidades y capacidad de estimulación de cada odorante, mediante la observación de las respuestas condicionadas a cada uno de los olores conforme a lo expuesto por diversos autores [60, 69, 83].

El análisis estadístico de los procesos de condicionamiento en ratas y perros mostró la evidencia de la influencia del odorante como factor para su localización con un valor de $P: 0.05$. Grupo $SOIc/SOIh$, Cuadro 6; Grupo $SOIm$, Cuadro 7, condicionamiento de caninos Cuadro 8.

En esta fase se expuso a 20 ejemplares provenientes de cuatro empresas especializadas en el adiestramiento y uso de perros detectores (Cuadro 4), su condicionamiento se realizó con sustancias diferentes a las propuestas, bajo principios de adiestramiento con características propias de cada centro. El propósito de exponer ejemplares previamente condicionados con sustancias diferentes es evaluar la similitud de la respuesta ante el odorante nuevo, evaluando la robustez del estímulo emanado por el compuesto propuesta, el ejercicio se llevó a cabo en una sola exposición, con el fin de evitar procesos de asociación. Previo a la realización se categorizó la respuesta en tres posibles conductas: Completa (Alerta/Indicación), Parcial (Alerta), Deficiente (Ni alerta, ni indicación).

Durante el ensayo, ningún ejemplar mostro una respuesta deficiente a los odorantes (Cuadro 9), en el caso de $SOIc$ el análisis estadístico mostró que, si hay una diferencia estadísticamente significativa en la respuesta observada por el cambio de odorante, atribuido a que miembros del mismo grupo no mostraron una respuesta completa, posiblemente relacionada a errores en el condicionamiento.

Existen abundantes reportes sobre la vinculación emocional de un olor asociado a un satisfactor gustativo tanto con emociones hedónicas como adversas [3, 4, 45, 136], para que este fenómeno se lleve a cabo, se requiere que ambos estímulos

alcancen un valor fisiológico significativo, para moldear una respuesta [45]. En el presente trabajo, se evaluó la respuesta de ratas al estímulo odorífero emanado por los “imitadores del olor” de heroína (SOI h), cocaína (SOI c) y marihuana (SOI m), evaluando la calidad del estímulo durante las diferentes etapas de condicionamiento y la calidad de la respuesta, concluyendo con la supresión del reforzador gustativo demostrando que no existe interferencia odorífera en la respuesta de los sujetos condicionados y evidenciando que la combinación de olores de los SOI’s y su posterior separación es capaz de producir un aprendizaje eficaz en ratas expuestas por períodos de 10 segundos a distintas fases de entrenamiento.

Se probó la capacidad de las matrices al despertar el interés por la hidratación a lo largo del condicionamiento, así como en la etapa de discriminación, al exponer cada matriz por separado no se observó diferencia significativa alguna que sugiera alteración de las propiedades individuales de los odorantes, ni modificación de la calidad estimulante de cada elemento [10, 56, 125].

El condicionamiento de detección en los perros es una modalidad del AEA al olor, que se da como consecuencia de la combinación simultánea entre un estado anímico específico y un estímulo odorífero emanado de las “Say”. El olor inicialmente tiene un significado fisiológico neutro, por lo que el efecto de la estrecha asociación es la inducción del sistema nervioso para otorgarle un significado particular influyendo de manera determinante la relación del odorante específico, denominado en el ámbito del adiestramiento como “alerta”, de modo que después de una primera experiencia, las siguientes exposiciones a ese olor tendrá un impacto en el estado de ánimo y en consecuencia el individuo repetirá espontáneamente el comportamiento aprendido.

La asociación de un reforzador como lo puede ser comida (técnica ingestiva) o un elemento satisfactor de un comportamiento innato, como cazar, obtener un objeto, etc. asociado a un estímulo odorífero, permite incorporar un segundo elemento conductual destinado a la señalización del sitio de emanación, definido como

“indicación”, otra cualidad del AEA es la posibilidad de condicionar varios olores simultáneamente mediante el proceso de generalización, por lo que a la conclusión del condicionamiento el individuo codificará la misma respuesta a cada uno de los elementos que integraron la combinación, de manera que la mezcla de olores no altera las propiedades individuales, ni modifica la calidad estimulante de cada elemento [3, 45, 56, 58, 59, 60].

Se analizó la evolución de la respuesta de la asociación de un olor compuesto en el condicionamiento de perros detectores, cuando se expone a cada uno de los olores que lo componen, al respecto, existen en la literatura diversos estudios y prácticas que asumen que la respuesta condicionada a olores separados que componen un olor compuesto no muestra una diferencia importante [46, 58, 59], siendo una práctica común en el condicionamiento de perros detectores; a diferencia de los métodos de condicionamiento de olor por olor; permite reducir considerablemente el tiempo de formación [46,136]. En el presente trabajo el propósito fue evaluar cada odorante respecto a sus propiedades individuales y la conservación de la calidad de estimulación de cada elemento durante el aprendizaje [56, 59, 61].

Los resultados indican que los olores se asociaron exitosamente en las ratas con aspectos emocionales relacionados al sentido del gusto; siendo capaces de desencadenar el proceso de respuesta aún en la exposición individual de las matrices, también cabe mencionar que de acuerdo a la respuesta encontrada, se puede asumir la existencia de la relación neuroanatomica del aprendizaje asociado al olfato, la amígdala y la corteza orbitofrontal haciendo capaz al individuo de asignar valor afectivo (hedónico o aversivo) a estímulos odoríferos específicos [47, 49, 136].

Desde el punto de vista estadístico se observó que la respuesta al olor como factor común en las diferentes fases del ensayo, mostraron una mayor proporción de éxitos que los esperados por la casualidad, evidenciando que el olor emanado de los SOI´s serían productos viables para el condicionamiento y mantenimiento de campo de caninos detectores.

Un dato adicional del estudio, fue la posibilidad de identificar las diferentes fases de condicionamiento que bien pudieran extrapolar a los procedimientos de adquisición de aprendizajes vinculados con el olfato, como lo es el aspecto utilitario de perros detectores en sus diferentes especialidades.

Paralelo a las fases de condicionamiento de ratas y condicionamiento de perros se realizaron análisis hematológicos con el objetivo de evaluar el impacto orgánico resultado del contacto frecuente con los odorantes, si bien se conoce la toxicidad de los diferentes compuestos responsables de la emanación de COV's, es importante evidenciar mediante el resultado de análisis hematológicos a la conclusión de cada ensayo de condicionamiento.

El estudio hematológico realizado en las ratas (Cuadro 10) durante el condicionamiento simultáneo (SOIc/SOIh) mostraron cambios compatibles con hemoconcentración relativa e hiperazotemia prerrenal (Incremento de urea, amilasa, proteínas totales, reducción de la bilirrubina) como reflejo compensatorio transitorio por el esfuerzo físico derivado del proceso de condicionamiento, la creatinina sufrió un incremento marginal atribuida al aumento de la actividad física, en el condicionamiento con SOIm no se observó algún cambio de los parámetros.

Grupo CO (Cuadro 11), en uno de los ejemplares se observaron valores de hematocrito, hemoglobina y eritrocitos valores mayores a los parámetros normales incluso antes del ensayo, de la misma manera un solo ejemplar presento una marcada eosinofilia, atribuida a la irritación frecuente del tracto respiratorio, característico en la hematología de animales que usan el olfato con mayor frecuencia de la norma [136, 137].

11.- Conclusiones

Los resultados del presente estudio demuestran:

La viabilidad del uso de un COV característico de la firma odorífera de una sustancia para su búsqueda y localización mediante el uso de perros detectores.

La posibilidad del desarrollo de “polímeros de impronta molecular” como una tecnología sólida para la desorción controlada de odorantes imitadores, capaces de contener una gran variedad de COV’s sin incurrir en los riesgos que representa el manejo de sustancias reales.

Se observaron parámetros de emanación de odorante nítido y constante que permite una amplia aplicación para el condicionamiento y mantenimiento operativo de perros detectores en campo.

El presente trabajo ofrece una visión general de la metodología para el diseño de sustancias odorantes con fines de condicionamiento de biosensores.

ANEXOS

Rapid Analytics
 1680 Pearl St.
 (541) 654-8129
 December 13, 2019



This is for informational purposes only and cannot be used for compliance or labeling.

Business: Octave Labs
Contact: Austyn Jimenez
Phone No.: (541) 373-0358
Email: Austyn@Octave-Labs
Sample Name: 1042 After Rato
Sample Type: Distillate
Lab ID: 1911132
Date Received: December 12, 2019
Date Analyzed: December 13, 2019



Total % THC LOQ
Total % CBD 97.87
Total % CBG 1.61

Cannabinoid	weight	mg/g
CBD	LOQ	LOQ
CBDA	LOQ	LOQ
CBG	LOQ	LOQ
CBGV	LOQ	LOQ
THCA	LOQ	LOQ
9A-THC	LOQ	LOQ
8A-THC	LOQ	LOQ
CBGA	LOQ	LOQ
CBG	LOQ	LOQ
CBN	LOQ	LOQ
CBF	LOQ	LOQ
Moisture %	LOQ	LOQ
Total	>99.99	995.40



Total THC and Total CBD are calculated values using the Oregon reporting equipment (OAR 331-064-0100). In the calculation, the acid form of the cannabinoid is multiplied by 0.877 to account for decarboxylation. The decarboxylation acid is added to the cannabinoid value for the total cannabinoid. Total CBD is calculated using the same formula.

All values have been adjusted for moisture content of sample biomass.

David Estruga, Laboratory Director
 December 13, 2019

Certificate of Analysis

Sample: 1910REF0773.3842
Batch: 19102019
Sample Received: 10/30/2019
Report Created: 10/15/2019
Harvest Process Lot:
Certificate# 4156-001-Report ID: 3842

REFERENCE LABS

Subcontracted: Yes

Pass

Moisture Activity: 0.714 aw at 22.89°C

Microbial Potential: 0.65 LAFC

Cannabinoids

Total THC	0.05%
Total CBD	7.11%
Total Cannabinoids	8.52%

THC 0.05%
CBD 7.11%
Total Cannabinoids 8.52%

1343 5th Pacific Hwy
 Tualatin, OR 97146
 (503) 261-8438
 www.octavelabs.com



R Holsten
 Regional Director



Referencias

1. Norma UNE-EN 13725: 2004, Asociación Española Para la calidad, Centro Nacional de Información de la Calidad. "Calidad del aire" [Internet]. España: Agencia Española para la calidad; 2004. Available from: https://www.aec.es/c/document_library/get_file?uuid=3527643c-0525-42fd-9943-1c881254e44f&groupId=10128#:~:text=La%20norma%20UNE%2DEN%2013725,olfativo%20cuando%20inspira%20sustancias%20vol%C3%A1tiles%E2%80%9D.
2. CONAMA 2010, Congreso Nacional del Medio Ambiente 2010, ST8 Convención de Técnicos de Calidad del Aire [Internet]. España: CONAMA; 2010. Available from: <http://www.conama10.conama.org/web/generico.php?idpaginas=&lang=es&menu=87&id=52&op=view>
3. Herz, RS., Schankler C, Beland S, Okurlfaction, Emotion and associative learning: effects on motivated behavior. *Motivation and Emotion*, 2004, vol. 28, no 4, p. 363-383. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11031-004-2389-x>
4. Furton KG, Myers LJ., The scientific foundation and efficacy of the use of canines as chemical detectors for explosives. *Talanta* [Internet]. 2001; 54(3): 487-500. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/s0039-9140\(00\)00546-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0039-9140(00)00546-4)
5. Grandjean, D., & Moquet, N. *Guía práctica del perro de deporte & de utilidad*. Grupo Royal Canin. (2000).
6. Guimerá C., La eficacia en la detección canina en el ámbito de las fuerzas armadas: propuesta de un estándar de evaluación. *Sanidad Militar*. 2019; 75(2): 98-101. DOI: <https://dx.doi.org/10.4321/s1887-85712019000100007>.
7. Jmu C., The Mine Action Information Center and the State Department's Humanitarian Demining Fellowship: Molding the future of the landmine community. *The Journal of Conventional Weapons Destruction* [Internet]. 2002 [cited 2022 Apr 1];6(2):24. Available at: <https://commons.lib.jmu.edu/cisr-journal/vol6/iss2/24>

8. Frederickx C, Verheggen F, Haubruge E., Biosensors in forensic sciences. *Biotechnologie, Agron Soc Environ* [Internet], 2011 [cited 2022 Mar 21]; 15 (3).DOI: <https://orbi.uliege.be/handle/2268/65799>.
9. Soledad-Rodríguez B., Empleo de Polímeros de Impronta Molecular como pre-concentradores de muestras en el análisis químico de trazas. *Tekhné*. 2017;(20)2. Available from ORCID [Internet]. [Orcid.org](https://orcid.org/0000-0002-0705-674X). [citado el 21 de marzo de 2022]. DOI: <http://orcid.org/0000-0002-0705-674X>
10. Portugal MTM., Receptores olfativos: El perfume del éxito. *An Real Acad Farm* [Internet]. 2005 [cited 2022 Mar 27]; (1):15. Available at: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=1191183>.
11. López-Mascaraque L, Alonso JR., El olfato [Internet]. *Los Libros de la Catarata*; 2017. Available from: <https://books.google.at/books?id=5zp2DgAAQBAJ>
12. Börsch-Haubold A., Small molecules make scents. *Science in School* [Internet]. 2007 [cited 2022 Mar 27];6:69–74. Available from: https://www.scienceinschool.org/wp-content/uploads/2014/11/issue6_scents.pdf
13. Colorado CP, Rivera JM., Química del olor. *Diario de Xalapa/Universidad Veracruzana*. 2014;3E. Available from: <https://cdigital.uv.mx/bitstream/handle/123456789/48509/029-CYL-0814.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
14. Novaro OAM, Criado JES., Fisiología del olfato [Internet]. Nueva York, NY, Estados Unidos de América: McGraw-Hill Medical; 2006. Available from: <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1858§ionid=134364259>
15. Iglesias AG., Colaboraciones en Química: Contaminación odorífera. Estrategias de análisis de olores [Internet]. 2012 [cited 2022 Mar 27];5(New Era):92–8. Available from: <http://e-spacio.uned.es/fez/eserv/bibliuned:revista100cias-2012-5ne-7190/Documento.pdf>

16. Barrios Santos WA., Definición morfológica del epitelio sensorial olfativo en los mamíferos [Internet]. [España]: Universidad de Santiago de Compostela; 2015 [cited 2022 mar 27]. Available from: <https://minerva.usc.es/xmlui/handle/10347/12100>
17. Buck LB., Olfactory receptors and odor coding in mammals. *Nutr Rev* [Internet]. 2004;62(11 Pt 2):S184-8; discussion S224-41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1753-4887.2004.tb00097.x>
18. Blanco, EMV, Cordero-Bueso GA., Capítulo III. El olor y el aroma. En: Cordero-Bueso G, editor. *Aplicación del análisis sensorial de los alimentos en la cocina y en la industria alimentaria*. España: Universidad Pablo Olavide, Sevilla; 2013. p. 25. Available from: https://www.researchgate.net/profile/Gustavo-Cordero-Bueso/publication/262561546_APLICACION_DEL_ANALISIS_SENSORIAL_DE_LOS_ALIMENTOS_EN_LA_COCINA_Y_EN_LA_INDUSTRIA_ALIMENTARIA/links/0a85e537fdb346e28d000000/APLICACION-DEL-ANALISIS-SENSORIAL-DE-LOS-ALIMENTOS-EN-LA-COCINA-Y-EN-LA-INDUSTRIA-ALIMENTARIA.pdf#page=26
19. Fuentes A, Fresno MJ, Santander H, Valenzuela S, Gutiérrez MF, Miralles R., Sensopercepción olfatoria: una revisión. *Rev Med Chil* [Internet]. 2011 ;139(3):362–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.4067/s0034-98872011000300013>
20. Bonadeo MJ., Odotipo: historia natural del olfato y su función en la identidad de marca [Internet]. [Argentina]: Universidad Austral; 2005. Available from: <https://rii.austral.edu.ar/handle/123456789/311>
21. Santos WAB., Definición morfológica del epitelio sensorial olfativo en los mamíferos [Internet]. [España]: Universidad de Santiago de Compostela; 2014. Available from: <https://core.ac.uk/download/pdf/75992734.pdf>
22. Pernollet J-C, Sanz G, Briand L., Les récepteurs des molécules odorantes et le codage olfactif. *C R Biol* [Internet]. 2006;329(9):679–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.crvi.2006.06.001>

23. Quignon P, Rimbault M, Robin S, Galibert F., Genetics of canine olfaction and receptor diversity. *Mamm Genome* [Internet]. 2012 ;23(1–2):132–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00335-011-9371-1>
24. Craven BA, Paterson EG, Settles GS., The fluid dynamics of canine olfaction: unique nasal airflow patterns as an explanation of macrosmia. *J R Soc Interface* [Internet]. 2010 [cited 2022 Mar 27];7(47):933–43. Available from: <https://rsif.royalsocietypublishing.org/content/early/2009/12/09/rsif.2009.0490.full.html>
25. Vassar R, Ngai J, Axel R., Spatial segregation of odorant receptor expression in the mammalian olfactory epithelium. *Cell* [Internet]. 1993;74(2):309–18. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90422-m](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(93)90422-m)
26. Nei M, Niimura Y, Nozawa M., The evolution of animal chemosensory receptor gene repertoires: roles of chance and necessity. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2008 ;9(12):951–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrg2480>
27. Cardinali DP., *Neurociencia Aplicada/ Applied Neuroscience: Sus Fundamentos/ It's Fundamentals* [Internet]. Editorial Médica Panamericana; 2007, pp 189-192 Available from: <https://books.google.at/books?id=3NcgrclhQIAC>
28. Viscay BMA., *Clasificación de estímulos odorantes mediante señales biológicas* [Internet]. [Chile]: Universidad de Chile; 2008. Available from: <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/111725>
29. Barros GB, Claro IF., El sentido del olfato en los mamíferos: estado de la cuestión y perspectivas para los estudios interlingüísticos de lexicalización. *tonos* [Internet]. 2018;34(0):1–19. Available from: <http://www.tonosdigital.es/ojs/index.php/tonos/article/view/1871/960>
30. Hernández-Ramírez P., La mucosa nasal como vía y fuente para la medicina regenerativa. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia* [Internet]. 2011;27(3):297–308. Available from:

http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_isoref&pid=S0864-02892011000300005&lng=es&tlng=es

31. Shipley MT, Ennis M, Puche AC., The Olfactory System. En: Neuroscience in Medicine. Totowa, NJ: Humana Press; 2003. p. 579–93.
32. Meza Ruiz G., Neurobiología de los sistemas sensoriales [Internet]. UNAM; 1995. Available from: https://books.google.at/books?id=JYhzE_BuOcsC
33. Ripoll C. Neuroanatomía Carpenter 4 ed. 2016 [cited 2022 Mar 31]; Available from: https://www.academia.edu/23319031/Neuroanatomia_Carpenter_4_ed
34. Belluscio L, Katz LC., Symmetry, stereotypy, and topography of odorant representations in mouse olfactory bulbs. J Neurosci [Internet]. 2001 ;21(6):2113–22. Available from : <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.21-06-02113.2001>
35. Borgarelli MP., Aporte para el conocimiento anatómico-funcional del órgano vomeronasal humano y su probable relación con la conducta socio-sexual. Alcmeon, Revista Argentina de Clínica Neuropsiquiátrica [Internet]. 2007 [quoted on March 31, 2022]; 14:5–48. Available from: <https://alcmeon.com.ar/14/53/borgtotal.pdf>
36. Jennings-White C., Perfumery and the sixth sense. Perfumer and Flavorist [Internet]. el 6 de abril de 2016 [cited 2022 Mar 31];20:1. Available from: <https://www.perfumerflavorist.com/fragrance/application/multiuse/Perfumery-and-the-Sixth-Sense-370158901.html>
37. Larrea KC., La cultura de los olores: una aproximación a la antropología de los sentidos [Internet]. Ecuador: Ediciones Abya Abya; 1997 [cited March 31, 2022]. Available from: https://digitalrepository.unm.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1532&context=abya_yala
38. Coli A, Stornelli MR, Giannesi E., The dog vomeronasal organ: a review. DOGB [Internet]. 2016 [cited 2022 Mar 31];2(1):24–31. Available from: <https://dogbehavior.it/dogbehavior/article/view/27>

39. Naser G A, Fullá O J, Varas P MA, Nazar S R., El órgano vomeronasal humano. *Rev otorrinolaringol cir cabeza cuello* [Internet]. 2008;68(2). Available from: <http://dx.doi.org/10.4067/s0718-48162008000200013>
40. Mamasuew K, Breer H, Fleischer J., Grueneberg ganglion neurons respond to cool ambient temperatures. *Eur J Neurosci* [Internet]. 2008;28(9):1775–85. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06465.x>
41. Barraud P, Seferiadis AA, Tyson LD, Zwart MF, Szabo-Rogers HL, Ruhrberg C, et al., Neural crest origin of olfactory ensheathing glia. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2010;107(49):21040–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1012248107>
42. Blanchart A, Martín-López E, De Carlos JA, López-Mascaraque L., Peripheral contributions to olfactory bulb cell populations (migrations towards the olfactory bulb). *Glia* [Internet]. 2011;59(2):278–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/glia.21100>
43. Gómez R, Neira A, Tovar D, Martínez C, Bernal JE., Células en glía envolvente olfatoria: potencial para la reparación de lesiones del sistema nervioso central. *Univ Médica* [Internet]. 2007 ;48(4):396–413. Available from: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=231018670005>
44. Arias-Carrión O, Olivares-Bañuelos T, Drucker-Colín R., Neurogénesis en el cerebro adulto. *Rev Neurol* [Internet]. 2007 ;44:541–50. Available from: https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/46448609/Neurogenesis_in_the_adult_brain20160613-14639-1jr7wa3-with-cover-page-v2.pdf?Expires=1648773567&Signature=JGa1Iga5L4RyR74WCeL~0jEG2hlNf1REbfkEJUB7VbxRJqnpCE2-XIVkMchf--IP12vx8ppbA6i5OvVNIWZ0~vicbdrBYZtFpVsyti49~VRkaOc9KVUkUo8u3lQSWxDkFBfjLT3urE9p-xMCH~UKOOnG5WSYPCELMqd7J88ivvUSH7EspGNbru3Ln-9~C-jADeu07kOMwYAdHeyqIF62uE1XzivVIY-i-jhUUTehCfnaf~zgxF1Lqy0u2p~G08zRtpSDmkO53b7~R-

0qTKpXmIpU0oxuoTrWaiP-l~Yk6t4mi2jmzDC2IfAfCRJ6SRco-93VN1X6-YFNE9SHjd1QQ__&Key-Pair-Id=APKAJLOHF5GGSLRBV4ZA

45. Herz RS., Odor-associative learning and emotion: effects on perception and behavior. *Chem Senses* [Internet]. 2005 ;30 Suppl 1(Supplement 1):i250-1. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/chemse/bjh209>
46. Harper RJ, Almirall JR, Furton KG., Identification of dominant odor chemicals emanating from explosives for use in developing optimal training aid combinations and mimics for canine detection. *Talanta* [Internet]. 2005;67(2):313–27. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2005.05.019>
47. Ono T, Nishijo H, Uwano T., Amygdala role in conditioned associative learning. *Prog Neurobiol* [Internet]. 1995;46(4):401–22. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/0301-0082\(95\)00008-j](http://dx.doi.org/10.1016/0301-0082(95)00008-j)
48. Otto J, Brown MF, Long W III., Training rats to search and alert on contraband odors. *Appl Anim Behav Sci* [Internet]. 2002 ;77(3) :217–32. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1591\(02\)00052-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1591(02)00052-7)
49. Wilson DA, Stevenson RJ., Olfactory perceptual learning: the critical role of memory in odor discrimination. *Neurosci Biobehav Rev* [Internet]. 2003 ;27(4) :307–28. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/s0149-7634\(03\)00050-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0149-7634(03)00050-2)
50. Settles GS., Sniffers: Fluid-dynamic sampling for olfactory trace detection in nature and homeland security—. *J Fluids Eng* [Internet]. 2005 ;127(2) :189–218. Available from: <http://dx.doi.org/10.1115/1.1891146>
51. Gerritsen R, Haak R., K9 complete care: A manual for physically and mentally healthy working dogs. Calgary, AB, Canada: Detselig Enterprises; 2004.
52. Synnott A., Sociology of smell. *Revista mexicana de sociología* [Internet]. 2003;65(2):431–59. Available from: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rms/v65n2/v65n2a6.pdf>
53. Asociación Española Para la calidad, Centro Nacional de Información de la Calidad. Norma UNE-EN 13725: 2004 “Calidad del aire” [Internet]. España: Agencia Española para la calidad; 2004. Available from:

https://www.aec.es/c/document_library/get_file?uuid=3527643c-0525-42fd-9943-1c881254e44f&groupId=10128#:~:text=La%20norma%20UNE%2DEN%2013725,olfativo%20cuando%20inspira%20sustancias%20vol%C3%A1tiles%E2%80%9D

54. Zentall TR, Wasserman EA, Urcuioli PJ., Associative concept learning in animals: ASSOCIATIVE CONCEPT LEARNING. *J Exp Anal Behav* [Internet]. 2014 ;101(1):130–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/jeab.55>
55. Shipley MT, Ennis M, Puche AC., *The Olfactory System*. En: *Neuroscience in Medicine*. Totowa, NJ: Humana Press; 2003. p. 579–593
56. Moser AY, Bizo L, Brown WY., Olfactory generalization in detector dogs. *Animals (Basel)* [Internet]. 2019;9(9):702. Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/ani9090702>
57. Macias MS., *The development of an optimized system of narcotic and explosive contraband mimics for calibration and training of biological detectors*. [USA]: Florida International University; 2009. DOI: 10.25148/etd.FI09120807
58. DeGreeff LE, Weakley-Jones B, Furton KG., Creation of training aids for human remains detection canines utilizing a non-contact, dynamic airflow volatile concentration technique. *Forensic Sci Int* [Internet]. 2012;217(1–3):32–8. : <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2011.09.023>
59. Simon A, Lazarowski L, Singletary M, Barrow J, Van Arsdale K, Angle T, et al., A review of the types of training aids used for canine detection training. *Front Vet Sci* [Internet]. 2020 ;7 :313. Available from: <http://dx.doi.org/10.3389/fvets.2020.00313>
60. Canine trainer course, Merida Initiative, Homeland Security, Customs and Border Protection, Canine Center El Paso, Texas, 2010.
61. Kafka WA., SOKKS® micro amount animal odor conditioning. *J Vet Behav* [Internet]. 2009 ;4(6):244–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jveb.2009.05.006>

62. Onuma T, Sakai N., Higher-order conditioning of taste-odor learning in rats: Evidence for the association between emotional aspects of gustatory information and olfactory information. *Physiol Behav* [Internet]. 2016;164:407–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2016.06.025>
63. Jezierski T, Adamkiewicz E, Walczak M, Sobczyńska M, Górecka-Bruzda A, Ensminger J, et al., Efficacy of drug detection by fully-trained police dogs varies by breed, training level, type of drug and search environment. *Forensic Sci Int* [Internet]. 2014; 237:112–8: <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2014.01.013>
64. Macias MS, Harper RJ, Furton KG., A Comparison of Real Versus Simulated Contraband VOCs for Reliable Detector Dog Training Utilizing SPME-GC-MS. *American Laboratory* [Internet]. 2008;40(1):16–9. Available from: <http://pawsoflife-org.k9handleracademy.com/Library/Detection/Marcias.pdf>
65. Tipler A., an introduction to headspace sampling in gas chromatography fundamentals and theory [Internet]. USA: Perkin Elmer Inc.; 2014. : <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download;jsessionid=6A3F7A53FF773EFCC8B1107346C3C007?doi=10.1.1.684.7251&rep=rep1&type=pdf>
66. Edge CC, Gibb J, Wasserzug LS., Comparative analysis of the vapor headspace of military-grade TNT versus NESTT TNT under dynamic and static conditions. En: Dubey AC, Harvey JF, Broach JT, editors. *Detection and Remediation Technologies for Mines and Minelike Targets III*. SPIE; 1998.
67. ScentLogix - K9 Detection ScentKits Benefits [Internet]. Scentlogix.com. [cited 2022 Mar 21]: <http://www.scentlogix.com/k9scentkitbenefits.htm>
68. Collections [Internet]. TrueScent K-9 Training Aids. [cited 2022 Mar 21]. : <http://www.truescentk9.com/products/>
69. SEJEW O SOKKS -MPTS, Microparticles conditioning user handbook [Internet]. Docplayer.net. [cited 2022 Mar 21]: <http://docplayer.net/34891226-Sejewo-sokks-mpts-microparticles-conditioning-user-handbook.html>

70. Rice S, Koziel JA., The relationship between chemical concentration and odor activity value explains the inconsistency in making a comprehensive surrogate scent training tool representative of illicit drugs. *Forensic Sci Int* [Internet]. 2015; 257:257–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2015.08.027>
71. Mosquera JT, Cote-Menéndez M., Toxic and neuropsychological effects of cocaine consumption. *Revista de la facultad de medicina*. 2005;53(1):10–26.
72. Ley general de salud publicada el 7 de febrero de 1984 en el diario oficial de la federación Al margen un sello con el Escudo Nacional que dice: Estados Unidos Mexicanos. -Presidencia de la República [Internet]. Gob.mx. [citado el 21 de marzo de 2022]. Available from: <http://cgservicios.df.gob.mx/prontuario/vigente/r229919.pdf>
73. Edge CC, Gibb J, Wasserzug, LS., Comparative analysis of the vapor headspace of military-grade TNT versus NESTT TNT under dynamic and static conditions. *Proc. SPIE 3392, Detection and Remediation Technologies for Mines and Minelike Targets III*, (quoted on 4 September 1998); <https://doi.org/10.1117/12.324222>
74. Kuhlman MR, Gooding RE, Kogan VG, Bridges C., Particle size distribution of cocaine hydrochloride. En: Pilon P, Burmeister S, editores. *Chemistry- and Biology-Based Technologies for Contraband Detection*. SPIE; 1997. DOI: 10.1117/12.266779
75. Sigma Pseudo™ Narcotic Scent Cocaine formulation [Internet]. Sigma Aldrich Chemical. 2022. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/product/sial/p2423>
76. K-9 detection training: Differences in the 4 types of simulants [Internet]. Police1. 2013 [quoted 21 March 2022]. Available from: <https://www.policeone.com/k-9/articles/k-9-detection-training-differences-in-the-4-types-of-simulants-XTtsL44atXAu4qhM/>
77. JerryTK., K-9 detection training: Using simulants, pseudo scents, and real odors – PT 1 [Internet]. Tarheelcanine.com. [quoted 21 March 2022].

Available from: <http://www.tarheelcanine.com/2013/02/k-9-detection-training-using-simulants-pseudo-scents-and-real-odors-pt-1/>

78. Lorenzo N, Wan T, Harper RJ, Hsu Y-L, Chow M, Rose S, et al., Laboratory and field experiments used to identify *Canis lupus var. familiaris* active odor signature chemicals from drugs, explosives, and humans. *Anal Bioanal Chem* [Internet]. 2003 ;376(8):1212–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-003-2018-7>
79. Manley N., Narcotics determination by the entry scan and the StreetLab using ion mobility spectrometry and Raman spectroscopy. [USA]: Florida International University; 2005.
80. Calkin RR, Jellinek JS., *Perfumery: Practice and principles*. Nashville, TN, Estados Unidos de América: John Wiley & Sons; 1994. Available from: https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=XD9w2xR2HjsC&oi=fnd&pg=PR7&dq=74.%09Calkin+RR,+Jellinek+JS.+Perfumery:+Practice+and+principles.+Nashville,+TN,+Estados+Unidos+de+Am%C3%A9rica:+John+Wiley+%26+Sons%3B+1994.&ots=UGLxEIq-KZ&sig=YThG6lr4nayZYd_duC-1EzEzQI4#v=onepage&q&f=false
81. Shibanai I., Process for preparation of solid perfumes. *Cosmetic or similar toilette*. 4,617,147, 1986. Available from: <https://patents.google.com/patent/US4617147A/en>
82. Masahide O, Kiyoshi A, Kazuhiko S, Hiroshi O., Amorphous silica-alumina particles and process for preparation thereof. C01B33/26. 5,139,760 A, 1992. Available from: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-02334604/document>
83. Kury JW, Simpson RI., Development of non-hazardous explosives for security training and testing (NESTT). Office of Scientific and Technical Information (OSTI); 1995. DOI: 10.2172/93967
84. Fedorcov AN., Simulator of cannabis smell for training service dogs. *Agriculture*. RU2471344C1, 2011. DOI: <https://patents.google.com/patent/RU2471344C1/en>

85. Catharine LWM, editor. Analysis of Cannabinoids in Hemp Seed Oils by HPLC Using PDA Detection [Internet]. PerkinElmer, Inc; 2015. Available from: https://www.s4science.at/wordpress/wp-content/uploads/2019/03/012317_01-Analysis-of-Cannabinoids-in-Hemp-Seed-Oil-by-HPLC-PDA.pdf
86. Haupt K, Mosbach K., Molecularly imprinted polymers and their use in biomimetic sensors. *Chem Rev* [Internet]. 2000;100(7):2495–504. Available from: <http://dx.doi.org/10.1021/cr990099w>
87. Cachão M., Rasser M., Rodrigues D. da Silva C, editor. Paleoenvironmental and Taphonomical Interpretation of Miocene Rhodoliths from Porto Santo (Madeira Archipelago, Portugal). Universidad de Evora: I Congresso Ibérico de Paleontologia; 2000, *Abstracts* (pp. 42-43).
88. Ramström O, Mosbach K., Synthesis and catalysis by molecularly imprinted materials. *Curr Opin Chem Biol* [Internet]. 1999 ;3(6) :759–64. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/s1367-5931\(99\)00037-x](http://dx.doi.org/10.1016/s1367-5931(99)00037-x)
89. Garcia R, Cabrita MJ, Costa Freitas AM., Application of molecularly imprinted polymers for the analysis of pesticide residues in food—A highly selective and innovative approach. *Am J Analyt Chem* [Internet]. 2011 ;02(08) :16–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.4236/ajac.2011.228119>
90. Luliński P., Molecularly imprinted polymers-based drug delivery devices: a way to application in modern pharmacotherapy. A review. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* [Internet]. 2017; 76:1344–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2017.02.138>
91. Murray G., Molecularly imprinted polymer-based sensors for the detection of narcotics. US Patent. 20030003587A1, 2001.
92. Murray G, Bradley M, David S., Molecularly imprinted polymeric sensor for the detection of explosives. World Patent. 2001077664A2, 2003.
93. Guc M. Schroeder G., The Molecularly Imprinted Polymers. Influence of Monomers on The Properties of Polymers-A Review. *World Journal of Research and Review*. 2017;5(6):36–47.

94. Cheong WJ, Yang SH, Ali F., Molecular imprinted polymers for separation science: a review of reviews: Other Techniques. *J Sep Sci* [Internet]. 2013 ;36(3):609–28. Available from : <http://dx.doi.org/10.1002/jssc.201200784>
95. D'Aurelio R, Chianella I, Goode JA, Tothill IE., Molecularly imprinted nanoparticles-based sensor for cocaine detection. *Biosensors (Basel)* [Internet]. 2020 ;10(3):22. Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/bios10030022>
96. Liang R, Chen L, Qin W., Potentiometric detection of chemical vapors using molecularly imprinted polymers as receptors. *Sci Rep* [Internet]. 2015;5(1):12462. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep12462>
97. Shinohara S, Chiyomaru Y, Sassa F, Liu C, Hayashi K., Molecularly imprinted filtering adsorbents for odor sensing. *Sensors (Basel)* [Internet]. 2016;16(11). Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/s16111974>
98. Kikuchi M, Tsuru N, Shiratori S., Recognition of terpenes using molecular imprinted polymer coated quartz crystal microbalance in air phase. *Sci Technol Adv Mater* [Internet]. 2006 ;7(2):156–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.stam.2005.12.004>
99. Vasapollo G, Sole RD, Mergola L, Lazzoi MR, Scardino A, Scorrano S, et al., Molecularly imprinted polymers: present and future prospective. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2011 ;12(9):5908–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms12095908>
100. Tamayo FG, Turiel E, Martín-Esteban A., molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction and solid-phase microextraction: recent developments and future trends. *J Chromatogr A* [Internet]. 2007;1152(1–2):32–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2006.08.095>
101. Geneva International Center for Humanitarian Demining, NPA Global training center. *Training of Mine Detection Dogs in Bosnia and Herzegovina (NPA Global Training Centre)*. Geneva: NPA Global Training Centre; 2004, ISBN 2-88487-034-2

102. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Al margen un sello con el Escudo Nacional, que dice: Estados Unidos Mexicanos. - Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Norma oficial mexicana nom-062-zoo-1999, especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio [Internet]. Unam.mx. [quoted on April 4, 2022]. Available from: <https://www.fmvz.unam.mx/fmvz/principal/archivos/062ZOO.PDF>
103. CAS: 50-78-2, Safety data sheet for acetylsalicylic acid, [quoted 21 March 2022]. Available from: <http://file:///C:/Users/52552/Downloads/cido%20acetil%20salicilico.pdf>
104. CAS: 100-43-6, Safety data sheet for Polivinil Piridina N-Oxico De F, De Seguridad D, Identificador Del Producto Reilline 1. REILLINE* 4035 Revision Date: 3 Feb 2017 MSDS2645 (ENG) Page 1 of 9 [Internet]. Vertellus.com. [cited 2022 Mar 21]. Available from: <https://www.vertellus.com/Documents/msds/REILLINE%204035%20Spanish.pdf>
105. CAS: 97-90-5, Safety data sheet for Ethylene glycol dimethacrylate, [quoted 21 March 2022]. Available from: http://file:///C:/Users/52552/Downloads/818847_SDS_ES_ES.PDF
106. CAS: 7774-29-0, Safety data sheet for acrylamide Kгаа M, Acrilamida A. Gob.mx. [citado el 21 de marzo de 2022]. Available from: <http://www.inr.gob.mx/Descargas/bioSeguridad/acrilamida.pdf>.
107. CAS: 78-67-1, Safety data sheet for Azobisisobutyronitrile Wikipedia contributors. Azobisisobutironitrilo [Internet]. Wikipedia, The Free Encyclopedia. Available from: <https://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Azobisisobutironitrilo&oldid=130660694>
108. CAS: 93-58-3, Safety data sheet for Methyl-benzoate Merckmillipore.com. [citado el 21 de marzo de 2022]. Available from:

https://www.merckmillipore.com/MX/es/product/Methylbenzoate,MDA_CHEM-106059

109. CAS: 64-19-7, Safety data sheet for acetic acid. INSTITUTO NACIONAL DE REHABILITACIÓN COMITÉ DE BIOSEGURIDAD HOJAS DE DATOS DE SEGURIDAD [Internet]. Gob.mx. [citado el 21 de marzo de 2022]. Available from: <http://www.inr.gob.mx/Descargas/bioSeguridad/acidoAcetico39.pdf>
110. CAS: 67-64-1, Safety data sheet for acetone. Una.ac.cr. [citado el 21 de marzo de 2022]. Available from: <http://www.quimica.una.ac.cr/index.php/documentos-electronicos/category/13-hojas-de-seguridad?download=108:acetona>
111. CAS: 64-17-5, Safety data sheet for ethanol [Internet]. Fishersci.com. [quoted on April 5, 2022]. Available from: <https://www.fishersci.com/msdsproxy%3FproductName%3DA405P4%26productDescription%3DETHANOL%2BAHYD%2BHISTO%2B4L%26catNo%3DA405P-4%2B%26vendorId%3DVN00033897%26storeId%3D10652>
112. Safety data sheet for phosphoric acid. Un R, H3po4 F: MSDS [Internet]. Ucr.ac.cr. [quoted 21 March 2022]. Available from: <http://www.regenciaquimica.ucr.ac.cr/sites/default/files/Acido%20fosf%C3%B3rico.pdf>
113. Safety data sheet for methanol Una.ac.cr. [citado el 21 de marzo de 2022]. Available from: <http://www.quimica.una.ac.cr/index.php/documentos-electronicos/category/13-hojas-de-seguridad?download=269:metanol&start=180>
114. Tipple CA, Caldwell PT, Kile BM, Beussman DJ, Rushing B, Mitchell NJ, et al., Comprehensive characterization of commercially available canine training aids. *Forensic Sci Int* [Internet]. 2014; 242:242–54. : <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2014.06.033>
115. Cerreta MM, Furton KG., An assessment of detection canine alerts using flowers that release methyl benzoate, the cocaine odorant, and an evaluation of their behavior in terms of the VOCs produced. *Forensic Sci Int* [Internet].

- 2015;251:107–14. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2015.03.021>
116. Robles HB., Development and characterization of a molecularly imprinted polymer for zootechnical use in detector dogs. [Mexico]: National Autonomous University of Mexico; 2019.
117. Ramström O, Skudar K, Haines J, Patel P, Brüggemann O., Food analyses using molecularly imprinted polymers. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2001;49(5):2105–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1021/jf001444h>
118. Hosoya H, Tanaka J, Nagakura S., Ultraviolet absorption spectra of monomer and dimer of benzoic acid. *J Mol Spectrosc* [Internet]. 1962;8(1–6):257–75. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/0022-2852\(62\)90027-9](http://dx.doi.org/10.1016/0022-2852(62)90027-9)
119. Meischl F, Schemeth D, Harder M, Köpfle N, Tessadri R, Rainer M., Synthesis and evaluation of a novel molecularly imprinted polymer for the selective isolation of acetylsalicylic acid from aqueous solutions. *J Environ Chem Eng* [Internet]. 2016 ;4(4):4083–90. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jece.2016.09.013>
120. Fedorkov AN, Koslov AS, Fedorkova EA, Kozlova TA., Simulator of cannabis smell for training service dogs [Internet]. Patent. RU2471344C1, 2015. Available from:
<https://patentimages.storage.googleapis.com/5b/4e/62/7dca19094d3942/RU2538118C1.pdf>
121. Ruiz-Salas JC, de la Casa LG, Papini MR., Dimensions of sucrose solutions in the successive negative contrast effect. *Learn Motiv* [Internet]. 2020 ;69(101615):101615. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.lmot.2020.101615>
122. Bouton ME, Hendrix MC., Intertrial interval as a contextual stimulus: further analysis of a novel asymmetry in temporal discrimination learning. *J Exp Psychol Anim Behav Process* [Internet]. 2011;37(1):79–93. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1037/a0021214>

123. Murphy A.R, Mondragon E., Murphy A.V., Rule learning by rats. *Science*. *Science* [Internet]. 2008;319(5871):1849–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1126/science.1151564>
124. Buszewski B, Ligor T, Jezierski T, Wenda-Piesik A, Walczak M, Rudnicka J., Identification of volatile lung cancer markers by gas chromatography-mass spectrometry: comparison with discrimination by canines. *Anal Bioanal Chem* [Internet]. 2012;404(1):141–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-012-6102-8>
125. Pryor K., No lo mates... enséñale. El arte de enseñar y adiestrar. Modelado, reforzamiento positivo y técnicas de modificación de la conducta. España: Kns; 2016. ISBN 8493323292
126. Sigma Pseudo™ Narcotic Scent Marijuana formulation [Internet]. Sigma Aldrich Chemical. 2022. Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/sds/sial/p7309>.
127. William D. Kranz, Nicholas A. Strange, John V. Goodpaster. “Fooling fido”—chemical and behavioral studies of pseudo-explosive canine training aids. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2014; 406:7817–7825. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8240-7>
128. Gutierrez AL., Synthesis and characterization of magnetic nanoparticles with molecularly imprinted polymers for the controlled release of methotrexate. [Mexico]: National Autonomous University of Mexico; 2017.
129. Ghiasvand AR, Hajipour S., Direct determination of acrylamide in potato chips by using headspace solid-phase microextraction coupled with gas chromatography-flame ionization detection. *Talanta* [Internet]. 2016; 146:417–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2015.09.004>
130. Adorno MAT, Hirasawa JS, Varesche MBA., Development and validation of two methods to quantify volatile acids (C2-C6) by GC/FID: Headspace (automatic and manual) and liquid-liquid extraction (LLE). *Am J Analyt Chem* [Internet]. 2014 ;05(07):406–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.4236/ajac.2014.57049>

131. Sierra-Res A, Robles-Her B, J. Bernad- M, Día R, Peñ SI, Vargas-Est D, et al., Designing and preclinical evaluation of a molecular imprint polymer-based cocaine odor mimic for conditioning detection dogs. *Int J Pharmacol* [Internet]. 2022;18(1):171–81: <http://dx.doi.org/10.3923/ijp.2022.171.181>
132. Rice S, Koziel JA., Characterizing the smell of marijuana by odor impact of volatile compounds: An application of simultaneous chemical and sensory analysis. *PLoS One* [Internet]. 2015;10(12): e0144160. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0144160>
133. Ghiasvand AR, Hajipour S., Direct determination of acrylamide in potato chips by using headspace solid-phase microextraction coupled with gas chromatography-flame ionization detection. *Talanta* [Internet]. 2016; 146:417–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2015.09.004>
134. Stevenson RJ, Boakes RA., Sweet and Sour Smells: Learned Synesthesia Between the Senses of Taste and Smell. *The handbook of multisensory processes* (p. 69–83) Cambridge, MA, United States of America: Bradford Books; 2004. Available from: https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=CZS_yDoFV7AC&oi=fnd&pg=PA69&dq=Sweet+and+Sour+Smells&ots=8e3fbp28qA&sig=8x6aFLwNotGOMfzeTzn96lwZkMQ#v=onepage&q=Sweet%20and%20Sour%20Smells&f=false
135. Linster C, Smith BH., Generalization between binary odor mixtures and their components in the rat. *Physiol Behav* [Internet]. 1999 ;66(4):701–7. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/s0031-9384\(99\)00007-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0031-9384(99)00007-4)
136. Montoya Navarrete AL., Biochemical values indicative of liver and kidney function in clinically healthy dogs classified by age and gender [Internet]. [Mexico]: Universidad Autonoma de Aguascalientes; 2017. Available from: <http://bdigital.dgse.uaa.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/11317/1391/420049.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
137. Rivadeneyra Domínguez Eduardo, Galán Zamora Ricardo, Zamora Bello Isaac, Guía de laboratorio de hematología [Internet]. México: Universidad de

Veracruz; 2014. Available from: <https://www.uv.mx/qfb/files/2020/09/Guia-de-Hematologia-Laboratorio.pdf>.