

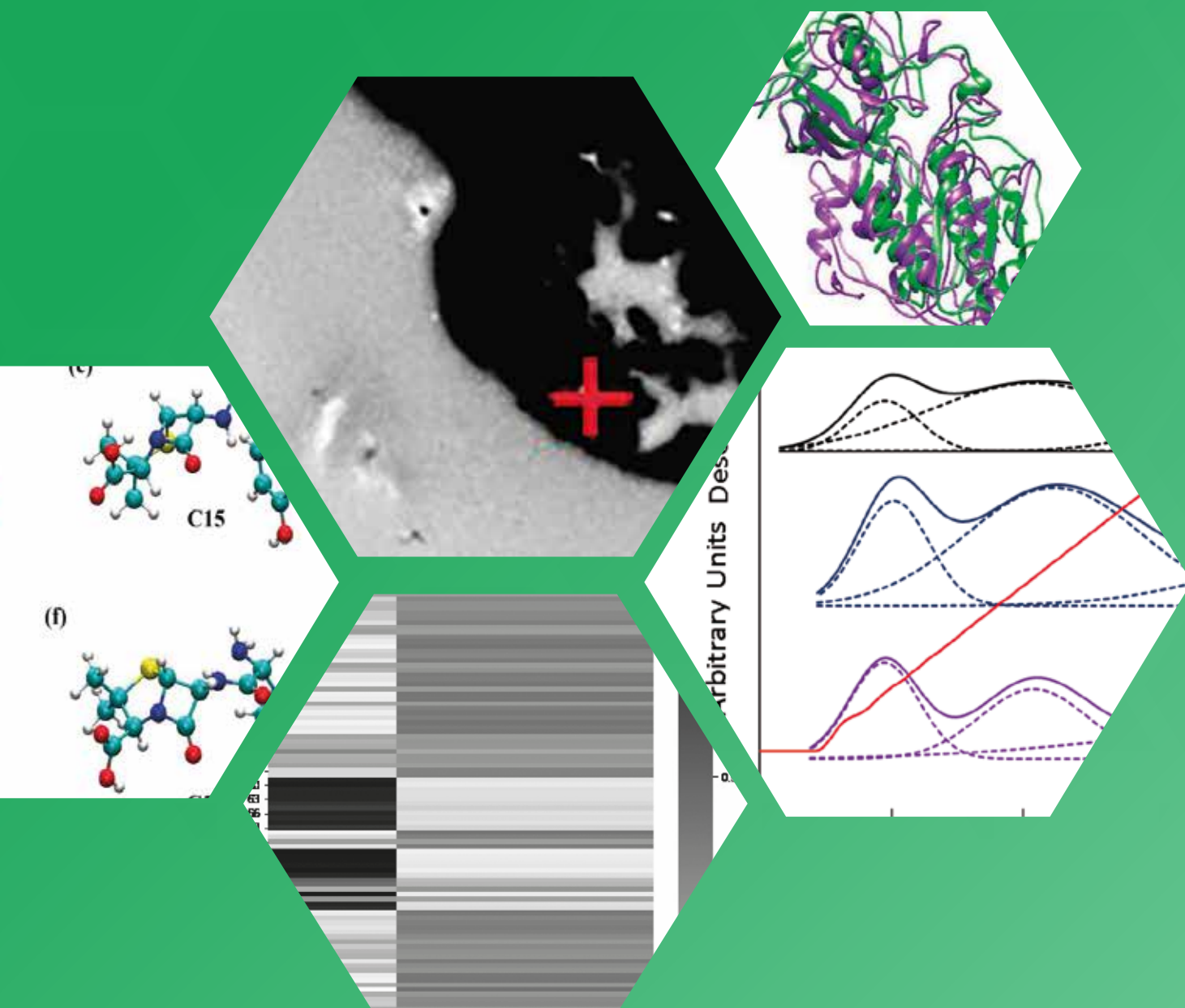
2

R C Q

VOL. 51 NÚM. 2 - 2022

# Revista Colombiana de Química

ISSN: 2357-3791





VOL. 51 NÚM. 2 - 2022

# Revista Colombiana de Química

Revista cuatrimestral del Departamento de Química  
Facultad de Ciencias

© Universidad Nacional de Colombia, Bogotá

ISSN En línea: 2357-3791

DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.quim>

Correo electrónico: [rcolquim\\_fcbog@unal.edu.co](mailto:rcolquim_fcbog@unal.edu.co)

## Indexada

Publindex - Índice Bibliográfico Nacional (categoría C)

Scielo Colombia

Scopus Q4 (SJR/2023: 0,16)

Redalyc

Chemical Abstracts Service (CAS) Source Index

Latindex

Directory of Open Access Journals (DOAJ)

BIBLAT

## Consulta Open Access

Todos los ejemplares de la Revista Colombiana de Química se encuentran disponibles en estos sitios web:

<https://revistas.unal.edu.co/index.php/rcolquim/index>

[http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_serial&pid=0120-2804&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_serial&pid=0120-2804&lng=en&nrm=iso)

<http://www.redalyc.org/revista.oa?id=3090>

El contenido se encuentra bajo una licencia de Creative Commons tipo Atribución Internacional (CC BY 4.0) que permite el acceso abierto con cualquier fin, siempre que se de el reconocimiento apropiado

## Director de la revista

Carlos Eduardo Narváz Cuenca, Ph. D  
Universidad Nacional de Colombia, Bogotá

## Asistente editorial

Marcela Patricia Palencia Argel  
Universidad Nacional de Colombia, Bogotá

## Comité editorial y científico

Ajjamada Kushalappa

McGill University, Canadá

Sonia Moreno Guaquetá

Universidad Nacional de Colombia, Colombia

Hector Fabio Zuluaga Corrales

Universidad del Valle, Colombia

Ljubisa R. Radovic

Pensilvania State University, Estados Unidos

Gustavo Adolfo González Aguilar

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, México

Juscelino Tovar

Lund University, Suecia

Leonardo Castellanos Hernández

Universidad Nacional de Colombia, Colombia

Francisco Carrasco Marín

Universidad de Granada, España

Pedro Joseph-Nathan

Instituto Politécnico Nacional, México

Cristian Ochoa Puentes

Universidad Nacional de Colombia, Colombia

Cristian Blanco Tirado

Universidad Industrial de Santander, Colombia

Augusto Rivera Umaña

Universidad Nacional de Colombia, Colombia

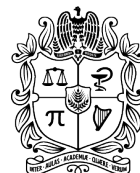
## Preparación editorial

Corrección de estilo y maquetación:

Proceditor Ltda.

Diseño de portada:

Carolina Gómez Pulido



UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
DE COLOMBIA

## Química Orgánica y Bioquímica

Evaluación y caracterización de la sirtuina 2.3 de *Giardia duodenalis* (Gd-Sir2.3) 3-10

Evaluation and characterization of *Giardia duodenalis* sirtuin 2.3 (GdSir2.3)

Avaliação e caracterização de *Giardia duodenalis* sirtuin 2.3 (GdSir2.3)

Aravy Geohanna Suárez Jurado, Maria Helena Ramirez Hernandez, Gonzalo Jair Diaz

## Química Aplicada y Analítica

Use of X-Ray Photoelectron Spectroscopy as an analytical tool for the study of contamination by Teflon in the synthesis of Mo(VI)Cl<sub>2</sub>O<sub>2</sub>Bipy/TiO<sub>2</sub> catalysts 11-15

Uso de la espectroscopia fotoelectrónica de rayos X como una herramienta analítica para el estudio de la contaminación por teflón en la síntesis de catalizadores Mo(VI)Cl<sub>2</sub>O<sub>2</sub>Bipy/TiO<sub>2</sub>

Uso da espectroscopia fotoeletrônica de raios X como ferramenta analítica para o estudo da contaminação por teflon na síntese de catalisadores Mo(VI)Cl<sub>2</sub>O<sub>2</sub>Bipy/TiO<sub>2</sub>

Álvaro Andrés Amaya Vesga, Henry Martínez Quiñónez, Raúl Armando Gómez Tarazona, Yeisson Ricardo Mendoza Castellanos, Fernando Martínez Ortega

Validación de un método multiresiduo para la determinación de medicamentos veterinarios en trucha y langostino 16-24

Validation of a multiresidue method for the determination of veterinary drugs in rainbow trout and shrimp

Validação de um método de multiresíduos para a determinação de medicamentos veterinários em truta e camarão

Diego Chirinos Pajuelo, Orlando Lucas Aguirre, Wilfredo León Gonzales, Nathaly Elizabeth Hurtado Galindo, Estefania Morales Ochante, Luis Huicho, María Concepcion Rivera Chira

## Fisicoquímica y Química Inorgánica

Comportamiento de la amoxicilina en agua mediante métodos de solvatación implícita y explícita 25-34

Behavior of amoxicillin in water by means of implicit and explicit solvation methods

Comportamento da amoxicilina em água por meio de métodos de solvatação implícito e explícito

Miguel Ángel Carrillo Hernández, Wilson H. Hirota, José G. Parra

Reconocimiento de rutas biosintéticas para semioquímicos mediante técnicas de aprendizaje de máquina 35-40

Recognition of biosynthetic pathways for semiochemicals using machine learning techniques

Reconhecimento de vias biossintéticas para semioquímicos usando técnicas de aprendizado de máquina

Edgar Eduardo Daza C, Laura Sofía Valencia-Colman

The effect of the acid pre-treatment temperature of natural diatomaceous earth on the Si/Al ratio of ZSM-5 zeolite 41-47

El efecto de la temperatura del pre-tratamiento ácido de tierra de diatomeas natural en la relación Si/Al de zeolitas ZSM-5

O efeito da temperatura de pré-tratamento ácido da terra de diatomáceas natural na relação Si/Al da zeólita ZSM-5

Ronald Mauricio Lara Prado, Luis Lopez N, Saúl Cabrera M



## Evaluación y caracterización de la sirtuina 2.3 de *Giardia duodenalis* (GdSir2.3)

### Resumen

La giardiasis es la enfermedad gastrointestinal de mayor incidencia mundial, causada por el protozoario *Giardia duodenalis*, para la cual no se cuenta con una vacuna o tratamiento eficiente. En aras de buscar nuevos blancos farmacológicos contra este parásito, se han estudiado las enzimas del metabolismo energético, como las sirtuinas, deacetilasas dependientes del dinucleótido de adenina y nicotinamida (NAD). Previamente se identificó a GdSir2.1 y GdSir2.2 como deacetilasas dependientes de NAD, con localizaciones subcelulares diferentes.

En este trabajo se estudió otro candidato a sirtuina (GdSir2.3) mediante herramientas bioinformáticas para la identificación de características típicas de la familia sirtuina en la secuencia del candidato, y experimentales como la obtención de la proteína recombinante 6xHis-GdSir2.3 que demostró actividad deacetilasa dependiente de NAD y que sirvió como antígeno en la producción de los IgY -  $\alpha$  - 6xHis-GdSir2.3 para la localización subcelular de la proteína endógena en *G. duodenalis*. Lo anterior concuerda con otros estudios donde se señala a GdSir2.3 como un importante regulador de la enquistación, debido a su aumento de expresión durante esta etapa del ciclo de vida, constituyéndola como un blanco farmacológico promisorio para el control de esta parasitemia.

**Palabras clave:** *Giardia*; NAD; deacetilasas de histonas; inmunofluorescencia, protozoarios; sirtuinas.

## Evaluation and characterization of *Giardia duodenalis* sirtuin 2.3 (GdSir2.3)

### Abstract

Giardiasis is the gastrointestinal disease with the highest incidence worldwide, caused by the protozoan *Giardia duodenalis*, for which there is no vaccine or efficient treatment. In order to find new pharmacological targets against this parasite, energy metabolism enzymes such as sirtuins, deacetylases dependent on the nicotinamide adenine dinucleotide (NAD), have been studied. GdSir2.1 and GdSir2.2 were previously identified as NAD-dependent deacetylases, with different subcellular locations.

In this work, another candidate for sirtuin (GdSir2.3) was studied using bioinformatic tools for the identification of typical characteristics of the sirtuin family in the sequence of the candidate; and experimental ones such as obtaining the recombinant protein 6xHis-GdSir2.3 that demonstrated NAD-dependent deacetylase activity; and that it served as an antigen in the production of IgY -  $\alpha$  - 6xHis-GdSir2.3 for the subcellular localization of the endogenous protein in *G. duodenalis*. The foregoing is consistent with other studies where GdSir2.3 is indicated as an important regulator of encyst due to its increased expression during this stage of the life cycle, constituting it as a promising drug target for the control of this parasitaemia.

**Keywords:** *Giardia*; NAD; histone deacetylases; immunofluorescence; protozoa; sirtuins.

## Avaliação e caracterização de *Giardia duodenalis* sirtuin 2.3 (GdSir2.3)

### Resumo

A giardíase é a doença gastrointestinal de maior incidência no mundo, causada pelo protozoário *Giardia duodenalis*, para a qual não existe vacina ou tratamento eficaz. Com o objetivo de encontrar novos alvos farmacológicos contra esse parasita, têm sido estudadas enzimas do metabolismo energético, como as sirtuínas, desacetilases dependentes do dinucleotídeo adenina nicotinamida (NAD). GdSir2.1 e GdSir2.2 foram previamente identificados como desacetilases dependentes de NAD, com diferentes localizações subcelulares.

Neste trabalho, outro candidato a sirtuin (GdSir2.3) foi estudado usando ferramentas de bioinformática para a identificação de características típicas da família sirtuin na sequência do candidato; e experimentais, como a obtenção da proteína recombinante 6xHis-GdSir2.3 que demonstrou atividade desacetilase dependente de NAD; e que serviu como antígeno na produção de IgY -  $\alpha$  - 6xHis-GdSir2.3 para a localização subcelular da proteína endógena em *G. duodenalis*. O exposto é consistente com outros estudos em que o GdSir2.3 é apontado como um importante regulador de encisto devido à sua expressão aumentada durante esta fase do ciclo de vida, constituindo-se como um alvo promissor para o controle dessa parasitemia.

**Palavras-chave:** *Giardia*; NAD; histona desacetilases; imunofluorescência; protozoários; sirtuínas.



## Introducción

*Giardia duodenalis* (syn. lamblia e intestinalis) es un eucariote basal de interés médico, ya que es el agente causal de la giardiasis, la enfermedad gastrointestinal de mayor incidencia mundial. Esta enfermedad ataca tanto a animales de interés agropecuario y veterinario como a personas de todas las edades en diferentes regiones del mundo; los principales afectados son niños de países en vías de desarrollo. Actualmente no se cuenta con una vacuna para prevenir esta enfermedad y los tratamientos existentes resultan poco eficientes por los efectos secundarios que producen y por su costo; por lo tanto, urge la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas que permitan el desarrollo de estrategias de control efectivas contra esta parasitemia.

Un punto de partida en dicha búsqueda corresponde al estudio del metabolismo energético y sus enzimas, teniendo en cuenta que están encargadas de regular procesos vitales en todos los organismos. Dentro del metabolismo energético pueden destacarse las rutas de biosíntesis y catabolismo del dinucleótido de adenina y nicotinamida (NAD), que involucra enzimas como las sirtuinas, las cuales están asociadas a la regulación de funciones vitales como la reparación de daños en el DNA, la progresión del ciclo celular, la longevidad celular, entre otras.

Las sirtuinas (E.C. 2.4.2) son proteínas globulares que tienen un tamaño muy variable; sin embargo, una de sus características más importantes es la presencia de un dominio catalítico conservado de aproximadamente 250 aminoácidos, conocido como plegamiento sirtuina y que consta de dos regiones: una pequeña y otra grande, que en conjunto permiten que la proteína lleve a cabo su actividad catalítica.

Dada la estructura conservada del dominio catalítico, las sirtuinas presentan también un mecanismo de reacción conservado en todos los organismos en donde han sido caracterizadas. Dicha reacción consiste en la remoción de un grupo acetilo de los residuos lisina de diferentes proteínas usando como cosustrato NAD<sup>+</sup> y generando como productos nicotinamida, 2'-O-Acetyl-ADP-Ribosa (2'AADPR) y el péptido deacetilado.

El estudio de las sirtuinas en organismos parásitos, puntualmente protozoarios, es un campo poco explorado, pero promisorio, ya que la evidencia que se tiene a la fecha demuestra que, además de las funciones típicas, estas proteínas les otorgan ventajas adaptativas como la variación antigénica y formas alternativas para la progresión del ciclo celular. Estudios previos del Laboratorio de Investigaciones Básicas en Bioquímica (Libbiq) permitieron la identificación bioinformática de cinco genes candidatos a sirtuina en el genoma de *G. duodenalis*; se ha realizado la evaluación experimental de los dos primeros, GdSir2.1 y GdSir2.2, y se encontró que son proteínas de la familia sirtuina debido a sus características estructurales y sus funciones enzimáticas.

Teniendo en cuenta la posible importancia de las sirtuinas en este organismo, se planteó este trabajo para identificar un nuevo candidato a sirtuina en *G. duodenalis*, mediante herramientas bioinformáticas y experimentales, con el fin de ampliar el conocimiento sobre la bioquímica de este parásito, para proponer nuevos blancos terapéuticos que permitan desarrollar estrategias de control efectivas contra esta parasitemia.

## Materiales y métodos

A partir de la secuencia del candidato a sirtuina (GdSir2.3), identificado previamente en bases de datos, se realizaron dos aproximaciones para su caracterización:

### Aproximación bioinformática

#### Búsqueda de dominios conservados

La secuencia candidato GdSir2.3 (GL50803\_16569) fue utilizada para un alineamiento múltiple con las siete sirtuinas humanas (códigos de

acceso UniProt: Q96EB6; Q8IXJ6; Q9NTG7; Q9Y6E7; Q9NXA8; Q86T7; Q9NRC8) y los cinco candidatos a sirtuina de *Giardia*, de los cuales se han identificado experimentalmente dos (códigos de acceso GiardiaDB: GL50803\_10708, GL50803\_10707, GL50803\_16569, GL50803\_11676, GL50803\_6942.) Dicho alineamiento múltiple se realizó y visualizó con el software CLC MainWorkbench v. 7. 8. Adicionalmente, la secuencia candidato se evaluó en los servidores Conserved Domains Database y Pfam [1] para identificar dominios conservados pertenecientes a la familia sirtuina.

#### Análisis estructural del candidato

A partir de la secuencia de aminoácidos del candidato (GdSir2.3) se construyeron diferentes modelos de estructura terciaria basados en los algoritmos de homología (Swiss Model) [2], *threading* (I - Tasser) [3] y *ab initio* (Robetta) [4]. Los modelos obtenidos fueron validados mediante los puntajes de cada servidor, gráfico de Ramachandran con el servidor Rampage [5] y por superposición con la estructura cristalizada de la SIRT5 de *Homo sapiens*, la sirtuina con mayor homología con el candidato. Adicionalmente, se realizó la superposición de estos con la sirtuina 1 humana (SIRT1). Los modelos y las superposiciones fueron visualizados en el software UCSF Chimera 1. 11. 2 65.

#### Predicción de modificaciones postraduccionales del candidato

Se realizó la predicción de fosforilación del candidato empleando los servidores NetPhos 3.1 [6] y GPS 5.0 [7]. Dichas predicciones se realizaron con la secuencia de aminoácidos de la proteína y se evaluaron siguiendo los parámetros establecidos por cada uno de los servidores.

## Aproximación experimental

### Clonación del gen GdSir2.3

El gen GdSir2.3 se amplificó mediante PCR bajo las siguientes condiciones de reacción: 2 mM de Buffer de PCR 1X (20 mM Tris-HCl pH 8,8, 10 mM KCl, 0,1% (v/v) Triton X-100, 0,1 mg/ml de BSA), 0,2 mM de dNTPs, 0,2 μM de primer directo (5'- CAC CAT GGT ACC CGA TGT AGA TG -3') y reverso (5'- GTC GAC CTA ATC TAT ATT GAG AAT AGA CG -3'), 1U de *Pfu* polimerasa, 50 ng de DNA genómico de *G. duodenalis* y H<sub>2</sub>O DEPC, para un volumen final de 25 μL. El ciclo térmico de PCR consistió en una etapa de desnaturación a 95 °C durante 5 min, seguida por 25 ciclos de 45 s a una temperatura de 56 °C y con una etapa de extensión de 7 min a 72 °C. Los resultados fueron visualizados mediante geles de TBE - Agarosa 1% *p/v* y documentados en el analizador de imágenes Imager® Gel DocTMXR, con el software Quantity One Basic 4.6.3 de Bio-Rad™. El producto de PCR fue ligado en el vector pET100/D-TOPO y transformado en células químicamente competentes *E. coli* cepa TOP10 de acuerdo con las instrucciones del fabricante [8]. Los plásmidos recombinantes se extrajeron mediante lisis alcalina [9] y se confirmó su identidad por PCR y digestión con enzimas de restricción [10].

### Expresión y purificación de la proteína recombinante 6xHis-GdSir2.3

El plásmido recombinante se usó para la transformación de células competentes *E. coli* de la cepa *SHuffle* [11]. Las células se incubaron a 37 °C con agitación constante en medio líquido LB suplementado con glucosa 1% *m/v*, ZnCl<sub>2</sub> 2,5 μM y 100 μg/mL de ampicilina hasta alcanzar una OD<sub>600</sub> de 0,6. En este punto se adicionó el inductor (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido, IPTG) a concentración final de 0,1 μM, se incubaron las células durante 4 h y se colectaron mediante centrifugación a 6000 rpm durante 10 min a 4 °C.

Los pellets obtenidos se resuspendieron en buffer de lisis (50 mM buffer fosfatos pH 7,8, NaCl 400 mM, KCl 100 mM, glicerol 10%, Triton X-100 0,5% e imidazol 10 mM) agregando 5 mL de buffer por cada gramo de células y lisozima a una concentración final de 1 mg/mL. Se incubó la mezcla durante media hora en baño de hielo con agitación constante, se lisaron las células en ausencia de inhibidor de proteasas mediante sonicación durante 10 min (15 s de pulso, 15 s de reposo) y se centrifugaron a 14.000 G durante 20 min a 4 °C para separar la fracción soluble (sobrenadante) y la fracción insoluble (pellet). Los resultados de la expresión fueron evaluados mediante SDS - PAGE y western blot [12].

La fracción soluble obtenida en la lisis fue incubada con 5 volúmenes de resina Ni - NTA Agarose empacada durante 4 h con agitación constante a 4 °C. Luego se empacó la mezcla en una columna de cromatografía y se realizaron los siguientes lavados: un primer lavado de 1 mL con buffer de lisis (50 mM buffer fosfatos pH 7,8, NaCl 400 mM, KCl 100 mM, glicerol 10%, Triton X-100 0,5% e imidazol 10 mM), dos lavados de 1 mL cada uno con el buffer de lavado 1 (50 mM buffer fosfatos pH 7,8, NaCl 400 mM, KCl 100 mM, glicerol 10%, Triton X-100 0,5% e imidazol 35 mM) y dos lavados de 1 mL cada uno con el buffer de lavado 2 (50 mM buffer fosfatos pH 7,8, NaCl 400 mM, KCl 100 mM, glicerol 10%, Triton X-100 0,5% e imidazol 75 mM). La proteína recombinante se eluyó de la columna con 500 µL del buffer de elución (50 mM buffer fosfatos pH 7,8, NaCl 400 mM, KCl 100 mM, glicerol 10%, Triton X - 100 0,5% e imidazol 300 mM) [13]. El resultado fue monitoreado mediante SDS - PAGE y los eluidos fueron cuantificados por el método colorimétrico de Bradford y densitometría.

Paralelamente, se realizó la purificación de la proteína 6xHis-GdSir2.3 desde los cuerpos de inclusión mediante SDS - PAGE preparativo [14] y por cromatografía de afinidad bajo condiciones desnaturalantes [13]. La proteína purificada fue dializada para remover el imidazol siguiendo el protocolo de Herrera y colaboradores (2019) [15].

### Producción de anticuerpos policlonales contra la proteína recombinante 6xHis-GdSir2.3 en modelo aviar

Se inocularon dos gallinas de la raza Hyline de 50 semanas bajo el siguiente esquema de inmunización: para la primera inoculación el individuo control fue inyectado con PBS y adyuvante completo de Freund en una relación 1:1 para un volumen final de inyección de 300 µL; por otra parte, el individuo tratamiento fue inyectado con 100 µg de 6xHis-GdSir2.3 (antígeno purificado) y adyuvante completo de Freund para una proporción y volumen final iguales que en el individuo control. El primer refuerzo de inmunización se realizó a los 15 días de la primera inoculación, empleando en esta ocasión adyuvante incompleto de Freund para ambos individuos. Los siguientes dos refuerzos se realizaron cada 8 días [16]. Una vez finalizado el esquema de inmunización, se evaluó la capacidad de reconocimiento de las sangrías mediante western blot con 6xHis-GdSir2.3 y se purificaron los anticuerpos por afinidad a antígeno [17].

### Cultivo celular y enquistación de *G. duodenalis*

Con el objeto de identificar la proteína endógena en el parásito en sus diferentes estadios de vida trofozoitos de *G. duodenalis* cepa WB fueron cultivados a 37 °C en medio TYI-S-3368 [18] hasta alcanzar la fase logarítmica. Para la recolección de los parásitos se incubaron los tubos de cultivo a 4 °C durante 1 h y luego se centrifugaron a 3000 rpm en el rotor MicroLiter 30x2 sealed de la centrífuga Heraeus Megafuge 16R de ThermoFisher durante 15 min. Se lavó el pellet hasta 3 veces con PBS 1X para retirar el exceso de medio de cultivo, se resuspendieron los parásitos en 1 mL de PBS 1X y se almacenaron a -20 °C para posteriores procedimientos.

Para la obtención de quistes se cultivaron los parásitos como se describió anteriormente y una vez alcanzada la fase estacionaria se realizó el cambio del medio TYI - S - 33 por medio de enquistación (medio TYI - S - 33 suplementado con 10 mg/ml de bilis bovina y pH 7.8) y se incubaron los parásitos a 37 °C durante 24 h. Posteriormente se realizó de nuevo el cambio

a medio TYI - S - 33 y se incubaron los parásitos a 37 °C. Una vez pasadas 24 h, se retiró el medio de cultivo y se incubaron los parásitos en agua para lisar por choque hipotónico las células que no se hubieran enquistado [19]. Los quistes resultantes se lavaron dos veces con PBS 1X filtrado, se resuspendieron en 1 mL de PBS 1x filtrado y se almacenaron a -20 °C.

### Identificación de GdSir2.3 en extractos celulares e inmunofluorescencia

Con el objetivo de identificar la proteína nativa GdSir2.3 se recolectaron trofozoitos asincrónicos y durante las 24 horas de la enquistación. Los extractos fueron evaluados mediante western blot empleando el anticuerpo IgY -  $\alpha$  - 6xHis - GdSir2.3 (1:50) siguiendo el protocolo de Herrera y colaboradores (2019) [15], usando el sistema super signal west substrate (Thermo). Como control de enquistación se reconocieron las proteínas de la pared del quiste CWP1 empleando un anticuerpo comercial contra estas en una dilución de 1:500.

Para establecer la ubicación subcelular de GdSir2.3 se realizaron ensayos de inmunofluorescencia. Se resuspendieron los trofozoitos y quistes en PBS 1X para una concentración final de 1000 parásitos/µL. Se sembraron 10 µL de células sobre una lámina de vidrio y se unieron por incubación a 37 °C durante 1 h. Las células se fijaron con paraformaldehído 4% (*m/v*) y se bloquearon e impermeabilizaron durante 2 h a 37 °C con solución de bloqueo (Triton X - 100 0,5% (*v/v*), BSA 3% (*m/v*) en PBS). Se adicionó el anticuerpo primario  $\alpha$ -6xHis-GdSir2.3 IgY a una dilución de 1:100 en PBS y se incubó durante toda la noche a 37 °C. Así mismo, se adicionó el anticuerpo primario  $\alpha$ -CWP conjugado a TAMRA (1:250 en PBS) sobre los extractos de quistes bajo el mismo tratamiento del anticuerpo anterior. Como anticuerpo secundario para  $\alpha$ -6xHis-GdSir2.3 IgY se adicionó el  $\alpha$ -IgY acoplado a Alexa Fluor (ThermoFisher) 488 (1:1000 en PBS). Se uso un anticuerpo comercial contra alfa tubulina acetilada como control (1:500) y se empleó el  $\alpha$ -mouse acoplado a Dylight (ThermoFisher) (1:1000 en PBS), los anticuerpos secundarios se incubaron durante 1 h a 37 °C en oscuridad y posteriormente se lavó la lámina dos veces con PBS. Finalmente, se marcaron los núcleos con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, 1 µg/µl) durante 3 min a temperatura ambiente, se retiró el exceso de DAPI con agua MQ y se almacenó la lámina a 4 °C en oscuridad para su posterior registro en el microscopio de fluorescencia Nikon C1 con fluoromount y un objetivo de 40X. Las imágenes obtenidas con el microscopio fueron procesadas con el software ImageJ [20].

### Evaluación de la actividad deacetilasa de la proteína recombinante 6xHis-GdSir2.3

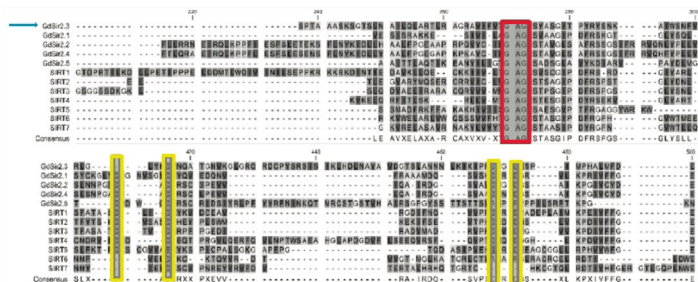
Para evaluar la actividad enzimática de 6xHis-GdSir2.3 se usó el kit CycLex SIRT1/Sir2 Deacetylase Fluorometric Assay Kit Ver. 2 siguiendo las indicaciones del fabricante [21], empleando 300 ng de proteína recombinante en presencia y ausencia de 8 mM NAD<sup>+</sup> y teniendo como control la SIRT2 de *Homo sapiens* [21]. Se realizaron tres ensayos independientes de deacetilación en el equipo CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (BioRad) con una longitud de onda de excitación de 488 nm y la lectura de fluorescencia a 521 nm.

## Resultados y discusión

### El candidato GL50803\_16569 (GdSir2.3) presenta dominios conservados de la familia sirtuina

Al analizar la secuencia de aminoácidos correspondiente al candidato GL50803\_16569 (381 aminoácidos, 43,9 kDa) mediante alineamientos múltiples con sirtuinas ya caracterizadas se encuentra el motivo G - A - G y

los residuos de cisteína característicos de las sirtuinas hacia la región amino terminal que corresponde a un plegamiento tipo Rossman, compuesto por una serie de hélices  $\alpha$  y láminas  $\beta$  antiparalelas con características típicas de unión a nucleótidos. En esta región se une el dinucleótido de adenina y nicotinamida (NAD+) como cosustrato, adyacente al sitio de unión de la acetil-lisina [22] (Figura 1).



**Figura 1.** Alineamiento múltiple de las secuencias de las sirtuinas de *G. duodenalis* (GdSir2.3, GdSir2.1, GdSir2.2, GdSir2.4 y GdSir2.5, respectivamente) con las sirtuinas humanas (SIRT1 – 7). Se presenta el alineamiento parcial de secuencias en donde se observa señalado en el recuadro rojo el motivo G – A – G y en amarillo las cisteínas conservadas. Realizado con CLC Main Workbench V. 7.8.

La presencia del dominio G-A-G y las cuatro cisteínas en la secuencia candidata podría indicar que se trata de una sirtuina, ya que se ha encontrado que los residuos de cisteína se ubican en la región pequeña del dominio catalítico coordinando un átomo de zinc, que, si bien no participa en la catálisis, resulta indispensable para la actividad enzimática como lo han demostrado diferentes estudios donde al mutar estos residuos o adicionar agentes quelantes se da la pérdida de la actividad deacetilasa de la proteína [23]. Al observar el alineamiento también se encuentran otras regiones de alta homología entre las sirtuinas del parásito y las humanas; no obstante, estas se encuentran en dominio catalítico y permiten su organización estructural.

Para corroborar que el candidato GdSir2.3 presenta características estructurales de una sirtuina, se buscaron dominios conservados en la secuencia con los servidores CDD y Pfam; se encontró que esta secuencia presenta el dominio típico de la superfamilia sirtuina entre los residuos 60 y 270 aproximadamente, lo cual se valida con el E - value obtenido para cada búsqueda (Tabla 1, Figura 2). Lo anterior corresponde a una región de unos 200 aminoácidos que es la longitud promedio del dominio catalítico; además, debido a la ubicación de este a lo largo de la secuencia, es acorde con la presencia de regiones de baja homología hacia los extremos amino y carboxi terminal, las cuales tienen una función reguladora de la actividad enzimática, principalmente por ser los blancos de modificaciones postraduccionales [24].

**Tabla 1.** Dominios conservados encontrados en la secuencia de GdSir2.3 mediante los servidores CDD y Pfam. Se presentan los códigos de acceso para cada base de datos, el intervalo que corresponde al dominio y el E - value para cada uno.

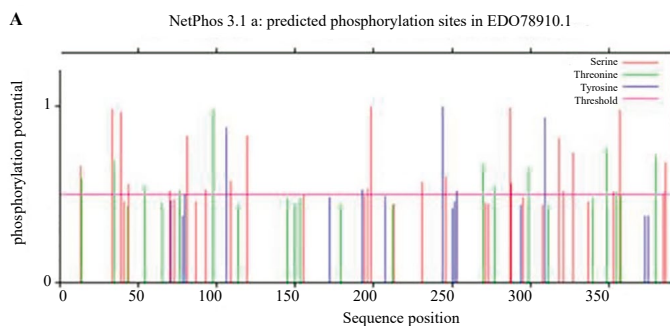
| Servidor | Nombre           | Acceso  | Intervalo | E-value    |
|----------|------------------|---------|-----------|------------|
| CDD-NCBI | SIR2 Superfamily | cl00195 | 61-274    | 6,43e - 32 |
| Pfam     | SIR2             | cl0085  | 66-274    | 7.2e-22    |

Al someter la secuencia del candidato GdSir2.3 al servidor NetPhos 3.1 de ExPASy se observó que esta presenta 62 residuos potenciales para fosforilación como se muestra en la Figura 3. Dichos residuos se ubican en su mayoría hacia los extremos N - Terminal y C - Terminal de la secuencia, fuera de la región que se espera conforme el dominio catalítico. Cabe resaltar que existe también la probabilidad que GdSir2.3 sea fosforilada en su dominio catalítico; esto se ha visto experimentalmente en SIRT1 en donde esta modificación postraduccional actúa como un interruptor de la actividad catalítica que al ser removida promueve la actividad enzimática, de manera que permite la progresión del ciclo celular [25]. Las

fosforilaciones en sirtuinas de parásitos protozoarios no han sido estudiadas de forma experimental; no obstante, es un campo promisorio para entender los mecanismos de regulación de estas enzimas que representan funciones vitales en dichos organismos.



**Figura 2.** Representación esquemática de la estructura sirtuina. A. Predicción de dominios conservados con el servidor CDD – NCBI. B. Predicción de dominios conservados con el servidor Pfam. C. Representación esquemática de las estructuras de las siete sirtuinas humanas. En azul se observa el extremo N – Terminal; en café, el dominio conservado; en verde, el C – Terminal. Tomado de Saccony y colaboradores (2016).



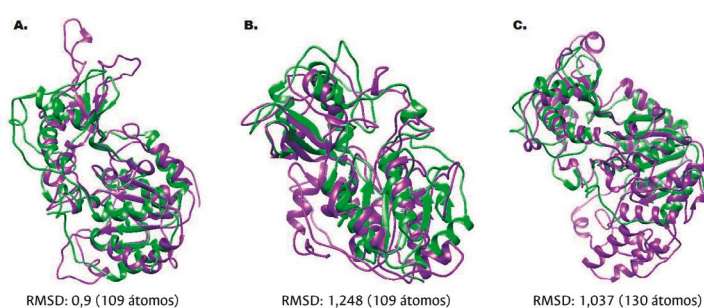
**Figura 3.** Predicción de fosforilaciones del candidato GdSir2.3. A. Predicción de fosforilaciones sobre el candidato GdSir2.3 mediante el servidor NetPhos 3.1 de ExPASy.

La probabilidad de que el candidato GdSir2.3 esté regulado por modificaciones como la fosforilación es importante para su estudio como blanco farmacológico, ya que se ha encontrado que esta modificación actúa como un interruptor de la actividad catalítica de diferentes sirtuinas dentro de las que se encuentran las humanas. La regulación de la actividad catalítica mediada por modificaciones postraduccionales ha sido ampliamente estudiada en las siete sirtuinas humanas y se ha encontrado que para todas ellas es común la fosforilación [24].

En organismos filogenéticamente cercanos a *G. duodenalis* también se han estudiado las modificaciones postraduccionales de las sirtuinas; tal es el caso de *Mycobacterium tuberculosis* y su única sirtuina (mDAC) que se fosforila en el residuo Thr – 314, lo que genera la inhibición de la enzima, contrario a lo observado en las sirtuinas de eucariotes superiores [26]. En *G. duodenalis* la fosforilación juega un papel muy importante en el dimorfismo celular a lo largo de su ciclo de vida. Estudios sobre el kinoma de este parásito han revelado que presenta menos quinasas en comparación con otros eucariotes. Entre las quinasas ausentes en *G. duodenalis* se encuentran algunas que regulan procesos como la progresión del ciclo celular y

la reparación de daños en el DNA, las cuales se encuentran entre las funciones descritas para sirtuinas de otros organismos [27].

Por otra parte, al realizar el modelamiento tridimensional del candidato con diferentes algoritmos, se observó que se mantiene el plegamiento sirtuina en todos los modelos (Figura 4) y, de acuerdo con los parámetros de evaluación de los modelos, se observa un mejoramiento de estos. De este modo, para el modelo obtenido por el algoritmo de homología del servidor SwissModel se tiene una baja identidad con la plantilla empleada, la cual podría corresponder únicamente al modelamiento del dominio sirtuina. En cuanto al siguiente modelo, realizado por el servidor I-Tasser, empleando el algoritmo de *threading*, se observa una disminución de la calidad de aquel debido a que el servidor intenta modelar aquellas regiones que no presentan homología con la plantilla teniendo en cuenta el contexto molecular de los aminoácidos involucrados. No obstante, se mantiene el tamaño esperado para el dominio catalítico. En el modelo obtenido mediante el algoritmo de *ab initio* se evidencia una mejoría debido a una reducción del RMSD entre un mayor número de átomos apareados entre ambas plantillas.



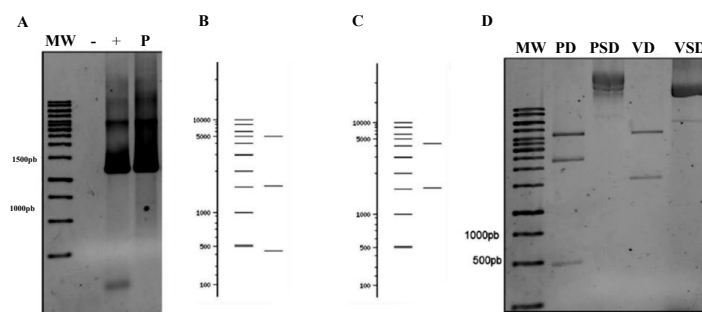
**Figura 4.** Comparación por superposición de modelos tridimensionales de GdSir2.3 (GL50803\_16569), realizados en diferentes servidores, con plantilla cristalizada de SIRT5 (Q9NXA8). En cada superposición se indica el número RMSD que es menor de dos en todos los casos. A. Modelo por homología. B. Modelo por *threading*. C. Modelo por *ab initio*.

### La sirtuina GdSir2.3 es una deacetilasa dependiente de NAD presente en ambos estadios de vida del parásito

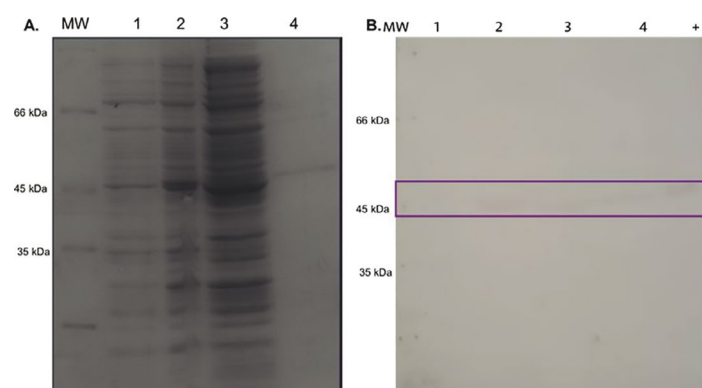
El producto de PCR correspondiente al candidato GL50803\_16569 se insertó en el vector de expresión pET100/D-TOPO el cual otorga una etiqueta de polihistidina en el extremo N - Terminal de la proteína recombinante. La identidad del plásmido recombinante se verificó mediante PCR y digestión enzimática (Figura 5). Al realizar la inducción de la expresión de la proteína recombinante con IPTG se observa el aumento de una proteína de aproximadamente 46 kDa, la cual es reconocida de manera específica en extractos celulares totales, fracción soluble y fracción insoluble mediante western blot con anticuerpos que reconocen la etiqueta de polihistidina (Figura 6).

Al evaluar la actividad deacetilasa mediante el kit de deacetilación *in vitro* CycLex SIRT1/Sir2 Deacetylase Fluorometric Assay Kit Ver. 2 de la proteína soluble purificada se observa emisión de fluorescencia que indica que 6xHis-GdSir2.3 presenta actividad deacetilasa dependiente de NAD (Figura 7). Comparando la actividad deacetilasa de 6xHis-GdSir2.3 con la de SIRT1 humana se observan diferencias tanto en los niveles de deacetilación alcanzados, expresados en URF uy (Unidades Relativas de Fluorescencia) (Figura 6A), como en el comportamiento de ambas enzimas a través del tiempo (Figura 6B). Esto puede explicarse teniendo en cuenta la actividad específica de cada enzima y la afinidad por el sustrato, de tal manera que para SIRT1 se vea favorecida la reacción de deacetilación de manera más eficiente que para el candidato. Cabe resaltar también que la remoción del imidazol no fue completa y a pesar de que su concentración se haya reducido hasta aproximadamente 10 mM, existe la posibilidad de que siga ejerciendo un efecto inhibitorio en GdSir2.3 Finalmente, se debe tener en cuenta también que el kit de deacetilación fue desarrollado bajo las condiciones óptimas de reacción para la SIRT1 humana, y al ser *G. duodenalis*

un organismo filogenéticamente lejano de los mamíferos, se espera que las condiciones óptimas para la actividad de GdSir2.3 sean muy diferentes.



**Figura 5.** Creación del plásmido recombinante pET-100-GdSir2.3. A. Evaluación de plásmido recombinante por PCR. TBE - Agarosa 1%. MW: marcador de peso molecular 1Kb. P: plásmido pET-100-GdSir2.3; B. Perfil de digestión esperado para el plásmido recombinante. NebCutter V.2.0; C. Perfil esperado para el plásmido vacío NebCutter V; D. Digestión del plásmido con EcoRV, en orden: PD: plásmido recombinante digerido, PSD: plásmido sin digerir, V: plásmido vacío digerido, VSD: plásmido vacío sin digerir 2.0. TBE - Agarosa 0,8%.



**Figura 6.** Purificación de 6xHis - GdSir2.3 a partir de la fracción soluble de *E. coli* cepa Shuffle por cromatografía de afinidad a níquel. A. SDS - PAGE, acrilamida 10%. B. Western blot, membrana de nitrocelulosa. 1°: IgY -  $\alpha$  - 6xHis - GdSir2.3 (1:1000), 2°:  $\alpha$  - IgY - Fosfatasa alcalina (1:10000). MW: marcador de peso molecular, 1: células totales sin inducir, 2: células totales inducidas, 3: fracción soluble, 4: eluido, +: Fracción insoluble de *E. coli* cepa Shuffle inducidas, -: BSA.

Por otra parte, se ha encontrado que algunas sirtuinas ya caracterizadas en parásitos protozoarios presentan actividad deacetilasa y ADP - ribosiltransferasa. Tal es el caso de la TbSir2rp1 de *T. brucei* que está implicada en la reparación de daños en el DNA mediante la ADP - ribosilación [28]. Para llevar a cabo su función, esta proteína presenta dos rutas: la primera, que consiste en la interacción de la 2 - O - acetil - ADP - ribosa, producida en la deacetilación, y las histonas; y la otra, dependiente de la interacción entre el péptido acetilado y la ADP - ribosa, pero que aún no ha sido completamente elucidada [29]. Además, también se ha encontrado que las sirtuinas presentan la capacidad de remover varios grupos acilo de las lisinas gracias a variaciones estructurales presentes dentro y fuera del dominio catalítico; y junto al contexto que acompaña el aminoácido modificado, la variabilidad de afinidad por diferentes sustratos permite que las sirtuinas tengan diferentes funciones en un mismo organismo [30]. Teniendo en cuenta la posible actividad ADP - ribosiltransferasa y una mayor afinidad por otros sustratos, junto con las condiciones óptimas de reacción, se podría explicar la baja actividad enzimática presentada por GdSir2.3 en el ensayo *in vitro*.

En cuanto a la ubicación subcelular, se encontró, mediante western blot sobre extractos celulares de parásitos (Figura 8) e inmunofluorescencia en trofozoitos y quistes empleando los anticuerpos policlonales obtenidos en modelo aviar (Figura 9), que GdSir2.3 está presente en ambos estadios del parásito.



Al evaluar por western blot con el anticuerpo IgY -  $\alpha$  - 6xHis-GdSir2.3 los extractos totales de trofozoítos asincrónicos y de células tras 24 horas de enquistación, se reconoce claramente una proteína de aproximadamente 44kDa durante todo el proceso, y su nivel se mantiene constante; dicho tamaño corresponde a lo esperado para la proteína endógena (43,9 kDa, Figura 7A). Como control de enquistación se detectaron las proteínas de la pared del quiste (CWP, 26 kDa) y se obtuvo el reconocimiento mostrando que aumenta a medida que pasan las horas de enquistación, lo cual indica que, efectivamente, el proceso de enquistación fue exitoso (Figura 7B)

Análisis del transcriptoma a lo largo del ciclo de vida del parásito han demostrado que el gen correspondiente al candidato GdSir2.3 aumenta significativamente su expresión a las 24 horas de enquistación, mientras que las sirtuinas ya caracterizadas, GdSir2.1 y GdSir2.2, junto a los otros candidatos, GdSir2.4 y GdSir2.5, disminuyen [31]. Lo anterior podría indicar la relevancia de GdSir2.3 en el proceso de enquistación. Por otra parte, Carranza y colaboradores (2016) encontraron que debido a la falta de mecanismos de regulación típicos, como factores de transcripción canónicos, para este organismo, la regulación de la expresión génica a nivel postranscripcional y traduccional, así como los factores epigenéticos, tendrían un papel muy importante durante el ciclo de vida, principalmente en la enquistación, como lo demuestra la disminución de los niveles de acetilación de histonas observados durante este proceso. Adicionalmente, en otros estudios se ha encontrado que al suplementar el medio de cultivo con inhibidores de HDCAs se produce una hipoacetilación de las histonas y se detiene la enquistación. El reconocimiento tanto en trofozoítos como durante la enquistación de GdSir2.3 y en extractos de quistes aporta evidencia de la importancia de esta proteína para la progresión del ciclo de vida del parásito [32].

Entre las sirtuinas citoplasmáticas se encuentra la SIRT2 de *H. sapiens* para la cual se han descrito diferentes funciones como el mantenimiento de la estabilidad genómica durante la mitosis [33], el control de la diferenciación celular mediante la deacetilación de factores de transcripción y tubulina [34] y la protección celular durante estrés oxidativo a partir de la regeneración de los niveles de NADPH mediante la vía de las pentosas fosfato [35]. De otra parte, en organismos evolutivamente más cercanos a *G. duodenalis*, como *T. cruzi*, se ha observado que la sobreexpresión de TcSir2RP1, una sirtuina citoplasmática, induce la diferenciación a tripamastigotes y aumenta la eficiencia del proceso infeccioso de este organismo sobre células mamíferas [36]. Otro parásito protozoario que cuenta con una sirtuina citoplasmática caracterizada es *Entamoeba histolytica* (EhSir2a), y si bien su función específica no ha sido determinada, los ensayos de interacción de proteínas realizados por Dam y Lohia (2010) mostraron que esta sirtuina interactúa, entre otras proteínas, con la tubulina y además puede deacetilarla. Lo anterior indicaría que EhSir2a constituye un mecanismo de regulación adicional de procesos como la segregación de cromatina, la mitosis y la división celular [37].

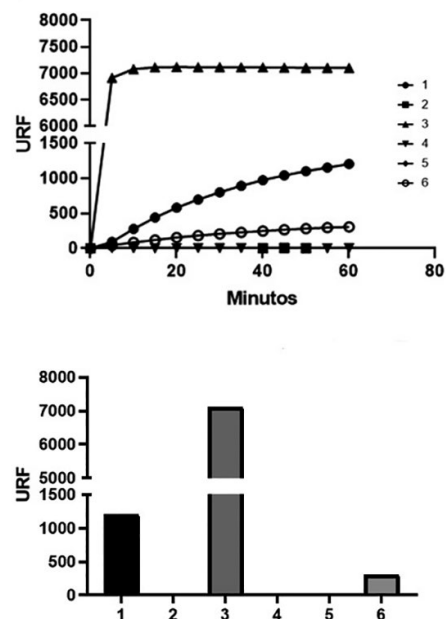
Para *G. duodenalis* ya se ha identificado una sirtuina citoplasmática (GdSir2.1) que podría estar interactuando con estructuras ricas en tubulina como el cuerpo medio del parásito, y por lo tanto tendrían un papel importante en la organización estructural del trofozoíto [15]. Si bien GdSir2.3 también es citoplasmática, no habría una redundancia de funciones, ya que esta tiene una distribución diferente en el trofozoíto y además los niveles de expresión sugieren que, en esa etapa del ciclo de vida, GdSir2.1 sería la sirtuina activa.

En cuanto a la ubicación subcelular de GdSir2.3 en el quiste, también se encontró una localización citoplasmática; adicionalmente, se observa un fuerte reconocimiento sobre gránulos en la pared del quiste que podrían corresponder al cuerpo multivesicular del parásito (MVB). A lo largo del ciclo de vida de *G. duodenalis* existen estructuras vesiculares que este utiliza para procesos que van desde la endocitosis en trofozoítos hasta la regulación de la infección y la sincronización de la enquistación en estadios más avanzados de la enfermedad [38].

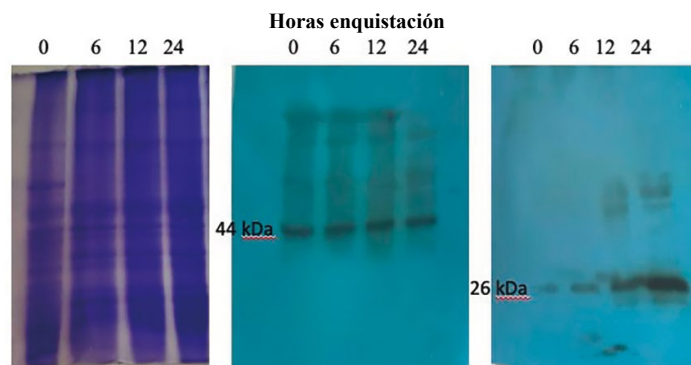
Es probable que GdSir2.3 se encuentre en estas vesículas, teniendo en cuenta lo encontrado por Ma'ayeh y colaboradores (2017) en sus análisis de las proteínas presentes en el secretoma de Giardia durante la interacción con las células del hospedero [39]. Las proteínas predominantes en dicho

análisis corresponden a diferentes funciones metabólicas de carbohidratos, lípidos y salvamento de nucleótidos; esta última es una evidencia de la competencia por nutrientes entre las células del hospedero y el parásito.

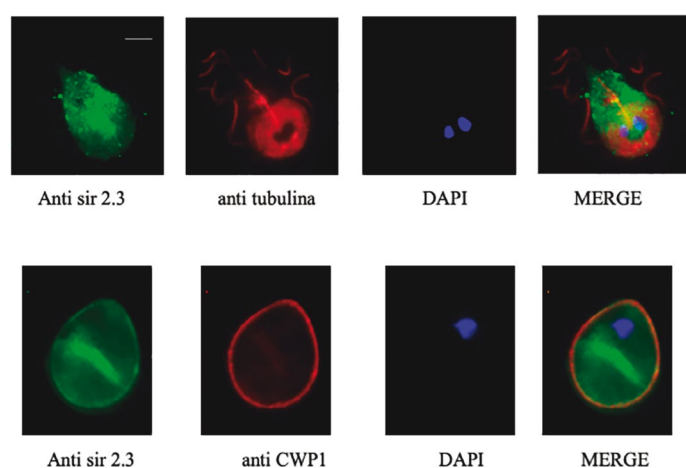
Así mismo, las vesículas presentaron también proteínas, tanto ya caracterizadas como hipotéticas, con alto potencial antioxidante y cuya función está asociada a combatir las ROS producidas por el hospedero como respuesta a la infección [39]. Es importante resaltar que, además de regular el silenciamiento génico junto a las otras deacetilasas, las sirtuinas también constituyen un mecanismo de respuesta durante el estrés oxidativo [40] y, por lo tanto, la localización de GdSir2.3 en las vesículas secretadas indicaría una función adicional a la regulación del cambio de forma celular, que en este caso sería la defensa del parásito durante la infección.



**Figura 7. A.** Evaluación de la actividad deacetilasa dependiente de NAD de 6xHis - GdSir2.3. A. Actividad deacetilasa en función del tiempo. 1. 6xHis - GdSir2.3 (300 ng) en buffer de deacetilación. 2. 6xHis - GdSir2.3 (250 ng) en buffer de elución. 3. SIRT1 de *H. sapiens* (250 ng). 4. 6xHis - GdSir2.3 (250 ng) en ausencia de NAD (8mM). 5. Reacción de deacetilación sin 6xHis - GdSir2.3 en presencia de buffer de deacetilación. 6. Reacción de deacetilación sin 6xHis - GdSir2.3. B. Actividad deacetilasa medida en URF (unidades relativas de fluorescencia).



**Figura 8. A.** Extractos totales de parásitos de Giardia ( $1 \times 10^6$  parásitos) durante las 24 horas de la enquistación, tinción con coomassie. B. Detección de GdSir2.3 (43,9 kDa,) por western-blot en extractos totales de los parásitos enquistantes mostrados en la figura A. 1°: IgY- $\alpha$ -6xHis-GdSir2.3 (1:500), 2°:  $\alpha$  - IgY peroxidasa (1:10000). C. Western blot de la proteína control de la enquistación CWP1 (26 kDa): 1°:  $\alpha$  - CWP1 (1:500), 2°:  $\alpha$  - IgG peroxidasa (1:10000). Revelado sistema quimioluminiscente.



**Figura 9.** Identificación de GdSir2.3 endógena mediante inmunofluorescencia. A. Inmunofluorescencia sobre trofozoítos. En verde se presenta la localización de Gdsir2.3, en rojo la señal de tubulina, como control; en azul los núcleos y el merge de las tres imágenes. B. Inmunofluorescencia sobre quistes. En verde GdSir 2.3, en rojo anti CWP1, marcadora de la pared del quiste, en azul los núcleos y el merge de las tres imágenes. El anticuerpo IgY- $\alpha$ -6xHisGdSir2.3 permitió identificar a GdSir2.3 como una proteína citoplasmática en ambos estadios del ciclo de vida del parásito. Cabe mencionar que la proteína presenta una distribución vesicular y una concentración cerca de la pared del quiste.

## Conclusiones

Se identificó, empleando herramientas computacionales y experimentales, al candidato GdSir2.3 de *G. duodenalis* como una deacetilasa dependiente de NAD que cuenta con características estructurales típicas de la familia sirtuina y presenta una localización subcelular citoplasmática en trofozoítos y quistes del parásito.

## Agradecimientos

A la Dirección de Investigación y Extensión (DIEB), Vicerrectoría de Investigación (VRI) y Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, por la financiación del proyecto “Explorando el metabolismo del NAD en parásitos protozoos: en búsqueda de blancos terapéuticos promisorios para el tratamiento de enfermedades infecciosas de alta incidencia en la salud pública”.

## Referencias

- [1] A. Marchler-Bauer *et al.*, “CDD: NCBI’s conserved domain database”, *Nucleic Acids Research*, vol. 43, no. D1, pp. D222-D226, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gku1221>.
- [2] A. Waterhouse *et al.*, “SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes”, *Nucleic Acids Research*, vol. 46, no. W1, pp. W296-W303, Jul. 2018.
- [3] J. Yang, R. Yan, A. Roy, D. Xu, P. J, and Y. Zhang, “The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction”, *Nat Methods*, vol. 12, no. 1, pp. 7-8, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1038/nmeth.3213>.
- [4] D. E. Kim, D. Chivian, and D. Baker, “Protein structure prediction and analysis using the Robetta server”, *Nucleic Acids Research*, vol. 32, no. Web Server issue, pp. W526-W531, Jul. 2004. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkh468>.
- [5] S. C. Lovell *et al.*, “Structure validation by C alpha geometry: phi,psi and C beta deviation”, *Proteins-Structure Function and Genetics*, vol. 50, no. August 2002, pp. 437-450, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1002/prot.10286>.
- [6] N. Blom, T. Sicheritz-Pontén, R. Gupta, S. Gammeltoft, and S. Brunak, “Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence”, *PROTEOMICS*, vol. 4, no. 6, pp. 1633-1649, Jun. 2004. DOI: <https://doi.org/10.1002/pmic.200300771>.
- [7] Y. Xue *et al.*, “GPS 2.1: Enhanced prediction of kinase-specific phosphorylation sites with an algorithm of motif length selection”, *Protein Engineering, Design and Selection*, vol. 24, no. 3, pp. 255-260, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1093/protein/gzq094>.
- [8] Invitrogen TM, “User Manual Champion™ pET Directional TOPO® Expression Kits”, *Invitrogen User Guide*, no. 25, 2010.
- [9] I. Feliciello and G. Chinali, “A Modified Alkaline Lysis Method for the Preparation of Highly Purified Plasmid DNA from Escherichia Coli”, *Analytical Biochemistry*, vol. 212, no. 2, pp. 394-401, Aug. 1993. DOI: <https://doi.org/10.1006/ABIO.1993.1346>.
- [10] C. A. Nieto-Clavijo, C. Y. Marín-Mogollón, L. E. Contreras-Rodríguez, and M. H. Ramírez-Hernández, “Study of Specific Region of Plasmodium falciparum Nicotinamide/Nicotinate Mononucleotide Adenylyl Transferase (PfNMNAT): Characterizing a Possible Therapeutic Target”, *Journal of Molecular and Genetic Medicine*, vol. 11, no. 4, 2017. DOI: <https://doi.org/10.4172/1747-0862.1000311>.
- [11] J. Lobstein, C. A. Emrich, C. Jeans, M. Faulkner, P. Riggs, and M. Berkmen, “SHuffle, a novel Escherichia coli protein expression strain capable of correctly folding disulfide bonded proteins in its cytoplasm”, pp. 1-16, 2012.
- [12] S. Roy and V. Kumar, “A Practical Approach on SDS PAGE for Separation of Protein”, *International Journal of Science and Research*, vol. 3, no. 8, pp. 955-960, 2014.
- [13] J. A. Bornhorst and J. J. Falke, “[16] Purification of proteins using polyhistidine affinity tags”, *Methods in Enzymology*, vol. 326, pp. 245-254, Jan. 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(00\)26058-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(00)26058-8).
- [14] L. Jutinico, “Evaluación in vitro e in vivo de un candidato de la Quinasa del Dinucleótido de Adenina y Nicotinamida de Giardia intestinalis (GINADK)”, 2015.
- [15] E. Herrera, L. E. Contreras, A. G. Suárez, and G. J. Díaz, “GdSir2.1 of Giardia lamblia is a NAD D -dependent cytoplasmic deacetylase”, no. February, pp. 1-17, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01520>.
- [16] P. Moreno, G. Díaz, and M. Ramírez, “Production and purification of avian antibodies (IgYs) from inclusion bodies of a recombinant protein central in NAD<sup>+</sup> metabolism”, vol. 42, no. 2, pp. 12-20, 2013.
- [17] P. A. Moreno-González, G. J. Díaz, and M. H. Ramírez-Hernández, “Producción y purificación de anticuerpos aviarios (IgYs) a partir de cuerpos de inclusión de una proteína recombinante central en el metabolismo del NAD<sup>+</sup>”, *Revista Colombiana de Química*, vol. 42, no. 2, p. 27, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1002/bdm.565>.
- [18] D. Keister, “Axenic culture of Giardia lamblia in TYI-S-33 medium supplemented with bile”, *R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, vol. 77, pp. 487-488, 1983.
- [19] M. E. Alvarado and M. Wasserman, “Calmodulin expression during Giardia intestinalis differentiation and identification of calmodulin-binding proteins during the trophozoite stage”, *Parasitol Res*, vol. 110, no. 4, pp. 1371-1380, Apr. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2637-4>.
- [20] E. Gallego, M. Alvarado, and M. Wasserman, “Identification and expression of the protein ubiquitination system in Giardia intestinalis”, *Parasitology Research*, vol. 101, no. 1, pp. 1-7, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00436-007-0458-2>.
- [21] MBL International Corporation, “CycLex® SIRT2 Deacetylase Fluorometric Assay Kit Ver.2”.
- [22] B. D. Sanders, B. Jackson, and R. Marmorstein, “Structural basis for sirtuin function: What we know and what we don’t”, *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, vol. 1804, no. 8, pp. 1604-1616, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.09.009>.

- [23] J. Min, J. Landry, R. Sternglanz, and R. M. Xu, "Crystal structure of a SIR2 homolog-NAD complex", *Cell*, vol. 105, no. 2, pp. 269-279, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00317-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00317-8).
- [24] F. Flick and B. Lüscher, "Regulation of sirtuin function by posttranslational modifications", *Frontiers in Pharmacology*, vol. 3 FEB, no. February, pp. 1-13, 2012. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00029>.
- [25] K. Zhao and Z. Zhou, "Post-translational modifications of nuclear sirtuins", *Genome Instability & Disease*, vol. 1, no. 1, pp. 34-45, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s42764-019-00001-x>.
- [26] G. S. Yadav, S. K. Ravala, N. Malhotra, and P. K. Chakraborti, "Phosphorylation modulates catalytic activity of mycobacterial sirtuins", *Frontiers in Microbiology*, vol. 7, no. MAY, pp. 1-13, 2016. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00677>.
- [27] C. C. S. Chini, M. G. Tarrag, and E. N. Chini, "NAD and the aging process: Role in life, death and everything in between", *Molecular and Cellular Endocrinology*, pp. 1-13, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.11.003>.
- [28] S. Alsford, T. Kawahara, C. Isamah, and D. Horn, "A sirtuin in the African trypanosome is involved in both DNA repair and telomeric gene silencing but is not required for antigenic variation", *Molecular Microbiology*, vol. 63, no. 3, pp. 724-736, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05553.x>.
- [29] T. M. Kowieski, S. Lee, and J. M. Denu, "Acetylation-dependent ADP-ribosylation by Trypanosoma brucei Sir2", *Journal of Biological Chemistry*, vol. 283, no. 9, pp. 5317-5326, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M707613200>.
- [30] S. Moniot, M. Weyand, and C. Steegborn, "Structures, substrates, and regulators of mammalian Sirtuins - opportunities and challenges for drug development", *Frontiers in Pharmacology*, vol. 3 FEB, no. February, pp. 1-5, 2012. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00016>.
- [31] P. Carranza *et al.*, "Specific histone modifications play critical roles in the control of encystation and antigenic variation in the early-branching eukaryote Giardia lamblia", *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, vol. 81, pp. 32-43, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.10.010>.
- [32] S. Sonda *et al.*, "Epigenetic mechanisms regulate stage differentiation in the minimized protozoan Giardia lamblia", *Molecular Microbiology*, vol. 76, no. 1, pp. 48-67, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07062.x>.
- [33] T. Inoue, M. Hiratsuka, M. Osaki, and M. Oshimura, "The molecular biology of mammalian SIRT proteins: SIRT2 in cell cycle regulation", *Cell Cycle*, vol. 6, no. 9, pp. 1011-1018, May 2007. DOI: <https://doi.org/10.4161/cc.6.9.4219>.
- [34] Y. Wang, J. Yang, T. Hong, X. Chen, and L. Cui, "SIRT2: Controversy and multiple roles in disease and physiology", *Ageing Research Reviews*, vol. 55, no. September, p. 100961, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.arr.2019.100961>.
- [35] Y. Xu *et al.*, "Oxidative stress activates sirt2 to deacetylate and stimulate phosphoglycerate mutase", *Cancer Research*, vol. 74, no. 13, pp. 3630-3642, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-3615>.
- [36] C. Ritagliati, V. L. Alonso, R. Manarin, P. Cribb, and E. C. Serra, "Overexpression of Cytoplasmic TcSIR2RP1 and Mitochondrial TcSIR2RP3 Impacts on Trypanosoma cruzi Growth and Cell Invasion", *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 9, no. 4, pp. 1-22, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003725>.
- [37] S. Dam and A. Lohia, "Entamoeba histolytica sirtuin EhSir2a deacetylates tubulin and regulates the number of microtubular assemblies during the cell cycle", *Cellular Microbiology*, vol. 12, no. 7, pp. 1002-1014, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01449.x>.
- [38] I. Evans-Osses *et al.*, "Microvesicles released from Giardia intestinalis disturb host-pathogen response in vitro", *European Journal of Cell Biology*, vol. 96, no. 2, pp. 131-142, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2017.01.005>.
- [39] S. Y. Ma'ayeh *et al.*, "Characterization of the Giardia intestinalis secretome during interaction with human intestinal epithelial cells: The impact on host cells", vol. 11, no. 12. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006120>.
- [40] B. R. Webster, Z. Lu, M. N. Sack, and I. Scott, "The role of sirtuins in modulating redox stressors", *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 52, no. 2, pp. 281-290, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.10.484>.

**Citación de artículo:**

A. G. Suárez-Jurado, M. E. Alvarado, G. J. Díaz-González & M. H. Ramírez-Hernández, "Evaluación y caracterización de la sirtuina 2.3 de Giardia duodenalis (GdSir2.3)", *Rev. Colomb. Quim.*, vol. 51, no. 2, pp. 3-10, 2022. DOI: <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v51n2.95495>



## Use of X-Ray Photoelectron Spectroscopy as an analytical tool for the study of contamination by Teflon in the synthesis of Mo(VI)Cl<sub>2</sub>O<sub>2</sub>Bipy/TiO<sub>2</sub> catalysts

### Abstract

The preparation of catalysts can involve various sources of contamination, which can seriously affect the quality of the prepared materials. In the present work, a case of fluorine contamination in a set of catalyst samples was studied, in which using the X-Ray Photoelectron Spectroscopy (XPS) technique, it was evidenced by the F 1s signal that this element was present in the form of Teflon, since its binding energy corresponded mainly to the CF<sub>2</sub> species. Furthermore, using the C 1s signal, it was also possible to corroborate the presence of the CF<sub>2</sub> group, which is associated with the main component of the Teflon carbon chains. The use of this information made it possible to identify that the solvent dehydration procedure (previous step to obtaining the catalysts) could lead to contamination with Teflon since it involved various accessories with Teflon, organic solvents and high temperature; the Teflon tape and the magnetic stirrer being the possible sources of contamination.

**Keywords:** X-ray photoelectron spectroscopy; Teflon; Catalyst synthesis.

## Uso de la espectroscopia fotoelectrónica de rayos X como una herramienta analítica para el estudio de la contaminación por teflón en la síntesis de catalizadores Mo(VI)Cl<sub>2</sub>O<sub>2</sub>Bipy/TiO<sub>2</sub>

### Resumen

La preparación de catalizadores puede contener diversas fuentes de contaminación, las cuales pueden afectar seriamente las propiedades de los materiales preparados. En este artículo se estudió un caso de contaminación con flúor en una serie de muestras de catalizadores. Empleando la técnica de espectroscopia fotoelectrónica de rayos X (XPS) se evidenció la presencia de flúor en la superficie de los materiales, el cual estaba asociado al polímero teflón, ya que su energía de enlace correspondía principalmente con la de la especie CF<sub>2</sub>. Además, empleando la señal C 1s, se logró corroborar la presencia de la especie CF<sub>2</sub>, el cual está asociado al componente principal de las cadenas carbonadas de teflón. El uso de la información obtenida por XPS permitió determinar que durante la deshidratación del solvente (paso previo para la obtención de los catalizadores en el cual se emplean solventes orgánicos y alta temperatura) se podría estar llevando a cabo la contaminación con teflón, ya que este componente está presente en diversos accesorios empleados en el proceso de deshidratación, siendo la cinta de teflón y el agitador magnético las posibles fuentes de contaminación.

**Palabras clave:** Espectroscopia fotoelectrónica de rayos X; Teflón; Síntesis de catalizadores.

## Uso da espectroscopia fotoeletrônica de raios X como ferramenta analítica para o estudo da contaminação por teflon na síntese de catalisadores Mo(VI)Cl<sub>2</sub>O<sub>2</sub>Bipy/TiO<sub>2</sub>

### Resumo

A preparação de catalisadores pode conter diversas fontes de contaminação, as quais podem afetar seriamente as propriedades dos materiais preparados. No presente trabalho estudou-se um caso de contaminação com flúor numa série de amostras de catalisadores. Usando a técnica da espectroscopia fotoeletrônica de raios X (XPS), evidenciou-se a presença de flúor na superfície dos materiais, o qual estava associado ao polímero Teflon, já que sua energia de ligação correspondia principalmente à da espécie CF<sub>2</sub>. Além disso, usando a sinal C 1s, foi possível corroborar a presença do grupo CF<sub>2</sub>, o qual está associado ao componente principal das cadeias carbônicas do Teflon. O uso da informação obtida por XPS permitiu determinar que durante a desidratação do solvente (passo prévio para a obtenção dos catalisadores no qual são usados solventes orgânicos e alta temperatura) tem-se a contaminação com Teflon, já que este componente está presente em diversos acessórios utilizados no processo de desidratação, sendo a fita do Teflon e o agitador magnético as possíveis fontes da contaminação.

**Palavras-chave:** espectroscopia fotoeletrônica de raios X; Teflon; síntese de catalisadores.



## Introduction

X-Ray Photoelectron Spectroscopy – XPS is a powerful technique that can provide information about the chemical elements present on the surface of a sample. In this technique, the sample is irradiated with an X-ray beam with determinate energy. The photons can transfer their energy to the electrons present in the sample. If the transmitted energy is higher than the “binding energy”, the electron is ejected from the sample with energy ( $E_k$ ) equal to that expressed in Eq. (1):

$$E_k = h\nu - E_b - \phi \quad \text{Eq (1)}$$

The binding energy ( $E_b$ ) can be defined as the necessary energy to eject a given electron from the sample. The term  $\phi$  represents the lost energy for an electron in the trek from the sample to the analyser. The information obtained by means of this technique comes from approximately the first 10 nm from the surface [1-3].

The binding energy of an electron principally depends on the atomic number of the element ( $Z$ ), energy level ( $n$ ), subshell ( $l$ ), and spin-orbit coupling. The oxidation state and the chemical environment (specie formed) can cause a slight shift in the binding energy. In this sense, this technique can also provide information regarding the chemical species (oxidation states and compounds) present in the sample. Normally, the higher the oxidation states, the higher the binding energy shift (positive). Furthermore, the more electronegative character of the neighbouring bonded elements, the higher the binding energy shift (positive) [3-5].

XPS is widely used in many science fields related to materials and catalysis. This technique is a powerful tool to understand how the surface of a material is composed. In heterogeneous catalysis, the surface of the catalysis generally plays the principal role in the chemical reaction because the active sites are situated in this area, thus, it is important to know the surface chemical composition of a catalyst [6, 7]. For some catalyst materials, the surface composition can be very different from the bulk composition. This discrepancy may be due to the material nature, synthesis methods or contaminants.

In this work, a case of contamination with fluorine was studied employing XPS (and other analytic techniques). The catalysts studied were based on  $\text{TiO}_2$  supports which were treated with organic solvents as a part of the synthesis procedure. The organic solvent used was dehydrated using high temperature prior to the reaction employing mountings where Teflon tape and Teflon stirrers were part of the mountings, hence, these Teflon-based materials could become an important contamination source.

## Materials and methods

### Reagents

Benzene and  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  were purchased from Merck Millipore, Germany.  $\text{TiO}_2$  P25 was purchased from Degussa, Spain. Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) and HCl (37 wt%) were purchased from Acros. Ethanol (absolute RG for analysis),  $\text{MoO}_2\text{Cl}_2$  and NaOH were obtained from Aldrich, United States.

### Experimental

The samples Cat-1 to Cat-5 were synthesised according to the methodology set forth by Martínez et al. [8]. The synthesis procedure is not widely presented in this work due to the fact that this information does not have an

important role in the aim of this work. An important step for the synthesis of these materials is the dehydration of the organic solvent (benzene) because the water present in the solvent can cause some not desired effects.

In the dehydration step, benzene is placed together with  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  into the glass system shown in Figure 1. The temperature is maintained at  $180^\circ\text{C}$ . A magnetic Teflon stirrer is placed into the round flask. The glass connections are covered with commercial Teflon tape.

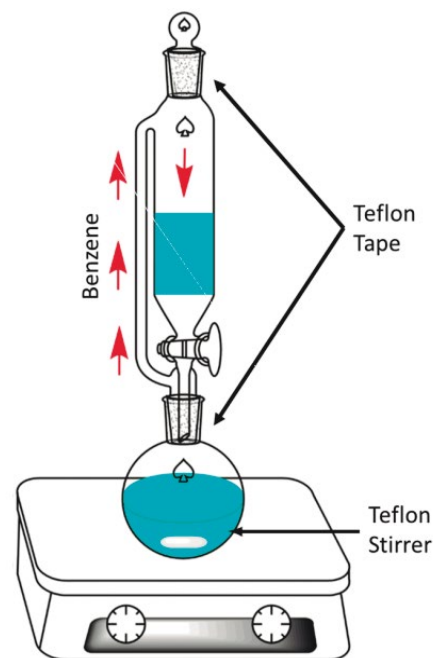


Figure 1. System employed for benzene dehydration.

### Characterisation by X-Ray Photoelectron Spectroscopy (XPS)

The contamination due to Teflon was studied by means of X-Ray Photoelectron Spectroscopy and Scanning Electron Microscopy / Energy Dispersive Spectroscopy (SEM-EDS). XPS experiments were carried out with a SPECS® XPS/ISS/UPS Surface Characterisation Platform. The samples were analysed using a monochromatic  $\text{Al K}_\alpha$  X-ray source operated at 200 W/12 kV. The pressure in the analysis chamber was set at  $10^{-10}$  mbar. The pass energy of the hemispherical analyser was set at 60 eV for the high-resolution spectra and 100 eV for the survey spectra. The samples were mounted on carbon conductive tape over the metallic sample holders. Surface charge compensation was controlled with a Flood Gun. The reference scale was calibrated by adjusting the adventitious carbon C-H to 284.8 eV. The Relative Sensitivity Factors (RSF) values employed in the quantification procedures were: C 1s (1.0), O 1s (2.77), F 1s (4.02) and Ti 2p (7.57), supplied by SPECS for the PHOIBOS analyser in magic angle geometry. Not all signals recorded were taken into account for quantification. The XPS spectra were analysed using CasaXPS software. All the signals were treated using static Shirley background and fitted using Gaussian-Lorentzian functions.

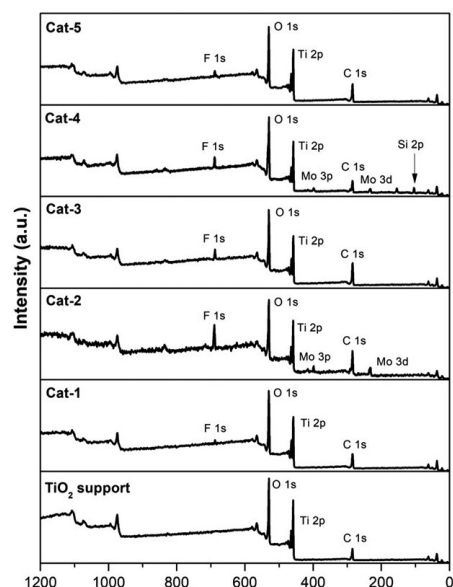
### Characterisation by Scanning Electron Microscopy / Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy (SEM - EDS)

Analysis by SEM- EDS was carried out in a ZEISS EVO50 scanning electron microscope, equipped with an energy dispersive (EDX) analyser, operated under the following analytical conditions: I probe 1 nA, EHT = 20.00 kV, beam current 100  $\mu\text{A}$ , Signal A = SE1 and WD = 8.0 mm.

## Results and discussion

A set of 5 catalysts synthesised using dehydrated benzene was analysed by XPS with the purpose of studying their chemical composition on the surface. Figure 2 shows the survey spectrums for each catalyst synthesised and for the  $\text{TiO}_2$  support before contact with dehydrated benzene. Ti 2p, O 1s, Mo 3d, Mo 3p, Si 2p, Si 2s, and C 1s signals are expected to be present in the catalysts due to the nature of the chemical composition of the materials analysed. C 1s was produced mainly by adventitious carbon.

According to Figure 2, these aforementioned signals were found in all samples analysed, however, Cat-1 to Cat-5 samples also showed a F 1s signal which was not found on the  $\text{TiO}_2$  support. Table 1 shows that F/Ti ratios for the analysed samples were about 0.11 – 1.37, showing that F concentration on the surface of the analysed materials was relatively high.



**Figure 2.** Survey XPS spectrum of  $\text{TiO}_2$  support and Cat-1 to Cat-5 samples.

According to the reagents used for the synthesis of each catalyst, none of the reagents contain a compound containing fluorine, therefore, the F 1s signal must be caused by a non-desired specie present in a contaminant. The binding energy of the main component present in the F 1s signal for every sample was about 689.5 eV. According to this binding energy value, the F 1s signal shown in each catalyst can be assigned to a  $\text{CF}_2$  specie [9, 10]. In addition to  $\text{CF}_2$  signals, CF and  $\text{CF}_3$  species were also observed in most of the analysed samples (see Figure 3). Table 1 shows the speciation for each component present in F 1s for all samples.

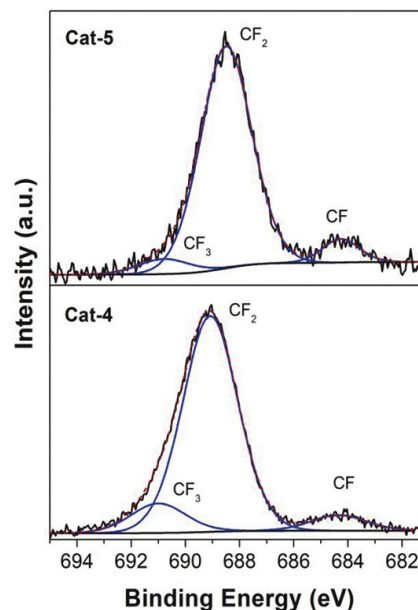
**Table 1.** Surface chemical information of Cat-1 to Cat-5 catalysts

|                               | Parameter         | Cat-1 | Cat-2 | Cat-3 | Cat-4 | Cat-5 |
|-------------------------------|-------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Atomic Ratio                  | F/Ti <sup>a</sup> | 0.11  | 1.37  | 0.35  | 0.42  | 0.20  |
|                               | F/C <sup>b</sup>  | 2.71  | 2.81  | 2.89  | 2.02  | 2.98  |
| Speciation of F 1s signal (%) | CF                | 9.3   | 0.0   | 5.8   | 5.9   | 6.7   |
|                               | $\text{CF}_2$     | 82.5  | 100.0 | 89.7  | 82.7  | 87.4  |
|                               | $\text{CF}_3$     | 8.3   | 0.0   | 4.4   | 11.3  | 6.0   |

a Atomic ratio calculated using corrected areas

b Calculated using total F 1s signal and C 1s signal associated to  $\text{CF}_x$  species. This value is an approximation.

On the other hand, the C 1s signal is almost present in all samples analysed by XPS because this signal is also caused by adventitious carbon. Adventitious carbon is usually fitted using some representative species, they are: C-C (288.8 eV), C-O (286.4 eV) and O-C=O (288.5 eV) [11, 12]. Additional species of carbon could be caused by components present in the sample or by contaminant species. As mentioned previously, the binding energy for an electron in an atom depends on the chemical environment, so, if carbon atoms are linked to fluorine atoms in a specie, then there must be a C 1s signal with a binding energy value related to the  $\text{CF}_2$  specie.



**Figure 3.** F 1s speciation for Cat-4 and Cat-5 samples.

Because of the higher value of electronegativity of fluorine atoms, the binding energy of the C 1s signal associated to the  $\text{CF}_2$  specie must be high, most likely higher than the binding energy found in C 1s of the O-C=O specie. According to Figure 4, species with binding energy associated to  $\text{CF}_2$  (~290.8 eV) species are also observed on the samples in samples Cat-2 and Cat-4, and therefore, contamination by Teflon on the surface of the synthesised samples is confirmed [9, 10, 13]. In addition, the F/C ratios found in the analysed samples were between 2.02 and 2.98. Although the expected value for the F/C ratio for Teflon is 2 [14], in this work, values for the F/C ratio were in general higher than the expected value.

The sample Cat-2 was also analysed using SEM-EDS with the purpose of detecting fluorine. As shown in Figure 5, fluorine is also detected by SEM-EDS showing that F is not only located on the surface of the materials but it is also found in the bulk in relatively high concentrations.

These results show the difficulty of producing pollutant-free materials in various synthetic procedures. Although contamination by Teflon could go unnoticed for many bulk chemical techniques, XPS and other surface techniques provide specific information about the chemical composition of the surface and these analytical tools can provide valuable information to discover hard-detection contaminants deposited on the surface of synthesised materials. Teflon could be being released to the catalyst due to the effect of high temperature as well as the organic solvent used upon the Teflon tape and the magnetic stirrer. The friction between the magnetic stirrer and the glass of the flask can produce the releasing of Teflon to the organic solvent, and subsequently, it is fixed in the catalyst. Additionally, low quality Teflon tape could be partially fragmented by the action of heat and organic solvent vapour, and successively, come to the organic solvent to be finally fixed on the catalyst.

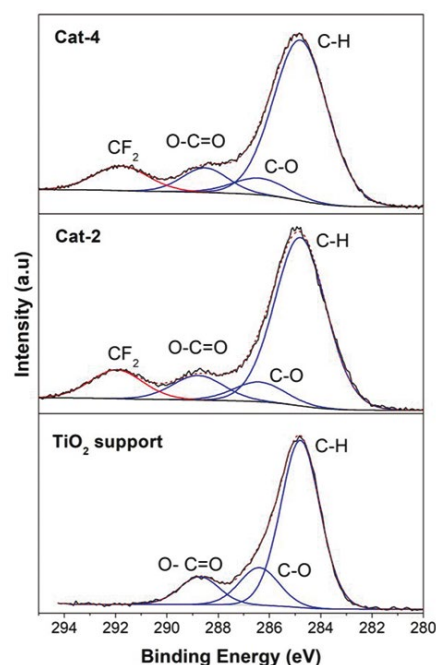


Figure 4. C 1s signal for TiO<sub>2</sub> support, Cat-2 and Cat-4 samples.

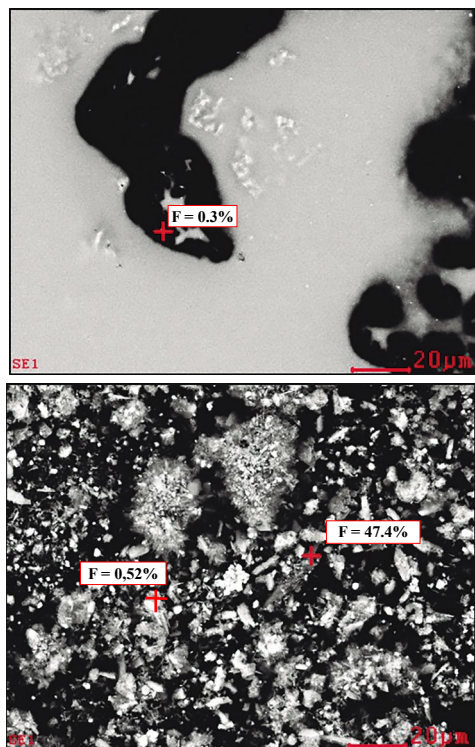


Figure 5. SEM-EDS results for the quantification of F in Cat-2 catalyst.

In this work, an investigation to determine which of the above probable sources are causing the contamination by Teflon on the catalysts was not undertaken. However, it is highly recommended that researchers who produce catalysts using similar conditions, verify that Teflon is not being released to the synthesised samples because it can be fixed on the surface of the materials and affect the catalytic properties of the desired materials.

## Conclusions

XPS can be used as a valuable tool to study the chemical composition of the surface of synthesised materials. This technique can provide useful information regarding pollutant species present on the surface of the analysed samples and speciation procedures can be usually carried out with the purpose of identifying the contamination source. Special care must be taken when steps involving Teflon and organic solvents are carried out, because Teflon can be lixiviated from the tape or stirrer, and then become fixed on the synthesised materials.

## Acknowledgments

The authors Fernando Martínez Ortega and Henry Martínez are grateful to the Universidad Industrial de Santander (internal project DIEF 2500) for their financial support, and the Parque Tecnológico Guatiguará of the UIS is also acknowledged for the SEM and XPS analyses.

## References

- [1] P. van der Heide, *X-Ray photoelectron spectroscopy*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2011. DOI: <https://doi.org/10.1002/9781118162897>.
- [2] S. Hofmann, *Auger- and X-Ray photoelectron spectroscopy in materials science*, vol. 49. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-3-642-27381-0>.
- [3] J. D. Andrade, «X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS)» *Surface and Interfacial Aspects of Biomedical Polymers*, Boston, MA: Springer US, 1985, pp. 105–195. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-1-4684-8610-0\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4684-8610-0_5).
- [4] M. C. Biesinger, B. P. Payne, L. W. M. Lau, A. Gerson, and R. St. C. Smart, «X-ray photoelectron spectroscopic chemical state quantification of mixed nickel metal, oxide and hydroxide systems» *Surface and Interface Analysis*, vol. 41, no. 4, pp. 324–332, Apr. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1002/sia.3026>.
- [5] J. F. Watts and J. Wolstenholme, *An introduction to surface analysis by XPS and AES*. Wiley, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1002/9781119417651>.
- [6] L. Nguyen, F. F. Tao, Y. Tang, J. Dou, and X.-J. Bao, «Understanding Catalyst Surfaces during Catalysis through Near Ambient Pressure X-ray Photoelectron Spectroscopy» *Chem Rev*, vol. 119, no. 12, pp. 6822–6905, Jun. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00114>.
- [7] C. Xie, Z. Niu, D. Kim, M. Li, and P. Yang, «Surface and interface control in nanoparticle catalysis» *Chemical Reviews*, vol. 120, no. 2. American Chemical Society, pp. 1184–1249, Jan. 22, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00220>.
- [8] H. Martínez *et al.*, «Photo-epoxidation of cyclohexene, cyclooctene and 1-octene with molecular oxygen catalyzed by dichloro dioxo-(4,4'-dicarboxylato-2,2'-bipyridine) molybdenum(VI) grafted on mesoporous TiO<sub>2</sub>» *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, vol. 423, pp. 248–255, Nov. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molcata.2016.07.006>.
- [9] C. Girardeaux and J.-J. Pireaux, «Analysis of Poly(tetrafluoroethylene) (PTFE) by XPS» *Surface Science Spectra*, vol. 4, no. 2, pp. 138–141, Apr. 1996. DOI: <https://doi.org/10.1116/1.1247814>.
- [10] B. H. Park, M.-H. Lee, S. B. Kim, and Y. M. Jo, «Evaluation of the surface properties of PTFE foam coating filter media using XPS and contact angle measurements» *Applied Surface Science*, vol. 257, no. 8, pp. 3709–3716, Feb. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apusc.2010.11.116>.

- [11] G. Greczynski and L. Hultman, «Undressing the myth of apparent constant binding energy of the C 1s peak from adventitious carbon in x-ray photoelectron spectroscopy» *Science Talks*, p. 100007, Feb. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sctalk.2022.100007>.
- [12] S. Xiao *et al.*, «Layer-by-Layer assembly of polyelectrolyte multilayer onto PET fabric for highly tunable dyeing with water soluble dyestuffs» *Polymers (Basel)*, vol. 9, no. 12, p. 735, Dec. 2017. DOI: <https://doi.org/10.3390/polym9120735>.
- [13] D. Popovici, G. Czeremuzkin, M. Meunier, and E. Sacher, «Laser-induced metal-organic chemical vapor deposition (MOCVD) of Cu(hfac)(TMVS) on amorphous Teflon AF1600: an XPS study of the interface» *Applied Surface Science*, vol. 126, no. 3–4, pp. 198–204, Apr. 1998. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0169-4332\(98\)00009-9](https://doi.org/10.1016/S0169-4332(98)00009-9).
- [14] J. Piwowarczyk, R. Jędrzejewski, D. Moszyński, K. Kwiatkowski, A. Niemczyk, and J. Baranowska, «XPS and FTIR studies of polytetrafluoroethylene thin films obtained by physical methods» *Polymers (Basel)*, vol. 11, no. 10, p. 1629, Oct. 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/polym11101629>.

**Article citation:**

Á. A. Amaya, H. M. Quiñonez, R. A. Gómez, Y. R. Mendoza & F. Martínez O, “Use of X-Ray Photoelectron Spectroscopy as an analytical tool for the study of contamination by Teflon in the synthesis of Mo(VI)Cl<sub>2</sub>O<sub>2</sub>Bipy/TiO<sub>2</sub> catalysts”, *Rev. Colomb. Quim.*, vol. 51, no. 2, pp. 11-15 2022. DOI: <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v51n2.101969>



## Validación de un método multiresiduo para la determinación de medicamentos veterinarios en trucha y langostino

### Resumen

Este estudio se realizó con el objetivo de desarrollar y validar un método para la determinación de 30 medicamentos veterinarios en muestras de trucha y langostino. El método utiliza extracción en fase sólida dispersiva (dSPE) con C18 y detección por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas. Se determinó linealidad, veracidad (porcentaje de recuperación), repetitividad y reproducibilidad intralaboratorio (porcentaje de desviación estándar relativa (% RSD)), límites de detección (LoD), límites de cuantificación (LoQ), selectividad e incertidumbre. La recuperación varió de 70 a 120% y la repetibilidad y la reproducibilidad fueron menores de 20% de la desviación estándar relativa. La selectividad fue adecuada, sin picos interferentes. Las relaciones iónicas cumplieron con los criterios de confirmación. Los coeficientes de determinación ( $R^2$ ) fueron mayores de 0,99, con excepción de la sulfaquinolaxina en langostino ( $R^2 = 0,97$ ). Los LoD y los LoQ variaron entre 0,6  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y 12,8  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y los valores de incertidumbre entre 6  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y 49  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Se analizaron adicionalmente 6 muestras de diferentes mercados de Lima y se detectaron trazas de algunos medicamentos incluidos en el ensayo. El método es adecuado para el análisis de residuos de medicamentos veterinarios y se recomienda su aplicación en los programas nacionales de monitoreo de la inocuidad de truchas y langostinos provenientes de acuicultura.

**Palabras clave:** multiresiduos; residuos de medicamentos veterinarios; UPLC-MS/MS; truchas; langostinos.

## Validation of a multiresidue method for the determination of veterinary drugs in rainbow trout and shrimp

### Abstract

The study was aimed at developing and validate an analysis method to determine residues of 30 veterinary drugs in rainbow trout and shrimp specimens. The method involves extraction in dispersive solid phase with C18 and the subsequent detection through liquid chromatography coupled to mass spectrometry. Validation was done through determination of linearity, trueness (% of recovery), repeatability and intralaboratory reproducibility, limits of detection (LoD), limits of quantification (LoQ) selectivity and uncertainty. Recovery ranged from 70 to 120% and repeatability and intralaboratory reproducibility were lower than 20%. Selectivity was adequate, without interference peaks. Likewise, the ionic relationships met the confirmation criteria. The linearity was adequate, with determination coefficients ( $R^2$ ) above 0.99, except for sulfaquinolaxin in shrimp specimens ( $R^2 = 0,97$ ). LoD and LoQ varied from 0,6  $\mu\text{g}/\text{kg}$  to 12,8  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Limits of uncertainty ranged from 6  $\mu\text{g}/\text{kg}$  to 49  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . The method was used to analyze 6 samples from different markets in Lima (Peru), identifying traces of some drugs included in the study. Our results show that the method is adequate for the analysis of veterinary drug residues and allow us to recommend its application in national monitoring programs, to assess the safety of rainbow trout and shrimp specimens from aquaculture.

**Key words:** Veterinary drug residues; UPLC/MS/MS; rainbow trouts; shrimps.

## Validação de um método de multiresíduos para a determinação de medicamentos veterinários em truta e camarão

### Resumo

O estudo foi realizado com o objetivo de desenvolver e validar um método para a determinação de 30 medicamentos veterinários, em amostras de truta e camarão. O método utiliza extração dispersiva em fase sólida com C18 e detecção por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. Foram determinados a linearidade, a veracidade (recuperação percentual), a repetibilidade, a reprodutibilidade intralaboratorial, os limites de detecção (LoD) e de quantificação (LoQ), a linearidade, a selectividade e a incerteza. A recuperação variou de 70 a 120%, a repetibilidade e reprodutibilidade estiveram abaixo do 20% do desvio padrão relativo. A selectividade foi adequada, sem picos de interferentes. As proporções de íons atenderam aos critérios de confirmação. Os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) foram superiores a 0,99, com exceção da sulfaoxalina em camarão ( $R^2 = 0,97$ ). LoD e LoQ variavam entre 0,6  $\mu\text{g}/\text{kg}$  e 12,8  $\mu\text{g}/\text{kg}$  e valores de incerteza entre 6  $\mu\text{g}/\text{kg}$  e 49  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Seis amostras de mercados do Lima foram adicionalmente analisadas e foram detectados vestígios de alguns medicamentos incluídos no estudo. O método é adequado para o análise de resíduos de medicamentos veterinários e sua aplicação é recomendada em programas nacionais de controlo da segurança da truta e do camarão provenientes da aquicultura.

**Palavras-chave:** multi-resíduos; resíduos de medicamentos veterinários; UPLC-MS/MS; truta; camarão.

## Introducción

La acuicultura mundial muestra un incremento anual sostenido, según los reportes de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [1]. La magnitud de extracción de productos provenientes de la pesca es oscilante, con épocas de mayor o menor biomasa marina extraída, en tanto la producción proveniente de la acuicultura es más predecible, puesto que es controlada y el proceso de cría y su rendimiento se pueden modificar a voluntad [2]. En el Perú, las exportaciones acuícolas crecieron un 25,3% en el periodo enero-octubre de 2021, hasta alcanzar 338 millones de dólares estadounidenses y 43.691 toneladas [3].

Sin embargo, los productos acuícolas pueden contener residuos o contaminantes químicos, tales como residuos de medicamentos veterinarios, resultantes del uso intencionado (administración de fármacos para contrarrestar enfermedades) o no intencionado (contaminación ambiental), lo que genera un problema de salud pública y al mismo tiempo pone en riesgo la comercialización de los productos acuícolas, sobre todo en el mercado internacional [3], [4].

Medicamentos veterinarios tales como antibióticos y antiparasitarios cumplen un rol importante en la acuicultura para el tratamiento y prevención de enfermedades transmisibles. Sin embargo, cuando su uso es indiscriminado, cuando no se cumplen los periodos de retiro y las dosis establecidas, o cuando se utilizan sustancias no autorizadas, se pueden originar residuos de estas sustancias en los tejidos comestibles, que pueden causar efectos adversos en la salud humana, desde leves reacciones alérgicas hasta resistencia bacteriana y graves efectos cancerígenos o teratogénos [5], [6]. Por ello, las agencias gubernamentales de inocuidad alimentaria y en el ámbito internacional agencias como el Codex Alimentarius han establecido las concentraciones o límites máximos de residuos (LMR) que debe contener un alimento para ser considerado inocuo para el consumo humano [7]-[10]. Los exportadores de productos acuícolas deben cumplir con los requisitos sanitarios de LMR, establecidos por las autoridades de los países de destino, para evitar posibles detenciones y rechazos de sus envíos debido a la presencia de residuos o contaminantes en cantidades superiores a las permitidas. Los LMR de los medicamentos veterinarios incluidos en el presente estudio varían desde 100 hasta 2000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ; asimismo, el cloranfenicol y los beta-agonistas se encuentran prohibidos para uso en la producción animal, según lo establecido por el Código de Regulación de los Estados Unidos [7], por la Regulación Europea [8], [9] y por el Codex Alimentarius [10].

Los laboratorios que realizan ensayos de residuos de medicamentos veterinarios juegan un rol importante en el control de la inocuidad alimentaria de productos de acuicultura en el mercado nacional e internacional. En el Perú, la entidad encargada de realizar los controles oficiales de residuos de medicamentos veterinarios en los productos acuícolas es el Organismo Nacional de Sanidad Pesquera, que realiza muestreos en centros de producción y en lotes de exportación, y envía las muestras a laboratorios extranjeros para su análisis, debido a la no disponibilidad de laboratorios nacionales que realicen estos ensayos.

La cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (UPLC-MS/MS) es la técnica de referencia recomendada por la Unión Europea [11], [12] y por la guía de validación de la administración de alimentos y medicamentos de los Estados Unidos [13] para realizar los análisis de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos, debido a su alta sensibilidad y selectividad, que permiten realizar el estudio simultáneo de diferentes grupos de fármacos y/o sus metabolitos en niveles de trazas, en el orden de partes por billón y en concentraciones menores de los LMR. La UPLC-MS/MS genera información de la estructura molecular de los analitos, a partir del monitoreo de los iones productos originados por la disociación de la molécula precursora, que se utiliza para confirmar la identidad de los analitos [11]-[13]. Esta característica de la UPLC-MS/MS ayuda a evitar o disminuir la ocurrencia de resultados falsos positivos o falsos negativos, que pueden originar problemas de detenciones o

rechazos de los envíos, así como pérdidas económicas y disputas legales en el comercio internacional de alimentos. Además, la UPLC-MS/MS permite realizar análisis multiresiduo para la detección y cuantificación simultánea de cientos de moléculas en una misma corrida, sin necesidad de una rigurosa separación cromatográfica, lo cual simplifica los procesos analíticos y facilita una rápida respuesta de los laboratorios de ensayo en el control de la inocuidad alimentaria [11].

La interferencia de matriz es una de las principales desventajas de la técnica UPLC-MS/MS, que se origina por la presencia de ciertos compuestos orgánicos de los alimentos que permanecen como impurezas en los extractos de las muestras y afectan la ionización de los analitos. Para superar esta interferencia se requiere realizar una exhaustiva limpieza de los extractos, mediante uno o más métodos de purificación, tales como la extracción en fase sólida, extracción líquido-líquido, extracción asistida por microonda o extracción acelerada por solventes. Sin embargo, los laboratorios que realizan análisis rutinarios requieren utilizar métodos sencillos con la finalidad de generar resultados rápidos para el control de la inocuidad alimentaria. La dSPE, introducida para el análisis de residuos de plaguicidas en frutos y vegetales [14], es actualmente la técnica de extracción y limpieza de muestras de mayor aceptación internacional en los laboratorios que realizan análisis para el control de la inocuidad alimentaria.

El presente estudio se realizó con el objetivo de desarrollar y validar un método de análisis sencillo, robusto y efectivo para la determinación multiresiduo de 30 medicamentos veterinarios pertenecientes a diferentes familias de fármacos (penicilinas, tetraciclinas, macrólidos, entre otros), en trucha (*Oncorhynchus mykiss*) y langostino (*Litopenaeus vannamei*). El método presentado en este artículo utiliza dSPE con C18 y un posterior análisis instrumental por UPLC-MS/MS.

## Materiales y métodos

### Estándares y reactivos

Para evaluar los medicamentos veterinarios de interés se utilizaron estándares de alta pureza (mayor de 99%). Los estándares de tetraciclina, clortetraciclina, oxitetraciclina, ácido oxolínico, flumequina, ácidonáldixico, enrofloxacin, ciprofloxacino, sulfamerazina, sulfacrolpiridazina, sulfadiazina, sulfametoxazol, sulfaquinolaxina, sulfametazina, sulfatiazol, sulfadimetoxina, sulfametoxipiridazina, sulfadoxina, espiramicina, eritromicina, trimetoprim, cimaterol, salbutamol, Terbutalina, ractopamina, zilpaterol, clenbuterol, florfenicon y cloranfenicol fueron adquiridos de Sigma Aldrich (San Luis, EE. UU.). Los estándares de amoxicilina y mapenterol fueron adquiridos de Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Alemania).

Los reactivos utilizados fueron de grado LC-MS o HPLC. Metanol y acetonitrilo fueron obtenidos de Sigma-Aldrich, ácido fórmico de Fluka, sulfato de magnesio anhidro y acetato de sodio anhidro de JT Baker (Deventer, Holland) y agua ultrapura del equipo Milipore Mili-Q system (Milford, MA, EE. UU.).

Las soluciones individuales concentradas de 2000  $\text{ng}/\mu\text{L}$  (soluciones *stock*) de cada estándar de medicamento fueron preparadas disolviendo una cantidad apropiada de cada estándar primario en acetonitrilo, metanol o agua ultrapura. Las soluciones fueron almacenadas a  $-20^\circ\text{C}$  en la oscuridad. Las soluciones de mezclas estándares de 40  $\text{ng}/\mu\text{L}$  fueron preparadas tomando una alícuota de cada una de las soluciones *stock* y disolviéndolas en acetonitrilo, con excepción de los betalactámicos, en los cuales se utilizó agua para la disolución y almacenamiento en viales plásticos, a fin de evitar problemas de absorción en vidrio de los antibióticos. Las soluciones de calibración de 10  $\text{ng}/\mu\text{L}$  y 2  $\text{ng}/\mu\text{L}$  fueron preparadas disolviendo en acetonitrilo una cantidad apropiada de las soluciones de mezclas de estándares de 40  $\text{ng}/\mu\text{L}$ .

## Preparación de las muestras

Las muestras de truchas y langostinos fueron obtenidas de empresas locales dedicadas a la acuicultura. Fueron mantenidas en almacenamiento a -20 °C y protegidas de la luz hasta su preparación para el análisis. Así mismo, fueron descongeladas y llevadas a temperatura ambiente antes de realizar los ensayos. Se procedió a la molienda de langostinos (sin cabeza y antenas) y trucha (solo músculo) utilizando el homogenizador Robot coupe Blixer 3.0. Luego se realizó la extracción de la siguiente manera: se pesaron aproximadamente 2,00 g de músculo de trucha o langostino dentro de tubos de centrifuga de polipropileno de 50 mL, luego se agregaron 10 mL de acetonitrilo/EDTA 0.1 M en agua (4/1%v/v) y se homogeneizó con un equipo vortex por 5 min, luego se procedió a centrifugar por 5 min a 4000 rpm, el sobrenadante se trasvasó a un tubo de 50 mL que contenía 300 mg de adsorbente C18; luego se adicionaron 10 mL de hexano presaturado en acetonitrilo, se agitó por 30 s y se procedió a centrifugar nuevamente por 5 min a 4000 rpm. Se eliminó la capa de hexano con una pipeta Pasteur, del sobrenadante que quedó se tomó una alícuota de 5 mL y se llevó a un tubo de centrifuga de polipropileno de 15 mL. Finalmente, se concentró el extracto a sequedad, en un equipo de evaporación de nitrógeno a 45 °C. El extracto evaporado fue reconstituido con 1 mL de fase móvil A (ácido fórmico al 0,1% en agua), se filtró a través de filtros de difluoruro de polivinilo (PDVF) de 0,2 µm y se colocó en viales de color ámbar. Finalmente, se inyectaron 2 µL en el equipo de UPLC-MS/MS.

## Análisis por UPLC-MS/MS

El análisis por cromatografía se realizó con el equipo Acquity UPLC system (Waters, Milford, MA, EE. UU.) y la separación de los analitos se realizó con la columna Acquity UPLC BEH C18 (100 mm x 2,1 mm, 1,7 µm). Para la corrida cromatográfica se utilizó como fase móvil ácido fórmico al 0,1% en agua ultrapura (Fase A) y 0,1% ácido fórmico en acetonitrilo (Fase B) con un flujo de 0,5 mL/min. El gradiente de elución inició con 0% fase móvil B por 0,1 min, que se incrementó en forma lineal hasta 100% en 7,9 min, y se mantuvo por 1,5 min antes de regresar a la condición inicial en 0,1 min, con un tiempo de preequilibración de 3,4 min. El tiempo de la corrida cromatográfica fue de 13 min, el volumen de inyección fue de 2 µL y la temperatura de la columna fue de 40 °C.

El análisis por espectrometría de masas se realizó con el equipo UPLC-MS/MS Acquity Xevo TQ-XS (Waters, Manchester, Reino Unido). El equipo fue operado utilizando la fuente de ionización por electrospray (ESI) en modo ESI positivo. Los parámetros para la fuente de ionización fueron: voltaje de capilar 3,0 kV, temperatura de la fuente 150 °C, temperatura de desolvatación 500 °C, flujo del gas de cono 150 L/h y flujo del gas de desolvatación 1000 L/h. La colisión inducida por disociación se realizó utilizando argón como gas de colisión, a una presión 4 x mbar en la celda de colisión. La adquisición y procesamiento de datos en el equipo UPLC-MS/MS se realizó con el programa MassLynx 4.2. En la Tabla 1 se muestran los principales parámetros de espectrometría de masa MS/MS por cada analito determinado.

## Validación del método

La validación del método se realizó con la finalidad de verificar el funcionamiento analítico del método desarrollado para el uso propuesto, es decir, el análisis de residuos de medicamentos veterinarios en productos acuícolas (truchas y langostinos). La validación se realizó de acuerdo al procedimiento de la Regulación Unión Europea 2002/657 [11] y Eurachem [15]. Para ello, se utilizó muestra de blancos de matriz de truchas y langostinos fortificados con cantidades apropiadas de la solución de estándares de trabajo para obtener tres niveles de concentraciones de 10, 50 y 100 µg/kg, con 10 análisis repetidos por cada nivel. Para determinar la reproducibilidad intralaboratorio, se realizaron los análisis en tres ocasiones diferentes, con tres analistas. La linealidad fue evaluada utilizando curva de calibración fortificada en blanco de matriz en 5 niveles de concentración de 10 µg/kg hasta 300 µg/kg. Los límites de detección (LoD) y de cuantificación (LoQ) fueron estimados utilizando blancos de matriz fortificados a la concentración de 10 µg/kg, con 10 análisis repetidos.

La evaluación de la selectividad del método por UPLC-MS/MS se realizó mediante adquisición por espectrometría de masa en modo de monitoreo de reacción múltiple (MRM), con dos iones productos por cada compuesto. La proporción de las señales de los iones productos (relaciones iónicas) de cada compuesto se halló dividiendo las señales del ion menos abundante entre el ion más abundante. La identificación de los compuestos por UPLC-MS/MS se realizó según los requisitos de relación iónica establecidos por Codex [13].

**Tabla 1.** Ventanas de tiempo de retención ( $t_R$ ) y condiciones MS/MS de los analitos incluidos en el estudio.

|    | Analito             | Grupo farmacológico | Ventana $t_R$ (min) | Cono (V) | Ion precursor ( $m/z$ ) | Iones productos ( $m/z$ ) |          |                  |         |
|----|---------------------|---------------------|---------------------|----------|-------------------------|---------------------------|----------|------------------|---------|
|    |                     |                     |                     |          |                         | Cuantía ( $m/z$ )         | ECb (eV) | Cualic ( $m/z$ ) | EC (eV) |
| 1  | Oxitetraciclina     | Tetraciclinas       | 1,98 – 2,78         | 40       | 461v3                   | 426,3                     | 18       | 443,3            | 12      |
| 2  | Clortetraciclina    | Tetraciclinas       | 2,59 – 3,39         | 20       | 479,4                   | 444,2                     | 20       | 462,2            | 15      |
| 3  | Tetraciclina        | Tetraciclinas       | 2,11 – 2,91         | 20       | 445,3                   | 410,3                     | 18       | 153,7            | 25      |
| 4  | Enrofloxacino       | Quinolonas          | 2,14 – 2,94         | 52       | 360,2                   | 316,2                     | 18       | 245              | 24      |
| 5  | Flumequina          | Quinolonas          | 3,79 – 4,59         | 40       | 262                     | 244                       | 18       | 201,8            | 32      |
| 6  | Ciprofloxacino      | Quinolonas          | 1,98 – 2,78         | 50       | 332,3                   | 288,1                     | 16       | 244,9            | 22      |
| 7  | Ácido nalidíxico    | Quinolonas          | 3,66 – 4,46         | 6        | 233                     | 214,9                     | 14       | 186,8            | 22      |
| 8  | Ácido oxolínico     | Quinolonas          | 3,05 – 3,85         | 24       | 262                     | 244                       | 18       | 159,7            | 34      |
| 9  | Sulfamerazina       | Sulfonamidas        | 2,04 – 2,84         | 34       | 265                     | 91,6                      | 26       | 155,7            | 16      |
| 10 | Sulfaclorpiridazina | Sulfonamidas        | 2,62 – 3,42         | 40       | 285,3                   | 155,7                     | 12       | 91,5             | 28      |
| 11 | Sulfadiazina        | Sulfonamidas        | 1,75 – 2,55         | 42       | 251                     | 155,7                     | 12       | 91,6             | 22      |
| 12 | Sulfametoxazol      | Sulfonamidas        | 2,78 – 3,58         | 10       | 254                     | 155,7                     | 14       | 91,5             | 24      |

**Tabla 1.** Ventanas de tiempo de retención ( $t_R$ ) y condiciones MS/MS de los analitos incluidos en el estudio.

|    | Analito               | Grupo farmacológico | Ventana $t_R$ (min) | Cono (V) | Ion precursor ( $m/z$ ) | Iones productos ( $m/z$ ) |          |                  |         |
|----|-----------------------|---------------------|---------------------|----------|-------------------------|---------------------------|----------|------------------|---------|
|    |                       |                     |                     |          |                         | Cuantia ( $m/z$ )         | ECb (eV) | Cualic ( $m/z$ ) | EC (eV) |
| 13 | Sulfaquinolaxina      | Sulfonamidas        | 3,23 – 4,03         | 54       | 301,1                   | 155,7                     | 14       | 91,5             | 34      |
| 14 | Sulfametazina         | Sulfonamidas        | 2,29 – 3,09         | 42       | 279,1                   | 185,8                     | 16       | 123,7            | 25      |
| 15 | Sulfatiazol           | Sulfonamidas        | 1,84 – 2,64         | 38       | 256                     | 155,7                     | 15       | 91,5             | 26      |
| 16 | Sulfadimetoxina       | Sulfonamidas        | 3,22 – 4,02         | 56       | 311,1                   | 155,7                     | 22       | 91,5             | 32      |
| 17 | Sulfametoxipiridazina | Sulfonamidas        | 2,30 – 3,10         | 46       | 281                     | 155,7                     | 15       | 91,5             | 26      |
| 18 | Sulfadoxina           | Sulfonamidas        | 2,77 – 3,57         | 44       | 311,1                   | 155,7                     | 16       | 91,5             | 26      |
| 19 | Cimaterol             | B-agonistas         | 1,33 – 2,13         | 22       | 220                     | 159,8                     | 16       | 142,7            | 23      |
| 20 | Salbutamol            | B-agonistas         | 1,27 – 2,07         | 34       | 240,1                   | 147,7                     | 18       | 165,8            | 12      |
| 21 | Terbutalina           | B-agonistas         | 1,26 – 2,06         | 16       | 226                     | 151,8                     | 14       | 106,6            | 28      |
| 22 | Ractopamina           | B-agonistas         | 2,04 – 2,84         | 35       | 302,2                   | 163,8                     | 15       | 284,2            | 12      |
| 23 | Zilpaterol            | B-agonistas         | 1,26 – 2,06         | 20       | 262,1                   | 244,1                     | 12       | 184,9            | 23      |
| 24 | Clembuterol           | B-agonistas         | 2,33 – 3,13         | 8        | 277                     | 202,8                     | 14       | 131,7            | 24      |
| 25 | Mapenterol            | B-agonistas         | 2,95 – 3,75         | 22       | 325,2                   | 236,9                     | 14       | 307,1            | 10      |
| 26 | Espiramicina          | Macrólidos          | 2,45 – 3,25         | 20       | 422,5                   | 173,9                     | 20       | 100,6            | 15      |
| 27 | Amoxicilina           | Penicilinas         | 1,26 – 2,06         | 6        | 366,3                   | 349,2                     | 6        | 113,5            | 18      |
| 28 | Florfenicol           | Fenicoles           | 2,82 – 3,62         | 25       | 358,2                   | 240,8                     | 16       | 205,8            | 26      |
| 29 | Trimetoprim           | Trimetoprim         | 1,88 – 2,68         | 40       | 291,1                   | 230                       | 22       | 122,6            | 28      |
| 30 | Cloranfenicol         | Fenicoles           | 3,01 – 3,81         | 30       | 323,2                   | 275                       | 12       | 164,8            | 22      |

<sup>a</sup>Ion producto más abundante utilizado para el análisis cuantitativo.

<sup>b</sup>Energía de colisión.

<sup>c</sup>Ion producto segundo en abundancia, utilizado para la detección cualitativa.

La estimación de la incertidumbre se realizó de acuerdo al procedimiento establecido en la Guía ISO o método GUM [16] y Eurachem [17]. La estimación de la incertidumbre combinada se calculó a partir de la Ec. (1):

$$u_c = (C) \sqrt{\left(\frac{u_{Co}}{Co}\right)^2 + \left(\frac{u_{Ve}}{V_e}\right)^2 + \left(\frac{u_F}{F}\right)^2 + \left(\frac{u_W}{W}\right)^2 + \left(\frac{u_R}{C}\right)^2} \quad \text{Ec. (1)}$$

Donde C=contenido en la muestra en  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , Co=concentración en el extracto en  $\text{ng}/\text{mL}$  obtenida por interpolación en la curva de calibración, Ve=volumen del extracto, W=peso de la muestra, F=factor de concentración y R=repetibilidad. La incertidumbre expandida se calculó multiplicando la incertidumbre combinada por  $K=2$ , considerando un nivel de confianza de 95%.

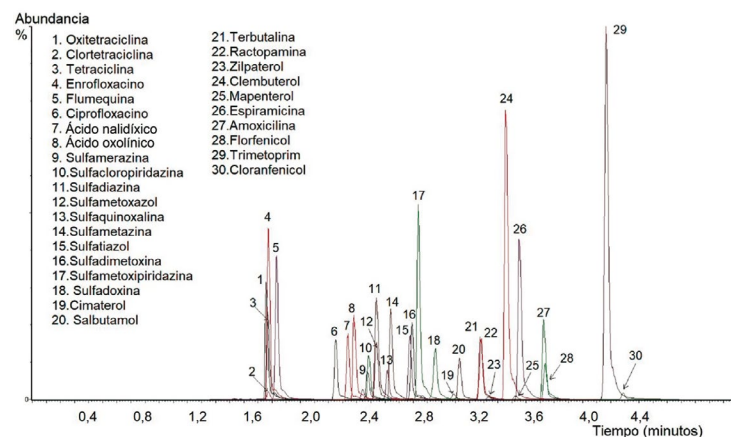
La evaluación de los parámetros de validación se realizó de acuerdo a los criterios de aceptación establecidos por el Codex Alimentarius [13], con RSD menor de 20% para la repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio y con recuperación de 70% a 120% para la veracidad. La selectividad del método se evaluó comparando los cromatogramas de los blancos de matriz *versus* los blancos de matriz fortificados, verificando que no hubiera señales interferentes en la región en donde eluyen los analitos. Asimismo, se realizó la confirmación por espectrometría de masas comparando la relación iónica de dos fragmentos MS/MS de cada molécula, verificando que las relaciones iónicas de las muestras estuvieran dentro del intervalo de aceptabilidad, en comparación con los estándares establecidos por el Codex Alimentarius [13].

## Resultados y discusión

### Análisis por UPLC-MS/MS

La optimización de los parámetros de espectrometría de masa MS/MS fue realizada mediante infusión directa en el espectrómetro de soluciones de cada uno de los estándares de medicamentos veterinarios, a la concentración de 0,5 mg/L. El electrospray fue utilizado en modo ion positivo, puesto que todos los analitos presentaban mayor señal en este modo de ionización. En la Tabla 1 se muestran las condiciones del espectrómetro de masas utilizadas en el estudio. En cuanto a la condiciones cromatográficas, fueron desarrolladas principalmente para optimizar la forma de pico, resolución e intensidad de los analitos. La fase móvil fue investigada principalmente para maximizar la sensibilidad y la resolución del método. Se probaron diferentes solventes polares, tales como metanol o acetonitrilo y agua ultrapura, todos con concentraciones de ácido fórmico al 0,05 y 0,1% (v/v). El acetonitrilo presentó mayor sensibilidad para los analitos y el ácido fórmico favoreció la ionización de los analitos. De igual manera, se configuró el tiempo de monitoreo de cada transición (*dwell time*) utilizando el programa MassLynx 4.2, con la finalidad de obtener como mínimo 15 puntos en cada pico cromatográfico.

En la Figura 1 se muestra el cromatograma de ion total (TIC) para la matriz trucha. Los tiempos de retención de los compuestos en las matrices de trucha y langostino fueron similares; variaron desde 1,66 hasta 4,19 minutos. La gradiente utilizada sirvió para la separación de los analitos en menos de 5 minutos. A pesar de que algunos compuestos coeluyen, ello no constituyó problema para su cuantificación, debido a la alta selectividad de la técnica de UPLC-MS/MS, puesto que estos compuestos son separados y detectados mediante adquisición de monitoreo de reacción múltiple por espectrometría de masas en tándem.



**Figura 1.** Cromatogramas de ion total (TIC) de 30 residuos de medicamentos veterinarios, fortificados a 100 µg/kg en blanco de matriz de trucha.

## Validación del método

Después de determinar las condiciones de extracción, de separación cromatográfica y de detección por espectrometría de masas, se validó el método de análisis, determinándose los parámetros de recuperación, repetitividad, reproducibilidad intralaboratorio, linealidad, LoD, LoQ, selectividad e incertidumbre.

## Recuperación

En las Tablas 2 y 3 se observa que los porcentajes de recuperación variaron desde 76,8 hasta 120,5%, valores que se encuentran dentro de la especificación establecida por el Codex Alimentarius, es decir, entre 70 y 120%.

## Repetibilidad y reproducibilidad intralaboratorio

En las Tablas 2 y 3 se observa que la repetibilidad y la reproducibilidad intralaboratorio, expresadas como % RSD, variaron desde 0,6% hasta 12,8%, con lo que se cumple con los criterios del Codex Alimentarius que establecen un % RSD < 20%. Cabe destacar que dichos porcentajes se encuentran en línea con otros estudios, en los cuales se validó la técnica analítica en matrices como pescados y langostinos, en los que se obtuvieron % RSD superiores a 20 % [18]-[21].

**Tabla 2.** Recuperación, repetibilidad (%RSD<sub>r</sub>) y reproducibilidad intralaboratorio (%RSD<sub>R</sub>) obtenidos en trucha fortificada a 10, 50 y 100 µg/kg.

| Analito                   | 10 µg/kg       |                               |                               | 50 µg/kg |                  |                  | 100 µg/kg |                  |                  |
|---------------------------|----------------|-------------------------------|-------------------------------|----------|------------------|------------------|-----------|------------------|------------------|
|                           | R <sup>a</sup> | RSD <sub>r</sub> <sup>b</sup> | RSD <sub>R</sub> <sup>c</sup> | R        | RSD <sub>r</sub> | RSD <sub>R</sub> | R         | RSD <sub>r</sub> | RSD <sub>R</sub> |
| 1. Oxitetraciclina        | 100            | 1,9                           | 5,4                           | 91       | 11,0             | 11,5             | 93        | 2,3              | 14,1             |
| 2. Clortetraciclina       | 104            | 7,1                           | 7,0                           | 96       | 4,9              | 4,2              | 98        | 4,0              | 5,5              |
| 3. Tetraciclina           | 98             | 4,0                           | 6,0                           | 91       | 12,8             | 12,6             | 93        | 1,8              | 13,8             |
| 4. Enrofloxacino          | 93             | 2,8                           | 8,7                           | 97       | 8,8              | 10,4             | 99        | 2,1              | 12,1             |
| 5. Flumequina             | 106            | 3,6                           | 4,1                           | 93       | 9,5              | 10,6             | 98        | 1,0              | 10,1             |
| 6. Ciprofloxacino         | 93             | 5,7                           | 5,3                           | 96       | 9,1              | 9,5              | 97        | 2,2              | 10,1             |
| 7. Ácido nalidixico       | 95             | 1,5                           | 2,2                           | 95       | 8,6              | 10,9             | 99        | 1,1              | 11,6             |
| 8. Ácido oxolínico        | 91             | 3,5                           | 3,4                           | 98       | 9,9              | 11,2             | 101       | 1,7              | 11,2             |
| 9. Sulfamerazina          | 89             | 3,9                           | 5,3                           | 101      | 7,2              | 9,2              | 107       | 3,3              | 9,3              |
| 10. Sulfacoloropiridazina | 99             | 3,1                           | 5,9                           | 95       | 5,7              | 7,4              | 100       | 2,4              | 9,5              |
| 11. Sulfadiazina          | 100            | 2,8                           | 4,8                           | 95       | 12,7             | 12,8             | 99        | 1,8              | 12,5             |
| 12. Sulfametoxazol        | 100            | 2,3                           | 3,4                           | 96       | 4,0              | 6,4              | 101       | 2,0              | 7,0              |
| 13. Sulfaquinoxalina      | 98             | 3,3                           | 5,6                           | 92       | 9,1              | 10,9             | 98        | 1,6              | 10,3             |
| 14. Sulfametazina         | 100            | 2,9                           | 3,2                           | 90       | 11,2             | 11,2             | 96        | 1,6              | 11,6             |
| 15. Sulfatiazol           | 96             | 2,8                           | 5,2                           | 92       | 9,3              | 10,4             | 98        | 1,6              | 11,0             |
| 16. Sulfadimetoxina       | 96             | 3,6                           | 6,8                           | 89       | 10,7             | 14,0             | 95        | 1,3              | 15,0             |
| 17. Sulfametoxipiridazina | 103            | 1,6                           | 3,4                           | 95       | 10,4             | 12,0             | 101       | 2,8              | 12,0             |
| 18. Sulfadoxina           | 103            | 3,0                           | 3,5                           | 95       | 5,2              | 7,2              | 99        | 1,9              | 8,5              |
| 19. Cimaterol             | 77             | 2,8                           | 3,6                           | 98       | 5,6              | 7,1              | 101       | 1,6              | 8,9              |
| 20. Salbutamol            | 84             | 1,5                           | 3,3                           | 108      | 2,7              | 3,0              | 106       | 1,0              | 4,4              |
| 21. Terbutalina           | 82             | 4,2                           | 4,5                           | 106      | 2,2              | 3,0              | 104       | 1,8              | 4,1              |
| 22. Ractopamina           | 88             | 2,8                           | 9,9                           | 109      | 2,3              | 3,7              | 109       | 1,1              | 4,1              |
| 23. Zilpaterol            | 93             | 3,1                           | 3,5                           | 101      | 4,6              | 4,4              | 100       | 1,6              | 6,1              |
| 24. Clembuterol           | 96             | 1,9                           | 2,8                           | 103      | 2,3              | 1,9              | 106       | 1,5              | 2,7              |

**Tabla 2.** Recuperación, repetibilidad (%RSDr) y reproducibilidad intralaboratorio (%RSD<sub>R</sub>) obtenidos en trucha fortificada a 10, 50 y 100 µg/kg.

|    | Analito       | 10 µg/kg       |                   |                               | 50 µg/kg |      |      | 100 µg/kg |      |      |
|----|---------------|----------------|-------------------|-------------------------------|----------|------|------|-----------|------|------|
|    |               | R <sup>a</sup> | RSDr <sup>b</sup> | RSD <sub>R</sub> <sup>c</sup> | R        | RSDr | RSDR | R         | RSDr | RSDR |
| 25 | Mapenterol    | 92             | 3,2               | 4,1                           | 99       | 2,3  | 2,8  | 103       | 1,4  | 5,0  |
| 26 | Espiramicina  | 100            | 3,3               | 3,3                           | 98       | 2,8  | 3,0  | 103       | 2,7  | 4,8  |
| 27 | Amoxicilina   | 103            | 3,5               | 4,4                           | 95       | 4,3  | 3,7  | 96        | 2,1  | 6,4  |
| 28 | Florfenicol   | 99             | 5,8               | 7,2                           | 97       | 6,2  | 6,3  | 100       | 1,9  | 8,0  |
| 29 | Trimetoprim   | 89             | 2,1               | 4,9                           | 111      | 2,5  | 2,5  | 110       | 1,4  | 3,9  |
| 30 | Cloranfenicol | 90             | 6,4               | 7,1                           | 94       | 8,4  | 8,1  | 98        | 3,4  | 11,2 |

<sup>a</sup>Recuperación de 10 análisis en 03 ocasiones (n=30) (%).

<sup>b</sup>Desviación estándar relativa de 10 análisis en condiciones de repetibilidad (n = 10) (%).

<sup>c</sup>Desviación estándar relativa de 10 análisis en 03 ocasiones (n=30) (%).

**Tabla 3.** Recuperación, repetibilidad (%RSDr) y reproducibilidad intralaboratorio (%RSD<sub>R</sub>) obtenidos en langostino fortificado a 10, 50 y 100 µg/kg.

|    | Analito               | 10 µg/kg       |                   |                   | 50 µg/kg |      |      | 100 µg/kg |      |      |
|----|-----------------------|----------------|-------------------|-------------------|----------|------|------|-----------|------|------|
|    |                       | R <sub>a</sub> | RSDr <sub>b</sub> | RSDR <sub>c</sub> | R        | RSDr | RSDR | R         | RSDr | RSDR |
| 1  | Oxitetraciclina       | 113            | 2,4               | 4,4               | 80       | 2,2  | 6,3  | 100       | 1,6  | 8,1  |
| 2  | Clortetraciclina      | 116            | 4,6               | 4,3               | 81       | 9,0  | 9,8  | 97        | 6,1  | 6,9  |
| 3  | Tetraciclina          | 115            | 2,6               | 3,2               | 82       | 3,8  | 4,6  | 99        | 1,8  | 5,4  |
| 4  | Enrofloxacino         | 113            | 2,1               | 3,4               | 82       | 2,7  | 5,1  | 97        | 2,0  | 6,2  |
| 5  | Flumequina            | 109            | 4,7               | 6,5               | 79       | 4,7  | 3,7  | 97        | 1,6  | 3,3  |
| 6  | Ciprofloxacino        | 109            | 5,1               | 7,1               | 80       | 4,1  | 5,9  | 96        | 1,9  | 6,5  |
| 7  | Ácido nalidixico      | 112            | 2,5               | 3,4               | 82       | 2,1  | 2,6  | 100       | 1,0  | 2,8  |
| 8  | Ácido oxolínico       | 113            | 1,9               | 3,0               | 84       | 1,5  | 2,5  | 103       | 1,8  | 3,6  |
| 9  | Sulfamerazina         | 92             | 2,8               | 5,2               | 99       | 2,1  | 3,5  | 111       | 1,9  | 4,5  |
| 10 | Sulfaclopiridazina    | 114            | 2,8               | 4,5               | 82       | 2,2  | 4,2  | 98        | 1,4  | 5,2  |
| 11 | Sulfadiazina          | 110            | 3,1               | 4,8               | 88       | 2,2  | 2,1  | 101       | 2,5  | 2,4  |
| 12 | Sulfametoxazol        | 117            | 3,4               | 2,4               | 83       | 2,6  | 2,6  | 99        | 1,4  | 1,9  |
| 13 | Sulfaquinoxalina      | 116            | 3,2               | 6,1               | 79       | 1,9  | 3,6  | 101       | 1,5  | 4,2  |
| 14 | Sulfametazina         | 102            | 3,4               | 4,6               | 91       | 3,4  | 3,4  | 107       | 1,2  | 3,2  |
| 15 | Sulfatiazol           | 107            | 2,2               | 2,7               | 85       | 2,0  | 4,1  | 100       | 2,0  | 2,3  |
| 16 | Sulfadimetoxina       | 113            | 0,8               | 2,9               | 81       | 1,6  | 3,9  | 99        | 1,6  | 3,9  |
| 17 | Sulfametoxipiridazina | 104            | 3,8               | 3,5               | 89       | 2,4  | 3,4  | 105       | 3,2  | 3,6  |
| 18 | Sulfadoxina           | 115            | 2,4               | 2,4               | 84       | 1,1  | 2,2  | 100       | 2,1  | 3,9  |
| 19 | Cimaterol             | 102            | 2,5               | 3,9               | 89       | 1,1  | 3,2  | 101       | 1,7  | 3,6  |
| 20 | Salbutamol            | 111            | 1,8               | 3,4               | 85       | 0,6  | 1,9  | 96        | 1,0  | 2,2  |
| 21 | Terbutalina           | 109            | 1,7               | 2,2               | 88       | 1,5  | 3,9  | 97        | 2,4  | 4,1  |
| 22 | Ractopamina           | 115            | 2,1               | 4,4               | 81       | 2,1  | 3,6  | 101       | 1,4  | 5,0  |
| 23 | Zilpaterol            | 114            | 1,4               | 4,4               | 86       | 1,9  | 4,4  | 99        | 1,2  | 4,1  |
| 24 | Clembuterol           | 114            | 1,5               | 2,2               | 83       | 2,3  | 2,7  | 101       | 1,2  | 3,4  |
| 25 | Mapenterol            | 112            | 1,4               | 3,0               | 82       | 1,7  | 3,6  | 99        | 2,3  | 4,8  |
| 26 | Espiramicina          | 112            | 1,5               | 2,8               | 89       | 2,2  | 3,5  | 90        | 1,7  | 4,5  |
| 27 | Amoxicilina           | 118            | 2,1               | 5,1               | 86       | 2,5  | 6,6  | 86        | 4,0  | 5,8  |
| 28 | Florfenicol           | 121            | 9,0               | 10,6              | 88       | 6,3  | 6,0  | 103       | 3,6  | 4,8  |
| 29 | Trimetoprim           | 107            | 2,0               | 4,0               | 87       | 2,3  | 3,5  | 104       | 2,1  | 4,1  |
| 30 | Cloranfenicol         | 114            | 5,0               | 11,1              | 83       | 4,9  | 6,9  | 99        | 3,6  | 4,9  |

<sup>a</sup>Recuperación de 10 análisis en 03 ocasiones (n=30) (%).

<sup>b</sup>Desviación estándar relativa de 10 análisis en condiciones de repetibilidad (n = 10) (%).

<sup>c</sup>Desviación estándar relativa de 10 análisis en 03 ocasiones (n=30) (%).

## Límites de detección y de cuantificación

El LoD y el LoQ hallados en trucha y langostinos variaron desde 0,6  $\mu\text{g}/\text{kg}$  hasta 12,8  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . En la Figura 2 se observa que la mayoría de los LoQ de los medicamentos incluidos fueron menores de 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , a excepción de cloranfenicol y florfenicol en langostino, que fueron de 12,7 y 12,8  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , respectivamente. Dichos valores están muy por debajo de los LMR de estos compuestos, que varían desde 50 hasta 2000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , a excepción del cloranfenicol y los compuestos beta-agonistas, medicamentos prohibidos para uso en animales para consumo humano y para los que no se han establecido sus respectivos LMR.

Los LoQ hallados para cloranfenicol fueron de 6,4 y 12,7  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para trucha y langostino, respectivamente, superiores al límite de performance mínimo requerido de 0,3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  establecido para cloranfenicol por la Regulación Europea [6], lo que se explicaría por el hecho de que, al haberse utilizado un método multiresiduo, no se puede aplicar condiciones de sintonización del espectrómetro de masas, condiciones cromatográficas y condiciones de extracción específicas con la finalidad de incrementar la sensibilidad del método para esta molécula. Por ello, lo recomendable sería realizar un método individual para el análisis del cloranfenicol, con la finalidad de obtener límites analíticos menores o iguales a lo requerido. Una situación diferente se observó para el florfenicol, para el cual se obtuvo LoQ de 7,2 y 12,8  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para trucha y langostino, respectivamente, similares al cloranfenicol, por lo que estos límites analíticos obtenidos serían adecuados para el análisis de florfenicol, debido a que están muy por debajo del LMR, que es de 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Hay que remarcar que en investigaciones previas se han reportado valores de LoD y LoQ similares o por debajo de lo hallado en el presente estudio [18]-[26].

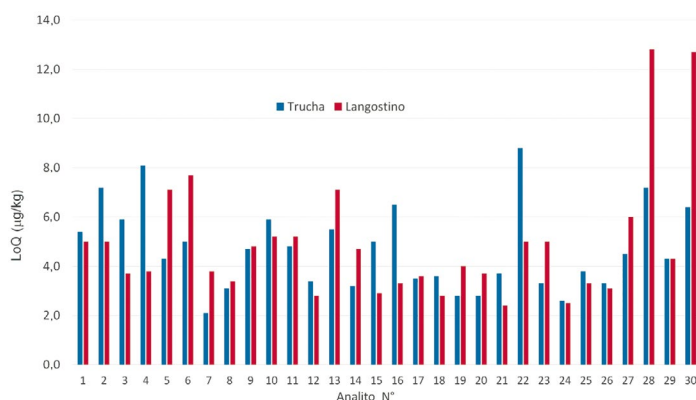


Figura 2. Límite de cuantificación (LoQ) ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) del método en trucha y langostino.

## Linealidad

Los coeficientes de determinación ( $R^2$ ) de las curvas de calibración de los medicamentos veterinarios fortificados en trucha y langostino fueron menores de 0,99; con excepción de sulfaquinoxalina en langostino, que fue de 0,97. En la Figura 3 se observan las curvas de calibración para la matriz trucha de compuestos representativos de los principales grupos de fármacos veterinarios incluidos en el estudio de validación.

## Selectividad

La selectividad del método se evidenció mediante identificación por LC-MSMS de los medicamentos veterinarios incluidos en el estudio, dado que las relaciones iónicas de los compuestos cumplieron con los rangos de aceptación del Codex [13]. En la Figura 4 se muestran los cromatogramas

MRM de los compuestos representativos fortificados en blanco de matriz trucha, en los que se observa que el monitoreo de dos iones fragmentos característicos de la estructura molecular de cada compuesto le confiere una alta selectividad a la técnica de UPLC-MS/MS. Asimismo, se identificaron las moléculas por el tiempo de retención (TR). Por otro lado, se observó efecto de arrastre en los compuestos del grupo de las quinolonas, vale decir, ácido nalidixico, ácido oxolínico, enrofloxacin y ciprofloxacina. Para superar este efecto, se requeriría investigar los métodos de lavado del inyector utilizando diferentes solventes y tiempos de lavado. Sin embargo, debe puntualizarse que el efecto de arrastre fue insignificante y no afectó a la cuantificación de dichos compuestos en las matrices de langostino y trucha.

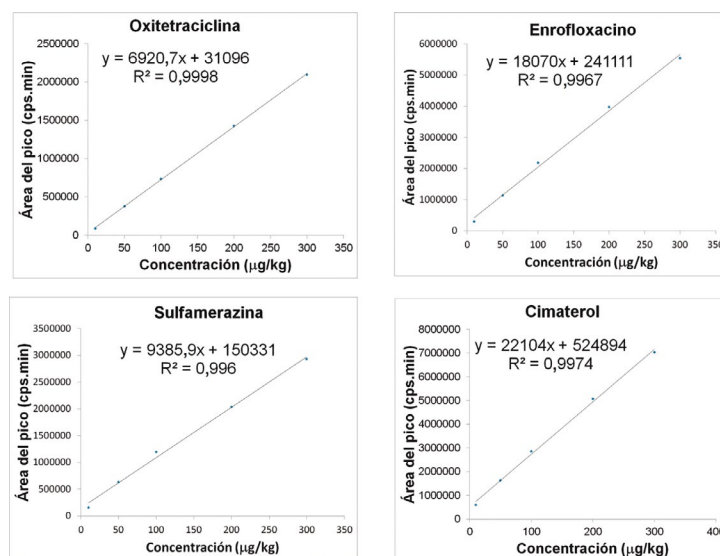


Figura 3. Curva de calibración de compuestos representativos fortificados en blanco de matriz de trucha.

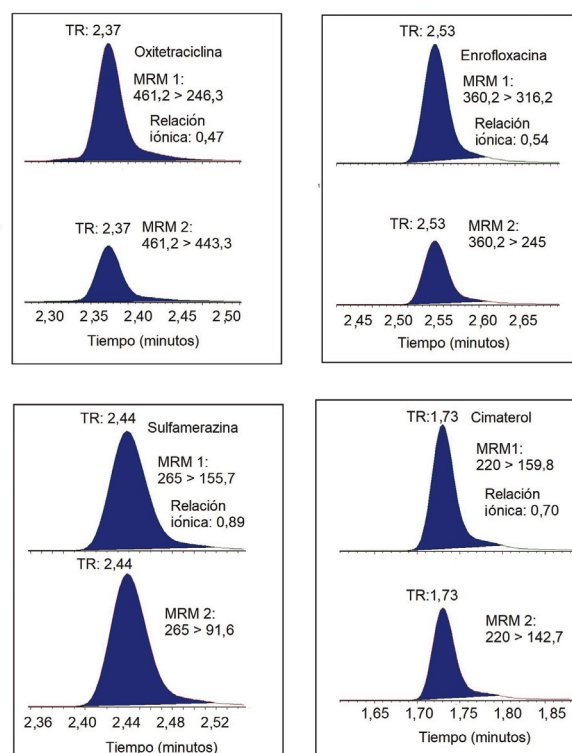
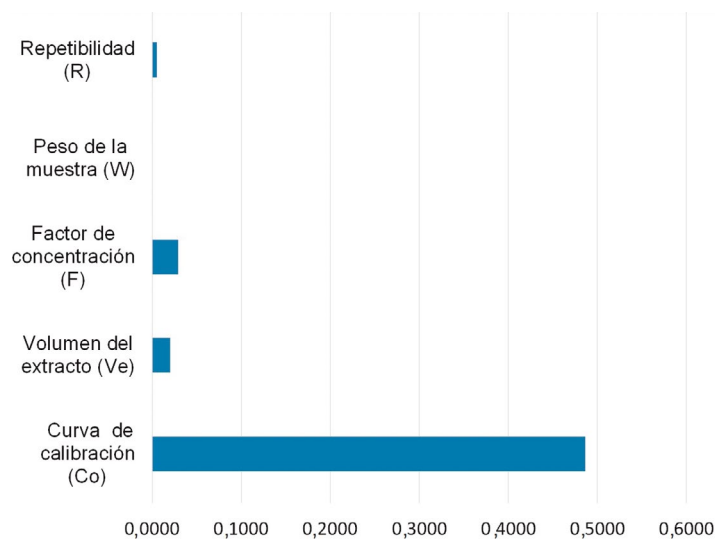


Figura 4. Cromatogramas MRM de compuestos representativos fortificado a 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  en blanco de matriz de trucha. TR: tiempo de retención; MRM: monitoreo de reacción múltiple.

## Incertidumbre

La incertidumbre expandida de los medicamentos veterinarios incluidos en el estudio de validación varió desde 8% a 59% para trucha y langostino, con excepción del compuesto sulfaquinoxalina en langostino, para el que se obtuvo un valor de 98%, debido principalmente a la alta contribución de la incertidumbre de la curva de calibración, tal como se observa en la Figura 5, lo que se originó probablemente debido a errores aleatorios o sistemáticos en la preparación de la curva de calibración.



**Figura 5.** Fuentes de incertidumbre estándar relativa de sulfaquinoxalina en langostino a 50 µg/kg.

## Análisis en muestras reales

Una vez desarrollado el método, fue aplicado para la determinación de residuos de medicamentos veterinarios en 6 muestras de trucha, las cuales fueron recolectadas en 6 supermercados diferentes del Cercado de Lima, Perú. Con el fin de asegurar la calidad de los resultados, se fortificó una muestra blanco a la concentración de 50 µg/kg antes de comenzar con la extracción. Además, el tiempo de retención, los fragmentos de cuantificación y confirmación y el ratio iónico encontrados en las muestras de mercado fueron comparados con los de los estándares de calibración, para su correcta identificación y cuantificación, tal como lo establece la Decisión de la Comisión 657/2002/CE [11]. Se reportaron trazas del medicamento oxitetraciclina en una de las 6 muestras, la cual se encontraba muy por debajo del LMR de 100 µg/kg. Dichos resultados concuerdan con otros trabajos de investigación reportados previamente utilizando la misma técnica analítica, en los que se detectaron pocos analitos en muestras de trucha [18]-[21].

## Conclusiones

El estudio cumplió con el objetivo de desarrollar y validar un método de análisis sencillo, robusto y efectivo para la determinación multirresiduo de múltiples medicamentos veterinarios pertenecientes a diferentes familias de fármacos, en trucha y langostino. El método, que utiliza dSPE con C18 y detección por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, cumplió con los criterios de validación establecidos por el Codex Alimentarius. Los resultados obtenidos nos permiten recomendar la aplicación del método en los programas nacionales de monitoreo de la inocuidad de truchas y langostinos provenientes de acuicultura.

## Agradecimientos

Los autores agradecen al Programa Nacional de Innovación en Pesca y Acuicultura (PNIPA) y a la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH) por el financiamiento y por el apoyo durante el desarrollo de la investigación. Al CITEacuicola UPCH por haber facilitado los recursos humanos, la infraestructura y los equipos de su Laboratorio de Control de Calidad y Seguridad Alimentaria para la realización del estudio.

## Referencias

- [1] Fondo de las Naciones para la Alimentación y la Agricultura, “El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. La sostenibilidad en acción”, 2020. <https://www.fao.org/3/ca9229es/ca9229es.pdf>. [Último acceso: 07 03 2022].
- [2] P. van der Sleen *et al.*, “Interannual temperature variability is a principal driver of low-frequency fluctuations in marine fish populations”, *Commun. Biol.*, vol. 5, no. 1, pp. 1-8, 2022. DOI: <https://10.1038/s42003-021-02960-y>
- [3] ComexPerú-Sociedad de Comercio Exterior del Perú, “Exportaciones acuícolas crecieron un 25,3% en el período enero-octubre de 2021”, 2022. <https://www.comexperu.org.pe/articulo/exportaciones-acuicolas-crecieron-un-253-en-el-periodo-enero-octubre-de-2021>. (Último acceso: 08 03 2022).
- [4] D. Schar, E. Klein, R. Laxminarayan, M. Gilbert, and T. Van Boeckel, “Global trends in antimicrobial use in aquaculture”, *Sci. Rep.*, vol. 10, no. 1, pp. 1-9, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78849-3>.
- [5] F. M. Treiber and H. Beranek-Knauer, “Antimicrobial residues in food from animal origin—A review of the literature focusing on products collected in stores and markets worldwide”, *Antibiotics*, vol. 10, no. 5, pp. 1-15, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics10050534>.
- [6] D. Schar, C. Zhao, Y. Wang, D. G. J. Larsson, M. Gilbert, and T. P. Van Boeckel, “Twenty-year trends in antimicrobial resistance from aquaculture and fisheries in Asia”, *Nat. Commun.*, vol. 12, no. 1, pp. 1-10, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25655-8>. PMID: 34508079.
- [7] Administrative Committee of the Federal Register, “Electronic Code of Federal Regulations. Title 21 Food and Drugs. Part 556. Tolerances For Residues Of New Animal Drugs In Food”, 2022. [https://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?SID=45a74e7727c3e71d2325986fd8064238&mc=tru e&tpl=/ecfrbrowse/Title21/21cfr556\\_main\\_02.tpl](https://www.ecfr.gov/cgi-bin/text-idx?SID=45a74e7727c3e71d2325986fd8064238&mc=tru e&tpl=/ecfrbrowse/Title21/21cfr556_main_02.tpl). [Último acceso: 15 02 2022].
- [8] H. N. Jung, D. H. Park, J. Y. Choi, S. H. Kang, H. J. Cho, J. M. Choi, J. H. Shim, A. A. Zaky, A. M. Abd El-Aty, and H. C. Shin, “Simultaneous Quantification of Chloramphenicol, Thiamphenicol, Florfenicol, and Florfenicol Amine in Animal and Aquaculture Products Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry”, *Front. Nutr.*, vol. 8, no. 812803, pp. 1-10, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.812803>.
- [9] T. J. Centner and L. Petetin, “Divergent Approaches Regulating Beta Agonists and Cloning of Animals for Food: USA and European Union”, *Society & Animals*, vol. 28, no. 5-6 pp. 613-32, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1163/15685306-12341567>.
- [10] Fondo de las Naciones para la Alimentación y la Agricultura-Organización Mundial de la Salud, “Codex Alimentarius. CX/MRL 2-2018. Límites Máximos de Residuos (LMR) y recomendaciones sobre la gestión de riesgos (RGR) para residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos”, 2018. <https://onx.la/73b7f> [Último acceso: 15 02 2022].
- [11] Official Journal of the European Union. “Commission Implementing Regulation (EU) 2021/808 on the performance of analytical methods for residues of pharmacologically active substances used in food-producing animals and on the interpretation of results as well as on the methods to be used for sampling and repealing Decisions 2002/657/EC and 98/179/EC”, 2021. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32021R0808>. [Último acceso: 08 03 2022].



- [12] FDA Foods Program Regulatory Science Steering Committee, “Guidelines for the Validation of Chemical Methods in Food, Feed, Cosmetics, and Veterinary Products”, Fda.gov, 2019. <https://www.fda.gov/media/81810/download>. [Último acceso: 08 03 2022].
- [13] Fondo de las Naciones para la Alimentación y la Agricultura-Organización Mundial de la Salud, “CAC/GL 71-2009. Adoptadas en 2009. Revisadas en 2012, 2014. Directrices para el diseño y la implementación de programas nacionales reglamentarios de aseguramiento de inocuidad alimentaria relacionados con el uso de medicamentos veterinarios en los animales destinados a la producción de alimentos”, 2014. [https://www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/livestockgov/documents/CXG\\_071s.pdf](https://www.fao.org/fileadmin/user_upload/livestockgov/documents/CXG_071s.pdf). [Último acceso: 15 02 2022].
- [14] S. Dugheri, N. Mucci, G. Cappelli, L. Trevisani, A. Bonari, E. Bucletti, D. Squillaci, and G. Arcangeli, “Advanced Solid-Phase Microextraction Techniques and Related Automation: A Review of Commercially Available Technologies”, *J. Anal. Methods Chem.*, vol. 2022, pp.1-15, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1155/2022/8690569>.
- [15] B. Magnusson and U. Örnemark, “The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics”, 2014. ISBN 978-91-87461-59-0. [www.eurachem.org](http://www.eurachem.org). [Último acceso: 15 02 2022].
- [16] International Organization for Standardization / International Electrotechnical Commission, “ISO/IEC GUIDE 98-3:2008. Uncertainty of measurement — Part 3: Guide to the expression of uncertainty in measurement (GUM:1995)”, 1995. [https://isotc.iso.org/livelink/livelink/fetch/2000/2122/4230450/8389141/ISO\\_IEC\\_Guide\\_98%2D3\\_2008%28E%29\\_%2D\\_Uncertainty\\_of\\_measurement\\_%2D%2D\\_Part\\_3%2C\\_Guide\\_to\\_the\\_expression\\_of\\_uncertainty\\_in\\_measurement\\_%28GUM%2C1995%29.pdf?nodeid=8389142&vernum=-2](https://isotc.iso.org/livelink/livelink/fetch/2000/2122/4230450/8389141/ISO_IEC_Guide_98%2D3_2008%28E%29_%2D_Uncertainty_of_measurement_%2D%2D_Part_3%2C_Guide_to_the_expression_of_uncertainty_in_measurement_%28GUM%2C1995%29.pdf?nodeid=8389142&vernum=-2). [Último acceso: 15 02 2022].
- [17] S. L. R. Ellison and A. Williams, “EURACHEM/CITAC Guide. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement”, 2012. [https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/QUAM2012\\_P1.pdf](https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/QUAM2012_P1.pdf). [Último acceso: 15 02 2022].
- [18] C. Cháfer-Pericás, Á. Maquieira, R. Puchades, B. Company, J. Miralles, and A. Moreno, “Multiresidue determination of antibiotics in feed and fish samples for food safety evaluation. Comparison of immunoassay vs LC-MS-MS”, *Aquac. Res.*, vol. 22, no. 6, pp. 993-99, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.12.008>.
- [19] A. Juan-García, G. Font, and Y. Picó, “Simultaneous determination of different classes of antibiotics in fish and livestock by CE-MS”, *Electrophoresis*, vol. 28, no. 22, pp. 4180-91, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1002/elps.200700383>.
- [20] M. E. Dasenaki and N. S. Thomaidis, “Multi-residue determination of seventeen sulfonamides and five tetracyclines in fish tissue using a multi-stage LC-ESI-MS/MS approach based on advanced mass spectrometric techniques”, *Anal. Chim. Acta*, vol. 672, no. 1-2, pp. 93-102, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.04.034>. Epub 2010 Apr 24. PMID: 20579496.
- [21] R. Pereira Lopes, R. Cazorla Reyes, R. Romero-González, J. L. Martínez Vidal, and A. Garrido Frenich, “Multiresidue determination of veterinary drugs in aquaculture fish samples by ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry”, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 895-896, pp. 39-47, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.03.011>.
- [22] B. Toussaint, M. Chedin, G. Bordin, and A. R. Rodriguez, “Determination of (fluoro)quinolone antibiotic residues in pig kidney using liquid chromatography–tandem mass spectrometry: I. Laboratory-validated method”, *J. Chromatogr. A.*, vol. 1088, no. 1-2, pp. 32-39, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.02.057>.
- [23] M. P. Hermo, D. Barron, and J. Barbosa, “Determination of multiresidue quinolones regulated by the European Union in pig liver samples. High-resolution time-of-flight mass spectrometry versus tandem mass spectrometry detection”, *J. Chromatogr. A.*, vol. 1201, no. 1, pp. 1-14, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.05.090>.
- [24] G. van Vyncht, A. Janosi, G. Bordin, B. Toussaint, G. Maghuin-Rogister, E. De Pauw, and A. R. Rodriguez, “Multiresidue determination of (fluoro)quinolone antibiotics in swine kidney using liquid chromatography– tandem mass spectrometry”, *J. Chromatogr. A.*, vol. 952, no. 1-2, pp.121-29, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(02\)00092-4](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(02)00092-4).
- [25] P. Mottier, Y. A. Hammel, E. Gremaud, and P. A. Guy, “Quantitative high-throughput analysis of 16 (fluoro)quinolones in honey using automated extraction by turbulent flow chromatography coupled to liquid chromatography– tandem mass spectrometry”, *J. Agric. Food Chem.*, vol. 56, no. 1, pp. 35-43, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf072934d>.
- [26] S. Bogialli, G. D’Ascenzo, A. Di Corcia, A. Lagana, and G. Tramontana, “Simple assay for monitoring seven quinolone antibacterials in eggs: Extraction with hot water and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry Laboratory validation in line with the European Union Commission Decision 657/2002/EC”, *J. Chromatogr. A.*, vol. 1216, no. 5, pp. 794-780, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.11.070>.

**Citación de Artículo:**

D. Chirinos -Pajuelo, O.L. Aguirre, W. León-Gonzales, N. E. Hurtado-Galindo, E. Morales-Ochante, L. Huicho & M.Rivera-Ch, “Validación de un método multiresiduo para la determinación de medicamentos veterinarios en trucha y langostino”, *Rev. Colomb. Quim.*, vol. 51, no. 2, pp. 16-24, 2022. DOI:<https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v51n2.101096>



## Comportamiento de la amoxicilina en agua mediante métodos de solvatación implícita y explícita

### Resumen

El comportamiento molecular de la amoxicilina en agua fue explorado con solvatación implícita y explícita mediante dos estrategias que combinan diferentes técnicas de simulación molecular para evaluar el alcance de estos procedimientos. Con estas dos estrategias de cálculo computacional, la conformación molecular de la amoxicilina fue determinada en fase acuosa. En la primera estrategia se utilizó el generador de conformaciones Ballon-v1.8.2 y la estabilidad de las conformaciones en agua fue evaluada utilizando la energía libre de solvatación determinada con el método de solvatación implícita SMD. En la segunda estrategia, con la dinámica molecular tipo NVT fue evaluado el arreglo espacial de esta molécula en agua y, además, la interacción molecular entre la amoxicilina y el agua fue evaluada en esta simulación. Los resultados obtenidos muestran que la conformación de la amoxicilina más estable en fase acuosa es la plegada. Además, los valores de energías de solvatación de -121,42 y -14,58 kJ/mol obtenidos con solvatación implícita y dinámica molecular sugieren que esta molécula tiene una alta afinidad por el agua. Las funciones distribución radial y espacial sugieren que se forman 3 capas de solvatación alrededor de la amoxicilina y que esta molécula tiene una región altamente hidrofílica. Finalmente, la estrategia usando dinámica molecular permite obtener mejores conformaciones en equilibrio que la estrategia de simulación usando el generador de conformaciones Ballon-v1.8.2.

**Palabras clave:** conformaciones; interacción molecular; simulación molecular; solvatación.

## Behavior of amoxicillin in water by means of implicit and explicit solvation methods

### Abstract

The molecular behavior of amoxicillin in water was explored with implicit and explicit solvation using two strategies that combine different molecular simulation techniques to assess the scope of these procedures. With these two computational calculation strategies, the molecular conformation of amoxicillin was determined in aqueous phase. In the first strategy, the conformation generator Ballon-v1.8.2 was used and the stability of the conformations in water was evaluated using the solvation free energy determined with the SMD implicit solvation method. In the second strategy, with NVT-type molecular dynamics, the spatial arrangement of this molecule in water was evaluated and, in addition, the molecular interaction between amoxicillin and water was evaluated in this simulation. The results obtained show that the most stable conformation of amoxicillin in the aqueous phase is the folded one. In addition, the solvation energy values of -121.42 and -14.58 kJ/mol obtained with implicit solvation and molecular dynamics suggest that this molecule has a high affinity for water. The radial and spatial distribution functions suggest that 3 solvation shells form around amoxicillin and that this molecule has a highly hydrophilic region. Finally, the strategy using molecular dynamics allows to obtain better equilibrium conformations than the simulation strategy using the Ballon-v1.8.2 conformation generator.

**Keywords:** Conformations; molecular interactions; molecular simulations; solvation.

## Comportamento da amoxicilina em água por meio de métodos de solvatação implícito e explícito

### Resumo

O comportamento da amoxicilina em água foi analisado com solvatação implícita e explícita mediante duas estratégias que combinam diferentes técnicas de simulação molecular para avaliar o escopo destes procedimentos. Com estas duas estratégias de cálculo computacional, a conformação molecular da amoxicilina foi determinada em fase aquosa. Na primeira estratégia, utilizou-se o gerador de conformação do software Ballon-v1.8.2 e avaliou-se a estabilidade das conformações em água a partir da energia livre de solvatação determinada pelo método de solvatação implícita SMD. Na segunda estratégia, avaliou-se o arranjo espacial da amoxicilina e sua interação com a água através de simulações de dinâmica molecular NVT. Os resultados obtidos mostram que a conformação dobrada é a mais estável em fase aquosa. Ademais, os valores de energia de solvatação de -121,42 e -14,58 kJ/mol obtidos com solvatação implícita e dinâmica molecular sugerem que esta molécula possui alta afinidade pela água. As funções de distribuição radial e espacial sugerem que se formam 3 camadas de solvatação ao redor da amoxicilina e que esta molécula possui uma região altamente hidrofílica. Finalmente, a estratégia usando dinâmica molecular permite obter melhores conformações de equilíbrio do que a estratégia de simulação usando o gerador de conformação do software Ballon-v1.8.2.

**Palabras-chave:** conformações; interação molecular; simulação molecular; solvatação.

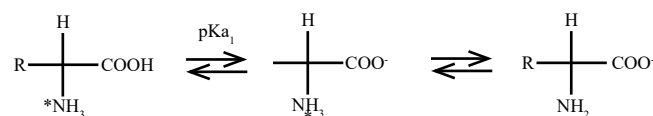


## Introducción

Los antibióticos son compuestos químicos que tienen la capacidad de tratar enfermedades producidas por bacterias. Históricamente, estos compuestos han sido sintetizados en gran magnitud desde el descubrimiento de la penicilina y su uso ha sido muy amplio en las últimas décadas [1]. El uso indiscriminado de estos fármacos en medicina humana y animal ha ocasionado un impacto negativo en el medio ambiente debido a la falta de métodos eficientes para el tratamiento de efluentes líquidos. Esto ha producido una gran preocupación por la resistencia antimicrobiana que puede producir la gran cantidad de desechos presentes en el medio ambiente [2]. De igual manera, según el informe O'Neill del 2014, el gobierno británico ha considerado que las infecciones resistentes a los antimicrobianos podrían convertirse en la principal causa de muerte en el mundo para el año 2050 [3]. Actualmente, uno de los antibióticos beta-lactámicos más utilizados a escala mundial para el tratamiento de enfermedades infecciosas producidas por bacterias es la amoxicilina, la cual representa uno de los antibióticos más prescritos en Europa y Estados Unidos [4]. En las últimas décadas, el uso de este compuesto ha generado altos niveles de concentración en el medio ambiente, especialmente en fuentes de aguas superficiales, aguas subterráneas potables y residuales [5], [6]. En este caso, los métodos experimentales para la degradación de este compuesto no han sido efectivos debido a la estructura molecular compleja que presenta con diferentes grupos funcionales similares a los aminoácidos presentes en las proteínas [7], [8]. Particularmente, debido a su estructura molecular, la amoxicilina presenta diferentes formas iónicas como función del pH cuando se encuentra disuelta en agua (ver Figura 1). Estas características estructurales favorecen la solubilidad de la amoxicilina en agua (entre 25 y 300 mg/mL a 25°C); esta especie es muy soluble en agua pura a pH~7 [9]. Esta propiedad fisicoquímica le permite una alta permanencia en fase acuosa por un largo tiempo, lo que favorece que este compuesto pueda ser absorbido y bioacumulado por plantas y animales [10], [11].

Diferentes técnicas experimentales han sido empleadas con la finalidad de reducir la concentración de amoxicilina en agua [12], [13]. Por ejemplo, las técnicas de encapsulamiento y precipitación con surfactantes y polímeros permiten la reducción de la concentración de este tipo de compuestos farmacéuticos betalactámicos en agua [14]. Así mismo, el proceso foto-Fenton ha sido empleado para la degradación de la amoxicilina en solución acuosa en moléculas más simples [15], [16]. En este proceso, a nivel molecular, la conformación espacial de la amoxicilina y su interacción con el agua tienen un papel fundamental en el camino de la reacción involucrada en la degradación de esta especie en el campo experimental. Así, desde el punto de vista molecular, las técnicas de simulación molecular, como los cálculos mecánico-cuánticos y la dinámica molecular, permiten dilucidar el arreglo espacial, la conformación y las interacciones moleculares de los compuestos químicos en diferentes medios solventes [17]-[20]. Estas técnicas de simulación molecular han permitido evaluar el comportamiento de las moléculas a nivel microscópico, lo cual permite obtener una visión más amplia de los sistemas químicos [21]-[23].

En este sentido, en este trabajo se llevó a cabo un análisis conformacional de la amoxicilina en agua mediante dos procedimientos combinando diferentes técnicas de simulación molecular: a) con solvatación implícita mediante cálculos mecánico-cuánticos y b) con solvatación explícita usando dinámica molecular. Además, se evaluó el alcance de ambos procedimientos para la obtención de la conformación espacial más estable tomando en cuenta el efecto que tiene el solvente sobre la estimación de las conformaciones espaciales [24], [25]. Finalmente, se exploró el comportamiento molecular de la amoxicilina en fase acuosa mediante dinámica molecular, con la finalidad de comprender la importancia de las interacciones moleculares en la estabilidad de esta especie en este medio solvente. Los resultados obtenidos pueden contribuir a una mejor comprensión de la cinética química de degradación de la amoxicilina, en medio acuoso, por procesos químicos y fotoquímicos.

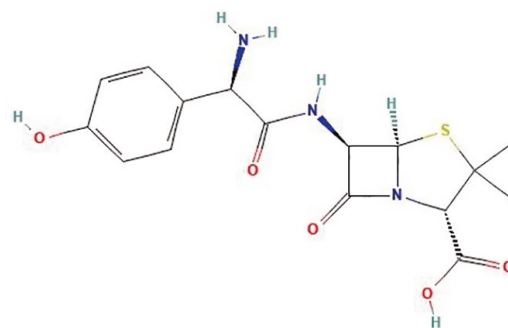


**Figura 1.** Estructuras iónicas de amoxicilina involucradas en los diferentes equilibrios de disociación.

## Metodología empleada

La estructura molecular de la amoxicilina presenta diferentes grupos funcionales similares a los contenidos en los aminoácidos (ver Figura 2), lo cual le permite tener valores de pKa iguales a 3,2 y 11,7 [26], [27] asociados al grupo ácido y la amina primaria presentes en su estructura (ver Figura 1).

Para llevar a cabo el análisis conformacional de la amoxicilina en agua se utilizaron dos estrategias de simulación molecular. En este caso, las estrategias involucran el uso de los métodos de solvatación implícita y explícita. El método mecánico-cuántico conductor polarizable continuo (C-PCM por sus siglas en inglés) [28]-[30] fue utilizado para la solvatación implícita y el método de solvatación explícita fue desarrollado con simulaciones de dinámica molecular con moléculas de agua rodeando a la amoxicilina.



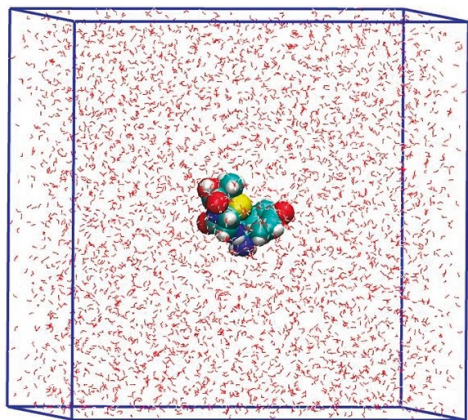
**Figura 2.** Estructura molecular de la amoxicilina.

Inicialmente, la molécula de amoxicilina fue construida en la herramienta Draw Structure de la página web PubChem [31]. Esta estructura fue optimizada con el software Avogadro (versión 1.2.0) y almacenada en el formato \*.mol [32]. Cabe destacar que la estructura molecular puede ser diseñada directamente en el software Avogadro u otros softwares que sirvan de interfaz gráfica. Además, la construcción de la estructura de la amoxicilina fue realizada de tal manera que no se refleja el puente de hidrógeno intramolecular en el grupo carboxílico, con la intención de evaluar la influencia de la conformación inicial de la estructura molecular en el análisis conformacional. En este primer procedimiento, la estructura molecular optimizada fue usada en el programa Ballon-v1.8.2 [33] para producir las diferentes configuraciones estructurales denominadas conformaciones. Este programa utiliza el modelo de energía potencial MMFF94 [34] para obtener configuraciones optimizadas con diferentes arreglos espaciales a partir de una conformación inicial. Sin embargo, este programa no fue capaz de determinar el puente de hidrógeno intramolecular a partir de la conformación inicial utilizada. Un total de 57 conformaciones espaciales para la amoxicilina fueron obtenidas utilizando los parámetros por defecto asignados al programa (--nconfs 100, --nGenerations 300). Estas conformaciones fueron visualizadas mediante el software wxMacMolPlt [35] donde se procedió a preparar las entradas (*inputs*) con extensión "\*.inp" para realizar la optimización geométrica de estas estructuras usando el software Gamess-US (versión 2021-R2) [36]-[38]. Estas conformaciones espaciales fueron optimizadas en el vacío para evaluar la estabilidad de

estos arreglos moleculares en este medio. En este procedimiento, todas las configuraciones espaciales fueron optimizadas en el vacío con el funcional híbrido DFT/M06-2X [39] en el nivel 6-31G+(d,p) [40]. Luego, a todas las conformaciones optimizadas se les realizaron cálculos tipo *single point* de solvatación implícita utilizando el método de solvatación C-PCM con el mismo funcional DFT/M06-2X [39] a un nivel 6-31G+(d,p) [40] para determinar su energía de solvatación en agua. El método de solvatación determina la energía necesaria para transferir la molécula desde el vacío hacia el medio solvente, en donde se incluye la energía necesaria para construir la cavidad dentro del solvente en la cual va a ser insertada la molécula del soluto. Las contribuciones dispersivas a la energía de solvatación fueron obtenidas con el método de solvatación universal (SMD por sus siglas en inglés) [41]. Como resultado del proceso de simulación se obtienen los archivos de salida *output* con extensión “.log” de donde se obtiene la información de la energía libre de solvatación para el análisis conformacional. La energía de solvatación,  $\Delta G_{\text{solv}}$ , es definida por la Ec. (1):

$$\Delta G_{\text{solv}} = \Delta G_{\text{elec}} + \Delta G_{\text{cfs}} \quad (1)$$

En donde el término  $\Delta G_{\text{elec}}$  corresponde a la contribución electrostática a la energía de solvatación y el término  $\Delta G_{\text{cfs}}$  corresponde a la contribución energética asociada a la construcción de la cavidad dentro del solvente y las interacciones dispersivas entre el soluto y el solvente. Una vez realizado el análisis de las energías en todas las conformaciones, se tomaron las cinco estructuras moleculares con las energías libres de solvatación más favorables y estas estructuras fueron optimizadas con el método de solvatación C-PCM [28]-[30] con el mismo funcional DFT/M06-2X [39] a un nivel 6-31G+(d,p) [40]. Además, se tomaron cinco conformaciones estructurales con el puente de hidrógeno intramolecular en el grupo -COOH más estables en agua para realizar una comparación entre las energías de solvatación obtenidas. En la segunda estrategia, usando solvatación explícita, la molécula de amoxicilina fue colocada en el centro de una caja cúbica de dimensiones 5x5x5 nm<sup>3</sup>. En esta misma caja, la amoxicilina fue solvatada con un total de 4150 moléculas de agua. La configuración inicial de la amoxicilina en agua es mostrada en la Figura 3.



**Figura 3.** Estructura molecular de la amoxicilina con moléculas de agua en una caja cúbica bajo condiciones de contornos periódicos.

Inicialmente, una simulación de minimización de energía fue realizada para relajar las configuraciones de las moléculas dentro de la caja con el procedimiento steep descent [42]. Seguidamente, al sistema relajado se le realizó una simulación de dinámica molecular tipo NVT a una temperatura de 298,15 K. En este ensamble tipo NVT, el número de partículas, el volumen de la caja de simulación y la temperatura son mantenidos constantes y se observa la variación de la energía total del sistema. La temperatura fue controlada con el método v-rescale [43]. El radio de interacción utilizado para determinar las interacciones de vdw fue de 1,25 nm y el

método de Ewald [44] fue empleado para determinar las contribuciones electrostáticas. Las condiciones de contornos periódicas fueron mantenidas en las dimensiones xyz. La longitud de las simulaciones fue de 20 ns y las configuraciones fueron almacenadas cada 1 ps, generando un total de 20.000 conformaciones. En esta parte, los force fields OPLS-AA [45] obtenido en el servidor LigParGen [46] y TIP4P [47], [48] fueron utilizados para describir las moléculas de amoxicilina y agua, respectivamente. La construcción y la simulación del sistema fueron realizadas con el programa Gromacs (versión 2019.2) [49], [50]. El análisis conformacional fue realizado evaluando la raíz cuadrada de la desviación cuadrática media de las posiciones de los átomos, RMSD, en el espacio ocupado definido por la Ec. (2):

$$\text{RMSD} = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{n=1}^N (r_n^i - r_n^{\text{ref}})^2} \quad (2)$$

En esta ecuación (2),  $r_n^i$  es la posición del átomo  $n$  en la conformación  $i$  y el término  $r_n^{\text{ref}}$  corresponde a la posición del átomo  $n$  en la conformación inicial de referencia.

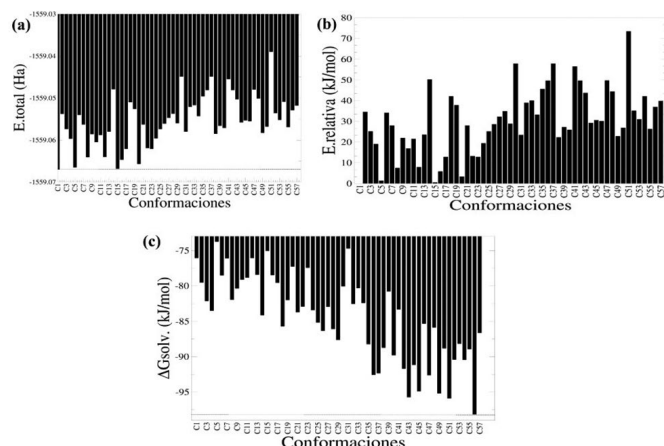
## Resultados y discusión

### Exploración de las conformaciones de la amoxicilina usando cálculos mecánico-cuánticos

En esta parte se obtuvieron diferentes conformaciones espaciales para la amoxicilina sin presencia del puente de hidrógeno intramolecular en el grupo -COOH en el vacío utilizando el programa de generación de conformaciones balloon-v-1.8.2 [33]. La estabilidad fue evaluada en función de la energía total de estas conformaciones estructurales y la energía libre de solvatación estimada usando un cálculo tipo single point (ver Figura 4(a)). En la Figura 4(a) se puede apreciar que la conformación identificada como C1 corresponde a la conformación inicial utilizada. La energía total obtenida muestra que esta conformación C1 es la más estable en el vacío en comparación con el resto de conformaciones evaluadas. También, utilizando la conformación C1 como la configuración de referencia más estable en el vacío, se observa que otras conformaciones identificadas como C5, C15 y C20 tienen una considerable estabilidad en el vacío equivalente a la conformación C1. Seguidamente, para comparar de forma eficiente la estabilidad de las conformaciones espaciales se determinó la energía relativa de cada conformación en el vacío utilizando la conformación C1 como la más estable (ver Figura 4(b)). La Figura 4(b) muestra que el resto de las conformaciones son menos estables en comparación con la configuración C1, lo cual indica que todas las conformaciones obtenidas según el procedimiento de balloon-v-1.8.2 [33] tienen una menor estabilidad energética en el vacío según los cálculos mecánico-cuánticos. Para este caso, las conformaciones C5, C15 y C20 tienen valores de energías relativas de 1,38; 0,58 y 3,33 kJ/mol en comparación a la conformación C1. Estas conformaciones estructurales son las más estables en el vacío en conjunto con la conformación C1 usada para generar las conformaciones estructurales en este programa.

Adicionalmente, las energías libres de solvatación de las 57 configuraciones fueron calculadas y sus valores son mostrados en la Figura 4(c), en la cual se observa que la conformación más estable en el medio solvente corresponde a la configuración C56 ( $\Delta G_{\text{solv}}$  igual a -98,16 kJ/mol). Para este caso, esta conformación estructural tiene la energía libre de solvatación más favorable, lo cual indica que este arreglo espacial cuenta con una interacción favorable con el agua que ha sido descrita de forma implícita. A su vez, otras conformaciones espaciales identificadas como C43 ( $\Delta G_{\text{solv}}$  igual a -95,90 kJ/mol) y C51 ( $\Delta G_{\text{solv}}$  igual a -95,73 kJ/mol) tienen energías libres de solvatación más favorables para este medio solvente. También, se puede observar que las conformaciones espaciales C56, C43 y C51 para

la amoxicilina son más favorables en el agua que en el vacío. Un hecho notable que muestran los resultados es que la conformación inicial C1 es una de las conformaciones que tienen una energía de solvatación menos favorable con respecto a las estructuras evaluadas, lo cual indica que se debe ser bien selectivo en la estructura de partida para realizar el análisis conformacional. En la Figura 5 se muestran los arreglos espaciales de las conformaciones más estables en el vacío y el medio acuoso.



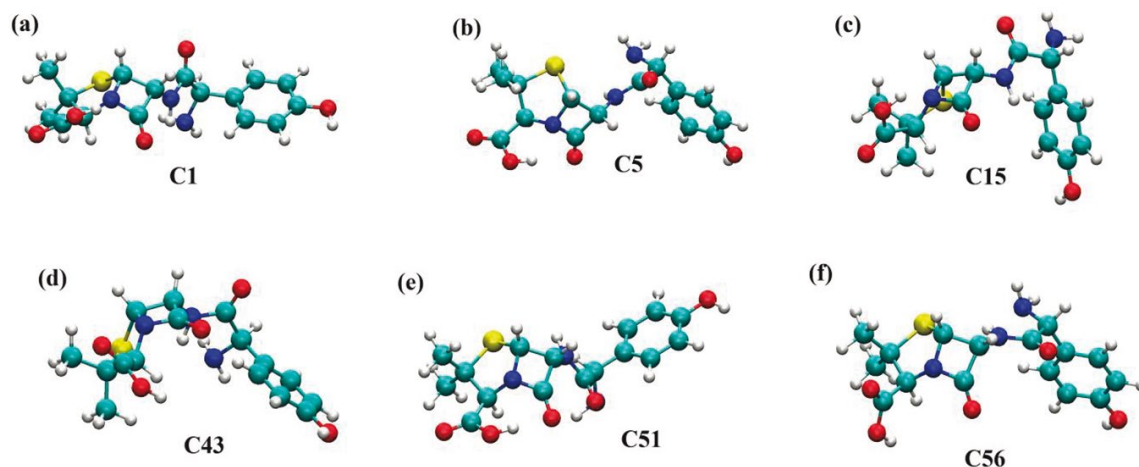
**Figura 4.** Energías para las conformaciones estructurales construidas sin el puente de hidrógeno en el grupo carboxílico. (a) Energías totales de cada conformación. (b) Energías relativas calculadas usando como referencia la molécula más estable (conformación C1). (c) Energía libre de solvatación para cada conformación, calculada con el método de solvatación SMD usando como solvente el agua.

En la Figura 5(a) se observa que la conformación C1 para la molécula de amoxicilina está completamente extendida en el vacío con el grupo -NH<sub>2</sub> interactuando con el grupo -NH localizado cerca del anillo beta-lactámico. En la Figura 5(b), en el vacío, la molécula de amoxicilina muestra una conformación espacial ligeramente extendida. En esta conformación se observa la interacción tipo puente de hidrógeno entre el protón del ácido carboxílico con el grupo carbonilo más cercano. En cambio, en la Figura 5(c) se observa una molécula con un arreglo espacial plegado en donde el anillo aromático interactúa con el grupo carbonilo más cercano y el átomo de hidrógeno del grupo carboxílico con el nitrógeno presente en el anillo beta-lactámico. Para las conformaciones en el medio acuoso, se observa en

la Figura 5(d) que la conformación C43 tiene una conformación espacial semiplegada en donde el átomo de hidrógeno del grupo -COOH interactúa con el anillo aromático y el grupo -NH<sub>2</sub> de la molécula. En la conformación C51 (ver Figura 5(e)), la amoxicilina se muestra ligeramente contraída con el átomo de hidrógeno del grupo -COOH en interacción con el grupo cetónico localizado en el anillo beta-lactámico. En la Figura 5(f), la amoxicilina con la conformación C56 se encuentra semiplegada con el átomo de hidrógeno del grupo -NH en interacción con el grupo -NH<sub>2</sub> formando un puente de hidrógeno intramolecular. En esta conformación, que corresponde a la más estable en agua, los grupos funcionales están expuestos completamente hacia el agua como solvente implícito. Finalmente, estos resultados demuestran que es fundamental hacer la exploración de las conformaciones estructurales en un medio solvente para identificar la conformación más estable de esta molécula. En este caso, el programa balloon-v-1.8.2 [33] permite obtener diferentes conformaciones espaciales en el vacío, pero luego se debe identificar, usando un proceso de solvatación, la conformación más estable, lo cual requiere de mayor poder computacional.

### Evaluación de las energías libres de solvatación para las conformaciones más estables de la amoxicilina sin puente de hidrógeno y con puente de hidrógeno

En esta parte, las estructuras con las energías libres de solvatación más favorables fueron utilizadas para evaluar a mayor profundidad el efecto del puente de hidrógeno intramolecular del grupo -COOH en la estabilidad de estas conformaciones en el medio acuoso. Las conformaciones de la amoxicilina C56, C51, C43, C49 y C45 fueron utilizadas como estructuras sin puente de hidrógeno en el grupo -COOH. A su vez, las conformaciones C5, C47, C29, C34 y C56 fueron usadas como estructuras con puente de hidrógeno en el grupo -COOH. Estas estructuras fueron seleccionadas por mostrar los grupos funcionales polares expuestos al medio solvente. Cada una de estas conformaciones fue optimizada en el medio solvente usando el método de solvatación C-PCM junto con el método SMD. Las contribuciones a la energía libre de solvatación fueron determinadas y sus valores son reportados en las Tablas 1 y 2 para las conformaciones estudiadas. En la Tabla 1, los valores de energía libre de solvatación muestran que la conformación C56 es la más favorable en fase acuosa. En este caso, la conformación espacial C56 pasó de una configuración semiplegada a un arreglo plegado



**Figura 5.** Conformaciones estructurales de la amoxicilina más estables obtenidas de los cálculos mecánico-cuánticos en el vacío y el agua descrita como solvente implícito. (a), (b) y (c) corresponden a las conformaciones C1, C5 y C15 más estables en el vacío. (d), (e) y (f) corresponden a las conformaciones C43, C51 y C56 más estables en el agua.

en el proceso de optimización geométrica. También, esta conformación tiene la contribución electrostática más alta a la energía de solvatación, lo cual sugiere que los grupos polares de la molécula de amoxicilina están más expuestos a la interacción con el agua en esta conformación. Para la contribución electrostática se muestra el siguiente orden decreciente de contribución a la energía de solvatación: C56 > C49 > C51 > C43 > C45. A su vez, se observa que la conformación C49 tiene la contribución cavidad-dispersiva-repulsiva más alta en comparación con el resto de las estructuras conformacionales evaluadas. En este caso, la conformación C49 requiere de una mayor energía para construir la cavidad del solvente y genera la mayor repulsión con el agua. En este caso, la energía libre  $\Delta G_{\text{cds}}$  tiene el siguiente orden decreciente: C49 > C56 > C45 > C43 > C51, el cual es muy distinto al mostrado en la contribución electrostática. Aquí se puede apreciar que las energías libres de solvatación son dependientes del arreglo molecular de la especie evaluada en el medio solvente y de la exposición de los grupos polares en el momento de hacer la optimización geométrica.

En la Tabla 2 se muestra que las contribuciones a la energía libre de solvatación para las conformaciones formando el puente de hidrógeno intramolecular en el grupo -COOH son de mayor magnitud en comparación a las reportadas sin puente de hidrógeno en la Tabla 1. La ganancia de estabilidad con respecto a la energía libre de solvatación es considerable en comparación con las conformaciones sin el puente de hidrógeno intramolecular en la amoxicilina. Para este caso, las conformaciones con el puente de hidrógeno intramolecular presentan energías libres de solvatación entre -110 y -130 kJ/mol. La conformación C34 tiene la energía libre de solvatación más favorable en comparación con el resto de conformaciones. Además, se observa que la contribución cavidad-dispersiva-repulsiva ( $\Delta G_{\text{cds}}$ ) asociada a la energía libre de solvatación varía ligeramente en comparación con la contribución electrostática ( $\Delta G_{\text{elec}}$ ). En este caso, se observa que la contribución electrostática sigue este orden decreciente de afinidad con el agua: C34 > C29 > C56 > C5 > C47. En cambio, la contribución  $\Delta G_{\text{cds}}$ , que indica la cantidad de energía necesaria para construir la cavidad en el solvente, muestra la siguiente tendencia en las conformaciones estudiadas: C5 > C56 > C34 > C29 > C47.

**Tabla 1.** Energías libres de solvatación ( $\Delta G_{\text{solv}}$ ) de las conformaciones más estables en agua de la amoxicilina sin puente hidrógeno intramolecular en el grupo -COOH. Se muestra la contribución electrostática ( $\Delta G_{\text{elec}}$ ) a la energía libre de solvatación, la contribución asociada a la energía libre necesaria para construir la cavidad y la interacción dispersiva-repulsiva en el medio solvente ( $\Delta G_{\text{cds}}$ ).

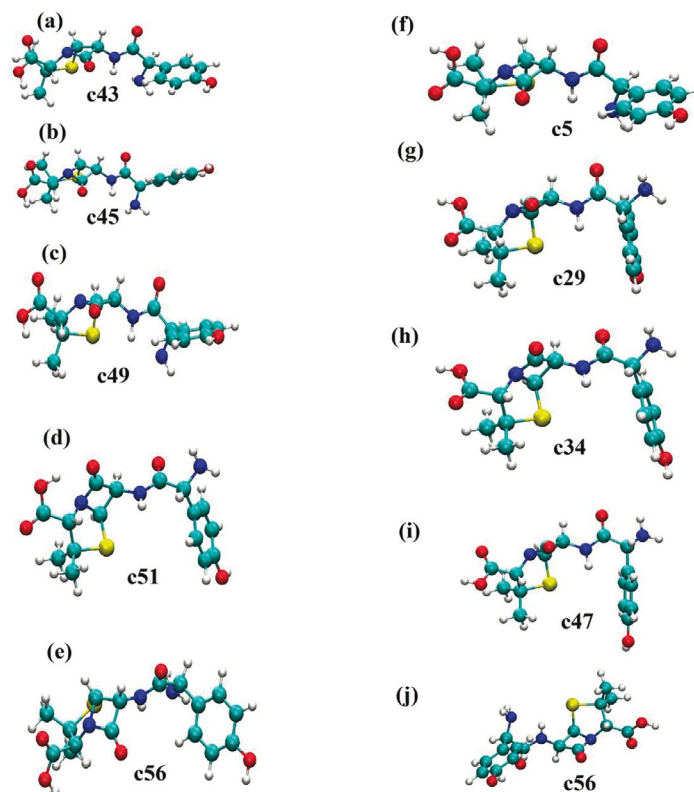
| Conformación espacial | $\Delta G_{\text{elec}}$ (kJ/mol) | $\Delta G_{\text{cds}}$ (kJ/mol) | $\Delta G_{\text{solv}}$ (kJ/mol) |
|-----------------------|-----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| C56                   | -158,87                           | 32,26                            | -98,16                            |
| C51                   | -152,97                           | 28,33                            | -95,89                            |
| C43                   | -151,46                           | 29,46                            | -95,73                            |
| C49                   | -155,02                           | 34,02                            | -95,19                            |
| C45                   | -150,04                           | 30,54                            | -94,89                            |

**Tabla 2.** Energías libres de solvatación ( $\Delta G_{\text{solv}}$ ) de las conformaciones de la amoxicilina con puente hidrógeno intramolecular en el grupo -COOH. Se muestra la contribución electrostática ( $\Delta G_{\text{elec}}$ ) a la energía libre de solvatación, la contribución asociada a la energía libre necesaria para construir la cavidad y la interacción dispersiva-repulsiva en el medio solvente ( $\Delta G_{\text{cds}}$ ).

| Conformación espacial | $\Delta G_{\text{elec}}$ (kJ/mol) | $\Delta G_{\text{cds}}$ (kJ/mol) | $\Delta G_{\text{solv}}$ (kJ/mol) |
|-----------------------|-----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| C5                    | -148,28                           | 34,98                            | -113,30                           |
| C47                   | -142,76                           | 31,21                            | -111,55                           |
| C29                   | -152,55                           | 32,76                            | -119,79                           |
| C34                   | -154,89                           | 33,47                            | -121,42                           |
| C56                   | -151,54                           | 34,39                            | -117,15                           |

Estos resultados muestran que el arreglo intramolecular tiene una gran influencia en la estabilidad que presenta la molécula en el medio solvente en estudio. En este caso, se observa que las conformaciones espaciales con el puente de hidrógeno intramolecular en el grupo -COOH tienen la más alta estabilidad en agua. En la Figura 6 se muestran las conformaciones espaciales que fueron evaluadas en esta parte. En este caso, la Figura 6(e) corresponde a la conformación C56 que es la más estable en agua sin puente de hidrógeno en el grupo -COOH. En esta conformación la amoxicilina tiene un arreglo espacial semi extendido. Sin embargo, se presentan diferentes interacciones intramoleculares que le confieren estabilidad en el medio solvente. Aquí se observan las interacciones: (a) entre el oxígeno del grupo -COOH con el grupo metil vecino, (b) entre el átomo de hidrógeno entre el grupo -NH y el grupo -NH<sub>2</sub> y (c) entre el grupo cetónico del anillo beta-lactámico con el hidrógeno del anillo aromático de la molécula. Adicionalmente, esta conformación C56 fue utilizada como configuración inicial con el puente de hidrógeno en el grupo -COOH y optimizada en el medio solvente. En la optimización con puente de hidrógeno intramolecular la ganancia en estabilidad energética fue de -18,99 kJ/mol. En las conformaciones con puente de hidrógeno se observa que la conformación C34 tiene la mayor energía de solvatación. En esta conformación, la amoxicilina está completamente plegada con los grupos -COOH, -NH<sub>2</sub>, -C=O y el anillo beta-lactámico expuestos para interactuar con el agua descrito de manera implícita (ver Figura 6(h)). Adicionalmente, con este arreglo conformacional se observa una interacción intramolecular entre el anillo aromático y el azufre presente en el anillo de cinco miembros.

Finalmente, se puede decir que la conformación más estable en agua va a depender de la presencia o no del enlace de hidrógeno intramolecular en la molécula de amoxicilina.

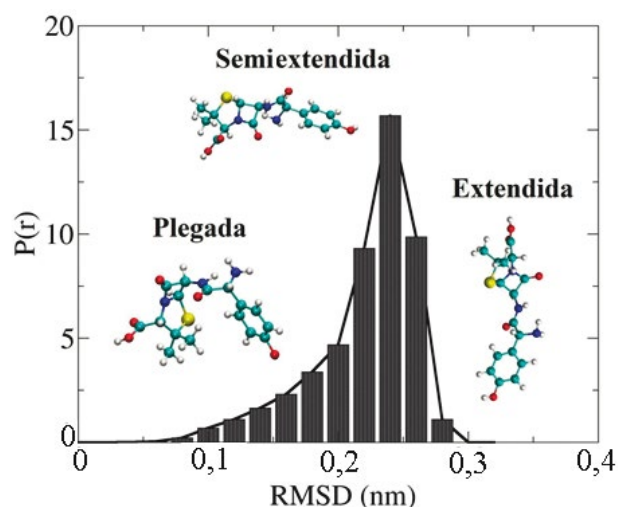


**Figura 6.** Conformaciones estructurales de la amoxicilina más estables en el agua descrita como solvente implícito. (a), (b), (c), (d) y (e) corresponden a las conformaciones C43, C45, C49, C51 y C56 sin el puente de hidrógeno intramolecular en el grupo -COOH. (f), (g), (h), (i) y (j) corresponden a las conformaciones C5, C29, C34, C47 y C56 con el puente de hidrógeno intramolecular en el grupo -COOH.

## Análisis conformacional de la amoxicilina mediante la simulación de dinámica molecular

La dinámica molecular es un tipo de técnica computacional que ha permitido analizar el comportamiento o evolución de un sistema (físico, químico o biológico) a través del tiempo, calculando las fuerzas entre los átomos que lo conforman mediante las ecuaciones del movimiento de Newton. En este caso, la variación de la conformación espacial de la amoxicilina en presencia de agua definida de forma explícita fue evaluada usando la combinación de los Force Field OPLS-AA [46] y TIP4P [47], [48]. Estos modelos de Force Field han sido ampliamente aceptados para describir las propiedades estructurales y termodinámicas de moléculas orgánicas y agua en diferentes estudios computacionales. La molécula de amoxicilina que fue insertada en la caja con agua presentaba una conformación plegada como se observa en la Figura 3. De esta simulación de dinámica molecular se obtuvieron un total de 20.000 conformaciones espaciales para la molécula de amoxicilina en agua.

En esta primera parte, los cambios conformacionales con respecto a la estructura inicial fueron explorados para evaluar la variación estructural de la molécula de amoxicilina en el agua a lo largo de la simulación. Para realizar esto, la raíz cuadrada de la desviación cuadrática media de las posiciones de los átomos (RMSD) en el espacio ocupado fue determinada usando la trayectoria de las posiciones atómicas a lo largo del tiempo de simulación. La distribución de probabilidad de esta propiedad estructural se muestra en la Figura 7.

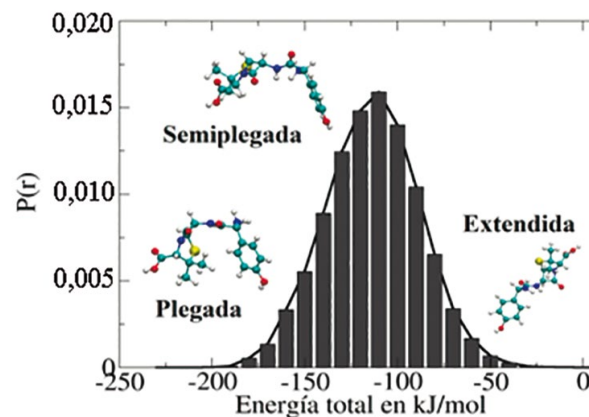


**Figura 7.** Distribución de probabilidad para el RMSD de la amoxicilina en agua obtenido con la simulación de dinámica molecular. 20000 conformaciones espaciales fueron obtenidas para la amoxicilina. Este valor de RMSD fue determinado usando una conformación plegada de la amoxicilina.

Como se observa en la Figura 7, las conformaciones espaciales obtenidas para la amoxicilina fueron plegadas, semiextendidas y extendidas completamente. En este caso, las conformaciones espaciales semiextendidas y extendidas de la amoxicilina están presentes con mayor proporción en el medio acuoso explícito en comparación con la conformación inicial tipo plegada. La conformación espacial semiextendida se presenta con la mayor probabilidad y un valor de RMSD de 0,26 nm, lo cual indica una gran variación conformacional de la estructura molecular de la amoxicilina en agua en comparación con la estructura inicial que fue colocada dentro de la caja de agua. En dicha conformación espacial, la amoxicilina se encuentra con todos los grupos funcionales expuestos al exterior para interactuar con las moléculas de agua. En cambio, en la estructura con la conformación plegada se observa la interacción intramolecular entre el anillo aromático y

el anillo de cinco miembros presente en la amoxicilina. De igual manera, en esta conformación se observa la interacción tipo puente de hidrógeno entre el átomo de hidrógeno del grupo  $-NH$  y el nitrógeno  $-NH_2$  presente en la estructura.

Adicionalmente, la distribución de probabilidad de la energía total de la molécula de amoxicilina para sus diferentes conformaciones en agua fue determinada en este estudio. Este resultado se muestra en la Figura 8.



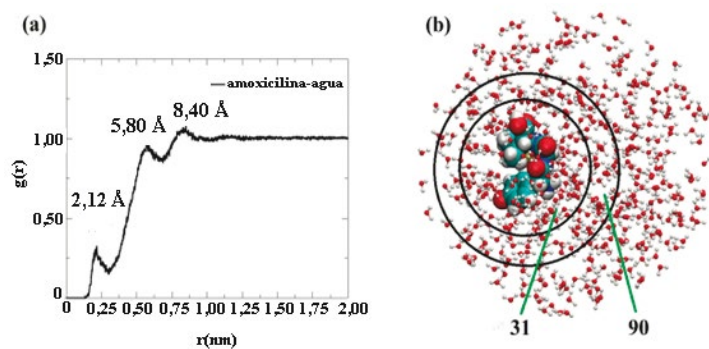
**Figura 8.** Distribución de probabilidad de la energía total de la amoxicilina en agua obtenida de la simulación de dinámica molecular tipo NVT.

Como se muestra en la Figura 8, las energías totales de las conformaciones obtenidas de la simulación con dinámica molecular se encuentran en un intervalo comprendido entre -200 y -50 kJ/mol. El valor de energía total igual a -50 kJ/mol sugiere que el arreglo espacial extendido para la amoxicilina en agua corresponde a la conformación menos estable presente en el medio solvente. A su vez, la amoxicilina ligeramente plegada es la conformación espacial que tiene la mayor probabilidad de estar presente en el medio acuoso, lo cual indica que esta configuración tiene la población de conformaciones más alta a lo largo del proceso de simulación con un valor de energía total comprendido entre -130 y -100 kJ/mol. También, se puede observar que la conformación completamente plegada tiene la energía más estable (alrededor de -200 kJ/mol) en comparación con el resto de las conformaciones observadas en las simulaciones. En esta conformación plegada se observa que el anillo aromático interacciona con el anillo formado por cinco átomos y los grupos funcionales polares quedan expuestos para interactuar con las moléculas de agua. Esto indica que se presenta el efecto hidrofóbico en este proceso de solvatación de la molécula de amoxicilina en la fase acuosa. Finalmente, los resultados obtenidos de la simulación de dinámica molecular sugieren que hay una considerable variación de las conformaciones de la amoxicilina a lo largo de la simulación. En este caso, el mayor RMSD fue obtenido para la conformación extendida; sin embargo, esta conformación corresponde a la conformación menos estable en el medio solvente desde el punto de vista energético. En cambio, el RMSD (alrededor de 0,1) de la conformación plegada fue el más bajo, lo cual indica que esta conformación es muy parecida a la conformación inicial usada para el proceso de simulación. En este estudio, usando la combinación de modelos de energía potencial OPLS-AA [46] y TIP4P [47], [48], la conformación plegada corresponde a la más estable como lo indica la energía total obtenida de la simulación. La ventaja que tiene el usar la dinámica molecular es que nos permite obtener un mayor conjunto de conformaciones espaciales en comparación con el obtenido con el programa Ballon-v1.8.2 [33]. Este criterio es importante siempre y cuando se utilice el modelo de energía potencial adecuado para describir las moléculas en estudio. En la siguiente sección se exploran las interacciones moleculares entre la amoxicilina y el agua que influyen en su conformación espacial en fase acuosa.

## Evaluación de las interacciones moleculares entre la amoxicilina y el agua mediante dinámica molecular

Para evaluar las interacciones moleculares entre la amoxicilina y las moléculas de agua se utilizó la función de distribución radial (RDF, por sus siglas en inglés) que permite determinar las capas de solvatación alrededor de una molécula en particular y la intensidad de la interacción en un medio solvente. La curva RDF entre la amoxicilina y el agua en conjunto con una representación de las capas de solvatación se muestran en la Figura 9.

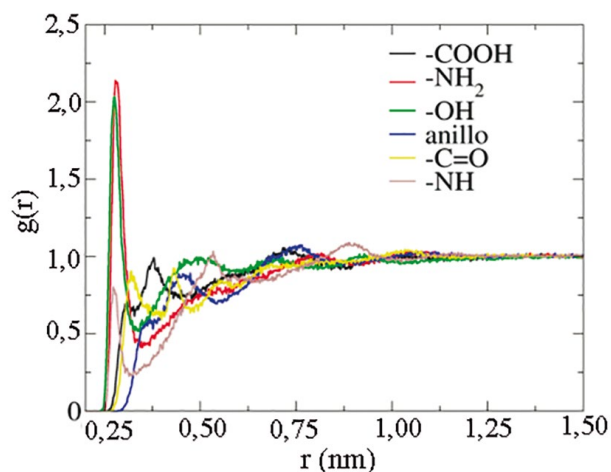
La curva RDF fue obtenida utilizando los centros de masas de las moléculas involucradas en este estudio. En la Figura 9(a) se observan un total de tres picos de máxima intensidad localizados a las distancias de 2,12; 5,80 y 8,40 Å. Estos picos indican la formación de tres capas de solvatación alrededor de la molécula de amoxicilina. La primera capa de solvatación tiene un espesor de 2,12 Å medido desde el centro de masa de la amoxicilina. La intensidad de este primer pico sugiere que la interacción molecular es muy débil entre las moléculas de agua localizadas en este radio de interacción y la amoxicilina. El número total de moléculas de agua localizadas en esta región es de 31 (ver Figura 9(b)). La segunda capa de solvatación empieza a una distancia 2,12 Å y termina en la posición del segundo pico de interacción a una distancia de 5,80 Å. Las moléculas de agua localizadas en esta capa de solvatación interactúan con las moléculas de amoxicilina y con las moléculas de agua localizadas en la primera capa de solvatación que están interactuando con la molécula de amoxicilina. Esta descripción ha sido utilizada en otros estudios de solvatación explícita [52], [53]. En este caso, las interacciones moleculares que prevalecen en esta región corresponden a los puentes de hidrógeno entre las moléculas de agua localizadas en esta región. Desde 5,80 hasta 8,40 Å se observa una tercera capa de solvatación alrededor de la molécula de amoxicilina que corresponde a la interacción tipo puentes de hidrógeno entre las moléculas de agua. El número de moléculas de agua alrededor de la segunda capa de solvatación fue de 90 moléculas según los resultados obtenidos de la simulación realizada (ver Figura 9(b)).



**Figura 9.** (a) Curva de la función de distribución radial entre la amoxicilina y el agua obtenida de la simulación de dinámica molecular tipo NVT y (b) Capas de solvatación alrededor de la molécula de amoxicilina.

De igual manera, la interacción molecular entre los grupos funcionales presentes en la amoxicilina con el agua fue evaluada mediante la función de distribución radial utilizando los últimos 10 ns de la simulación de dinámica molecular tipo NVT (ver Figura 10). Aquí se observa cómo los grupos funcionales -COOH, -NH<sub>2</sub>, -OH y -NH tienen la interacción molecular más fuerte con el agua en el proceso de simulación. En este caso, la fuerza de la interacción con el agua tiene el siguiente orden para los grupos funcionales evaluados: -NH<sub>2</sub> > -OH > -COOH > -NH como lo expresa la magnitud del primer pico de interacción.

El pico de máxima intensidad para el grupo -COOH está localizado a una distancia de 3,04 Å. Este grupo funcional es un donador de protones. Este protón saliente de este grupo funcional puede ser aceptado por las moléculas de agua que rodean a la amoxicilina. En cambio, para los grupos -OH y -NH<sub>2</sub>, el pico de máxima intensidad está localizado a 2,80 Å. El grupo -NH<sub>2</sub> tiene un par de electrones libres que lo convierten en un buen aceptor de los hidrógenos presentes en las moléculas de agua y el grupo funcional -OH puede ser solvatado muy bien por las moléculas de agua. La intensidad del pico del grupo -COOH es menor en comparación con el del grupo -NH<sub>2</sub> y el grupo -OH. En este caso, se corrobora que estos grupos funcionales están asociados directamente a los pKa de la molécula de amoxicilina debido a que presentan los picos de interacción de mayor intensidad en la curva de RDF que se muestra en la Figura 10.



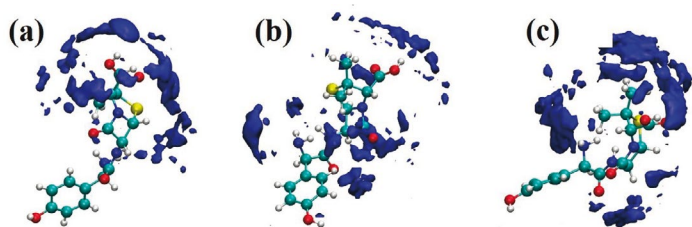
**Figura 10.** Curva de la función de distribución radial entre los grupos funcionales presentes en la amoxicilina y el agua, obtenida de la simulación de dinámica molecular tipo NVT.

En función de la curva RDF, se puede establecer que los grupos funcionales: -NH<sub>2</sub>, -OH y -NH presentes en la amoxicilina tienen una solvatación más efectiva en agua en comparación con el grupo funcional -COOH. También se observa que el anillo beta-lactámico tiene dos picos de interacción débil con intensidades localizadas en las posiciones 4,54 y 7,44 Å. Esto sugiere la presencia de dos capas de solvatación alrededor de este anillo que permite indicar la exposición que tiene esta porción de la molécula de amoxicilina a las moléculas de agua. Adicionalmente, la función de distribución espacial (SDF, por sus siglas en inglés) alrededor de la molécula de amoxicilina fue determinada con la simulación de dinámica molecular [54], [55]. Esta función muestra la isosuperficie que producen las moléculas de agua alrededor de la molécula de amoxicilina. En este caso, la isosuperficie SDF fue obtenida usando como grupo funcional de referencia el -COOH presente en la amoxicilina, como se muestra en la Figura 11.

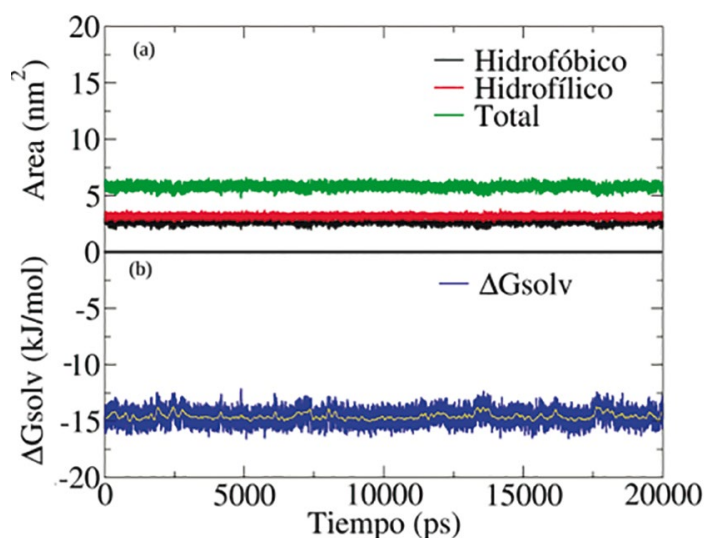
En la Figura 11 se observan las isosuperficies que corresponden a la capa de solvatación alrededor de los diferentes grupos presentes en la estructura de la amoxicilina. Estas isosuperficies están localizadas en las regiones más hidrofílicas que se muestran en la estructura de la amoxicilina en dicha conformación espacial promedio [52]. Esto indica que las moléculas de agua rodean de forma efectiva los grupos polares presentes en la molécula de amoxicilina. En la Figura 11(a) se muestra cómo la isosuperficie SDF está localizada en la región asociada al grupo -COOH cuando la referencia para determinar dicha propiedad es el mismo grupo funcional. En la Figura 11(b) se observa cómo la isosuperficie cubre completamente a la molécula de amoxicilina cuando la referencia utilizada para su estimación fue el grupo funcional -NH<sub>2</sub> y finalmente para el grupo -OH usado como referencia se observa que la capa de solvatación se concentra de igual manera en la región más hidrofílica de la molécula (ver Figura 11(c)). En este caso, se observa que el anillo aromático no muestra isosuperficies SDF cuando las moléculas



de agua están cerca de su entorno. Para complementar lo obtenido en esta distribución de moléculas de agua alrededor de la estructura molecular de la amoxicilina, la energía de solvatación y la superficie accesible al solvente fueron determinadas para esta molécula en el medio solvente [56], [57]. En la Figura 12 se muestra la energía libre de solvatación y la superficie accesible al solvente como función del tiempo de la simulación de dinámica molecular.



**Figura 11.** Representación de la función de distribución espacial (SDF, por sus siglas en inglés) del sistema amoxicilina y agua obtenido del análisis de la simulación de dinámica molecular tipo NVT. La SDF fue determinada usando diferentes referencias: (a) grupo funcional -COOH, (b) grupo funcional  $\text{NH}_2$  y (c) grupo funcional -OH.



**Figura 12.** (a) Área accesible al solvente de la amoxicilina como función del tiempo de simulación y (b) Energía libre de solvatación de la amoxicilina en agua como función del tiempo de simulación.

Claramente, como se muestra en la Figura 12(a) la región hidrofílica tiene más área de contacto con el agua en comparación con la región lipofílica. El área accesible al solvente para la región lipofílica de la molécula es de  $2,63 \pm 0,17 \text{ nm}^2$  y para la región hidrofílica el área accesible fue de  $3,18 \pm 0,23 \text{ nm}^2$ . Estos valores indican que la región hidrofílica es la que presenta los grupos funcionales -COOH, - $\text{NH}_2$  y -NH en conjunto con el anillo beta-lactámico contenido en la estructura de la amoxicilina. Finalmente, el valor de  $-14,58 \text{ kJ/mol}$  para la energía libre de solvatación muestra la afinidad que tiene la molécula de amoxicilina por el agua. Sin embargo, este valor es muy bajo comparado con los reportados por Khanal y Adhikari [58], comprendido entre  $-528$  y  $-558 \text{ kJ/mol}$ , el cual fue obtenido por simulaciones de dinámica molecular usando diferentes modelos de energía potencial para describir el agua y distintos métodos de integración para calcular la energía libre de solvatación. Cabe destacar que el valor obtenido en este trabajo sugiere que la molécula de amoxicilina tiene una alta solubilidad en agua a una temperatura de  $298,15 \text{ K}$  (ver Figura 12(b)). La solubilidad experimental de la amoxicilina en agua ha sido reportada con un valor aproximado de  $4 \text{ mg/mL}$  [59], [60]. Finalmente, esto indica que los

resultados de las simulaciones moleculares son consistentes con los valores reportados experimentalmente.

## Conclusiones

El arreglo espacial y la interacción molecular de la amoxicilina en agua fueron evaluados mediante dos estrategias de simulación molecular. Inicialmente, el generador de conformaciones espaciales balloon-v-1.8.2 que depende del modelo de energía potencial MMFF94 fue usado para construir las conformaciones de la amoxicilina, y la estabilidad de las conformaciones de esta molécula fue determinada mediante cálculos mecánico-cuánticos en el vacío y en el solvente con el método de solvatación implícita. Los resultados han demostrado que no es adecuado considerar las conformaciones obtenidas por el generador de conformaciones como geometrías aceptables, sino que es necesario hacer una exploración de estas configuraciones usando los cálculos mecánico-cuánticos. Para la amoxicilina se obtuvo que la conformación más estable en el vacío (conformación C1) difiere de la obtenida en el medio solvente (conformación C56). Particularmente, los cálculos mecánico-cuánticos en el vacío sugieren que la amoxicilina tiene una conformación extendida. Sin embargo, usando la solvatación implícita, la amoxicilina tiene un arreglo semiplegada y plegada completamente para la conformación sin puente de hidrógeno y con puente de hidrógeno en el grupo -COOH. La presencia del puente de hidrógeno intramolecular contribuye a incrementar la estabilidad de la molécula en el medio solvente. De la simulación de dinámica molecular, la amoxicilina es bien descrita por el modelo de energía potencial OPLS-AA. En este caso, los resultados sugieren que la conformación más estable en agua corresponde a una conformación plegada. Sin embargo, en la simulación, la conformación con mayor población presente es la conformación semiplegada. De igual manera, la RDF indica que la amoxicilina presenta tres capas de solvatación alrededor de su estructura molecular. La función de densidad espacial y la superficie accesible al solvente sugieren que la amoxicilina tiene una región hidrofílica bien definida en donde se encuentran presentes el anillo beta-lactámico y los grupos -COOH, - $\text{NH}_2$  y -NH. La energía libre de solvatación de  $-14,58 \text{ kJ/mol}$  indica que la amoxicilina tiene una muy buena afinidad por el agua. Sin embargo, este valor difiere considerablemente del obtenido por el método de solvatación implícita de  $-98,16$  y  $-121,42 \text{ kJ/mol}$  para las conformaciones más estables. En este trabajo, ambas estrategias de cálculos permiten explicar el comportamiento de las conformaciones de la amoxicilina en agua.

## Agradecimientos

Esta investigación ha sido financiada por el proyecto Concytec-Banco Mundial "Mejoramiento y Ampliación de los Servicios del Sistema Nacional de Ciencia Tecnología e Innovación Tecnológica" 8682-PE, por medio de su unidad ejecutora ProCiencia (Contrato 04-2018-FONDECYT/BM), con el objetivo de aportar en la investigación en el modelamiento molecular.

## Referencias

- [1] J. Meléndez-Marmolejo, Y. García-Saavedra, V. Galván-Romero, L. D. de León-Martínez, K. Vargas-Berrones, J. Mejía-Saavedra y R. F. Ramírez, "Contaminantes emergentes. Problemática ambiental asociada al uso de antibióticos. Nuevas técnicas de detección, remediación y perspectivas de legislación en América Latina", *Revista de Salud Ambiental*, vol. 20, no. 1, pp. 53-61, 2020. <https://ojs.diffundit.com/index.php/rsa/article/view/1033>.

- [2] J. P. Bound and N. Voulvoulis, "Pharmaceuticals in the aquatic environment-a comparison on risk assessment strategies", *Chemosphere*, vol. 56, pp. 1143-1155, 2004. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.05.010>.
- [3] W. Gaze and M. Depledge, "Antimicrobial Resistance: Investigating the Environmental Dimension-Frontiers 2017: Emerging Issues of Environmental Concern", *Frontiers 2017: Emerging Issues of Environmental Concern*, pp. 12-22, 2017. <https://wedocs.unep.org/20.500.11822/22263>.
- [4] A. Nikravan, "Amoxicillin and ampicillin removal from wastewater by Fenton and Photo-Fenton processes", 2015. <http://hdl.handle.net/11655/2661>.
- [5] A. Ghauch, A. Tuqan, and H. Abou Assi, "Antibiotic removal from water: elimination of amoxicillin and ampicillin by microscale and nanoscale iron particles", *Environmental pollution*, vol. 157, no. 5, pp. 1626-1635, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.12.024>.
- [6] K. Qin, Q. Zhao, H. Yu, J. Li, J. Jiang, K. Wang, and L. Wei, "Removal trend of amoxicillin and tetracycline during groundwater recharging reusing: Redox sensitivity and microbial community response", *Chemosphere*, vol. 282, pp. 131011, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131011>.
- [7] I. Gozlan, A. Rotstein, and D. Avisara, "Amoxicillin-degradation products formed under controlled environmental conditions: identification and determination in the aquatic environment", *Chemosphere*, vol. 91, no. 7, pp. 985-992, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.095>.
- [8] K. K. Sodhi, M. Kumar, and D. K. Singh, "Insight into the amoxicillin resistance, ecotoxicity, and remediation strategies", *Journal of Water Process Engineering*, vol. 39, pp. 101858, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101858>.
- [9] G. Binson, C. Grignon, G. Le Moal, P. Lazaro, J. Lelong, F. Roblot, and A. Dupuis, "Overcoming stability challenges during continuous intravenous administration of high-dose amoxicillin using portable elastomeric pumps", *Plos one*, vol. 14, no. 8, p. e0221391, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221391>.
- [10] I. Anastopoulos, I. Pashalidis, A. G. Orfanos, I. D. Manariotis, T. Tatarchuk, L. Sellaoui, and A. Núñez-Delgado, "Removal of caffeine, nicotine and amoxicillin from (waste) waters by various adsorbents. A review", *Journal of Environmental Management*, vol. 261, pp. 110236, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110236>.
- [11] F. K. Kies, S. Boutchebak, and N. Bendaïda, "Soil Contamination by Pharmaceutical Pollutants: Adsorption of an Antibiotic (Amoxicillin) on an Agricultural Land", *Multidisciplinary Digital Publishing Institute Proceedings*, vol. 30, no. 1, pp. 60, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/proceedings2019030060>.
- [12] M. Verma and A. K. Haritash, "Photocatalytic degradation of Amoxicillin in pharmaceutical wastewater: A potential tool to manage residual antibiotics", *Environmental Technology & Innovation*, vol. 20, p. 101072, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.101072>.
- [13] M. Verma and A. K. Haritash, "Degradation of amoxicillin by Fenton and Fenton-integrated hybrid oxidation processes", *Journal of Environmental Chemical Engineering*, vol. 7, no. 1, pp. 102886, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jece.2019.102886>.
- [14] Z. L. Wu, J. Zhao, and R. Xu, "Recent advances in oral nano-antibiotics for bacterial infection therapy", *International Journal of Nanomedicine*, vol. 15, pp. 9587, 2020. DOI: <https://doi.org/10.2147/ijn.s279652>.
- [15] J. Zhang, C. Zheng, Y. Dai, C. He, H. Liu, and S. Chai, "Efficient degradation of amoxicillin by scaled-up electro-Fenton process: attenuation of toxicity and decomposition mechanism", *Electrochimica Acta*, vol. 381, pp. 138274, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2021.138274>.
- [16] R. R. Kalantary, M. Farzadkia, M. Kermani, and M. Rahmatinia, "Heterogeneous electro-Fenton process by Nano-Fe3O4 for catalytic degradation of amoxicillin: Process optimization using response surface methodology", *Journal of environmental chemical engineering*, vol. 6, no. 4, pp. 4644-4652, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.06.043>.
- [17] J. I. Martínez-Costa, J. Rivera-Utrilla, R. Leyva-Ramos, M. Sánchez-Polo, I. Velo-Gala, and A. J. Mota, "Individual and simultaneous degradation of the antibiotics sulfamethoxazole and trimethoprim in aqueous solutions by Fenton, Fenton-like and photo-Fenton processes using solar and UV radiations", *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, vol. 360, pp. 95-108, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2018.04.014>.
- [18] J. Kuntail, A. Verma, S. Kumar, and I. Sinha, "Photo-Fenton interfacial phenomena on graphene oxide: Computational and experimental investigations", *Journal of Molecular Liquids*, vol. 342, p. 117461, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.117461>.
- [19] J. Uthuppan and K. Soni, "Conformational analysis: a review", *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, vol. 4, no. 1, p. 34, 2013. DOI: [http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.4\(1\).34-41](http://dx.doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.4(1).34-41).
- [20] O. M. Salo-Ahen, I. Alanko, R. Bhadane, A. M. Bonvin, R. V. Honorato, S. Hossain, and M. Vanmeert, "Molecular dynamics simulations in drug discovery and pharmaceutical development", *Processes*, vol. 9, no. 1, p. 71, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/pr9010071>.
- [21] S. Hossain, A. Kabelev, A. Parrow, C. A. Bergström, and P. Larsson, "Molecular simulation as a computational pharmaceutical tool to predict drug solubility, solubilization processes and partitioning", *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 137, pp. 46-55, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.02.007>.
- [22] M. Lundborg, C. L. Wennberg, A. Narangifard, E. Lindahl, and L. Norlén, "Predicting drug permeability through skin using molecular dynamics simulation", *Journal of controlled release*, vol. 283, pp. 269-279, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.05.026>.
- [23] R. S. Katiyar and P. K. Jha, "Molecular simulations in drug delivery: Opportunities and challenges", *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, vol. 8, no. 4, p. e1358, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1002/wcms.1358>.
- [24] J. Rubio-Martinez, M. Santos Tomas, and J. J. Perez, "Effect of the Solvent on the Conformational Behavior of the Alanine Dipeptide deduced from MD simulations", *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, vol. 78, p. 118-128, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2017.10.005>.
- [25] S. Hezaveh, S. Samanta, G. Milano, and D. Roccatano, "Molecular dynamics simulation study of solvent effects on conformation and dynamics of polyethylene oxide and polypropylene oxide chains in water and in common organic solvents", *The Journal of Chemical Physics*, vol. 136, no. 12, p. 124901. DOI: <https://doi.org/10.1063/1.3694736>.
- [26] L. Settimo, K. Bellman, and R. M. Knegtel, "Comparison of the accuracy of experimental and predicted pKa values of basic and acidic compounds", *Pharmaceutical research*, vol. 31, pp. 1082-1095, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11095-013-1232-z>.
- [27] ACE; ACE and JChem acidity and basicity calculator. ACE UKY-4.0, 2005-2015. Marvin JS. ChemAxon. Available from, as of Nov. 11, 2016: <https://epoch.uky.edu/ace/public/pKa.jsp>.
- [28] M. Cossi, V. Barone, R. Cammi, and J. Tomasi, "Ab initio study of solvated molecules: a new implementation of the polarizable continuum model", *Chemical Physics Letters*, vol. 255, no. 4-6, pp. 327-335, 1996. DOI: [https://doi.org/10.1016/0009-2614\(96\)00349-1](https://doi.org/10.1016/0009-2614(96)00349-1).
- [29] M. Cossi, N. Rega, G. Scalmani, and V. Barone, "Polarizable dielectric model of solvation with inclusion of charge penetration effects", *The Journal of Chemical Physics*, vol. 114, no. 13, pp. 5691-5701, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1063/1.1354187>.
- [30] M. Cossi, N. Rega, G. Scalmani, and V. Barone, "Energies, structures, and electronic properties of molecules in solution with the C-PCM solvation model", *Journal of computational chemistry*, vol. 24, no. 6, pp. 669-681, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcc.10189>.
- [31] Pubchem, "National Library of Medicine", 2022. [En línea]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/33613#section=3D-Conformer>. [Último acceso: 10 06 2022]
- [32] M. D. Hanwell, D. E. Curtis, D. C. Lonie, T. Vandermeersch, E. Zurek, and G. R. Hutchison, "Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform", *Journal of Cheminformatics*, vol. 4, no. 1, pp. 1-17, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1186/1758-2946-4-17>.

- [33] M. J. Vainio and M. S. Johnson, "Generating Conformer Ensembles Using a Multiobjective Genetic Algorithm", *Journal of Chemical Information and Modeling*, vol. 47, pp. 2462-2474, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1021/ci6005646>.
- [34] T. A. Halgren, "Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94", *Journal of computational chemistry*, vol. 17, no. 5-6, pp. 490-519. DOI: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(199604\)17:5/6%3C490::AID-JCC1%3E3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(199604)17:5/6%3C490::AID-JCC1%3E3.0.CO;2-P).
- [35] B. M. Bode and M. S. Gordon, "MacMolPlt: a graphical user interface for GAMESS", *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, vol. 16, no. 3, pp. 133-138, 1998. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1093-3263\(99\)00002-9](https://doi.org/10.1016/S1093-3263(99)00002-9).
- [36] M. W. Schmidt *et al.* "General atomic and molecular electronic structure system", *Journal of computational chemistry*, vol. 14, no. 11, pp. 1347-1363, 1993. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcc.540141112>.
- [37] G. M. J. Barca *et al.* "Recent developments in the general atomic and molecular electronic structure system", *The Journal of Chemical Physics*, vol. 152, no. 15, pp. 154102, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1063/5.0005188>.
- [38] M. S. Gordon and M. W. Schmidt, "Advances in electronic structure theory: GAMESS a decade later", in *Theory and Applications of Computational Chemistry: the first forty years*, C. E. Dykstra, G. Frenking, K. S. Kim, G. E. Scuseria (editors), Elsevier, Amsterdam, pp. 1167-1189, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-044451719-7/50084-6>.
- [39] Y. Zhao and D. G. Truhlar, "Density functionals with broad applicability in chemistry", *Accounts of chemical research*, vol. 41, no. 2, pp. 157-167, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1021/ar700111a>.
- [40] V. A. Rassolov, J. A. Pople, M. A. Ratner, and T. L. Windus, "6-31G\* basis set for atoms K through Zn", *The Journal of chemical physics*, vol. 109, no. 4, pp. 1223-1229, 1998. DOI: <https://doi.org/10.1063/1.476673>.
- [41] A. V. Marenich, C. J. Cramer, and D. G. Truhlar, "Universal solvation model based on solute electron density and on a continuum model of the solvent defined by the bulk dielectric constant and atomic surface tensions", *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 113, no. 18, pp. 6378-6396, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1021/jp810292n>.
- [42] K. Zimmermann, "Oral: All purpose molecular mechanics simulator and energy minimizer", *Journal of computational chemistry*, vol. 12, no. 3, pp. 310-319, 1991. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcc.540120305>.
- [43] G. Bussi, D. Donadio, and M. Parrinello, "Canonical sampling through velocity rescaling", *The Journal of Chemical Physics*, vol. 126, no. 1, p. 014101, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1063/1.2408420>.
- [44] U. Essmann, L. Perera, M. L. Berkowitz, T. Darden, H. Lee, and L. G. Pedersen, "A smooth particle mesh Ewald method", *J. Chem. Phys.*, vol. 103, pp. 8577-8592, 1995. DOI: <https://doi.org/10.1063/1.470117>.
- [45] M. J. Robertson, J. Tirado-Rives, and W. L. Jorgensen, "Improved Peptide and Protein Torsional Energetics with the OPLS-AA Force Field", *J. Chem. Theory Comput.* vol. 11, no. 7, pp. 3499-3509, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00356>.
- [46] L. S. Dodda, I. Cabeza de Vaca, J. Tirado-Rives, and W. L. Jorgensen, "LigParGen web server: An automatic OPLS-AA parameter generator for organic ligands", *Nuc. Acids Res.*, vol. W1, pp. 6665-6670, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkx312>.
- [47] P. Mark and L. Nilsson, "Structure and dynamics of the TIP3P, SPC, and SPC/E water models at 298 K", *The Journal of Physical Chemistry A*, vol. 105, no. 43, pp. 9954-9960, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1021/jp003020w>.
- [48] W. L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J. D. Madura, R. W. Impey, and M. L. Klein, "Comparison of simple potential functions for simulating liquid water", *The Journal of Chemical Physics*, vol. 79, no. 2, pp. 926-935, 1983. DOI: <https://doi.org/10.1063/1.445869>.
- [49] D. van der Spoel, E. Lindahl, B. Hess, G. Groenhof, A.E. Mark, and H.J.C. Berendsen, "GROMACS: Fast, Flexible and Free". *J. Comp. Chem.*, vol. 26, pp. 1701-1718, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcc.20291>.
- [50] B. Hess, C. Kutzner, D. van der Spoel, and E. Lindahl, "GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation", *J. Chem. Theory Comput.*, vol. 4, no. 3, pp. 435-447, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1021/ct700301q>.
- [51] R. Petry, B. Focassio, G. R. Schleder, D. S. T. Martinez, and A. Fazzio, "Conformational analysis of tannic acid: Environment effects in electronic and reactivity properties", *The Journal of Chemical Physics*, vol. 154, no. 22, p. 224102, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1063/5.0045968>.
- [52] Y. Shi-Ming, Y. Hui, L. Kai, L. Cheng-Bu, and Y. Shi-Ling, "Surface behavior of model surfactant: A theoretical simulation study", *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 348, no. 1, pp. 159-166, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2010.04.026>.
- [53] I. W. Chun, C. H. Chi, and A. C. Chow, "Dynamic Solvation Shell and Solubility of C60 in Organic Solvents", *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 118, no. 33, pp. 9964-9973, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1021/jp506572p>.
- [54] I. M. Svishchev and P. G. Kusalik, "Structure in liquid water: A study of spatial distribution functions", *The Journal of chemical physics*, vol. 99, no. 4, pp. 3049-3058, 1994. DOI: <https://doi.org/10.1063/1.465158>.
- [55] I. M. Svishchev and P. G. Kusalik, "Structure in liquid methanol from spatial distribution functions", *The Journal of chemical physics*, vol. 100, no. 7, pp. 5165-5171, 1994. DOI: <https://doi.org/10.1063/1.467181>.
- [56] F. Eisenhaber, P. Lijnzaad, P. Argos, C. Sander, and M. Scharf, "The double dube lattice Method: efficient approaches to numerical integration of surface area and Volume and to Dot Surface Contouring of Molecular Assemblies", *J. Comp. Chem.*, vol. 16, pp. 273-284, 1995. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcc.540160303>.
- [57] D. Eisenberg and A. D. McLachlan, "Solvation energy in protein folding and binding", *Nature*, vol. 319, pp. 199-203, 1986. DOI: <https://doi.org/10.1038/319199a0>.
- [58] S. P. Khanal and N. P. Adhikari, "Thermodynamic and transport properties of amoxicillin", *Journal of Molecular Liquids*, vol. 354, pp. 118865, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.118865>.
- [59] P. Bhattacharyya and W. Cort, "Amoxicillin", *Analytical Profiles of Drug Substances*, vol. 7, pp. 19-41, 1978. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0099-5428\(08\)60088-X](https://doi.org/10.1016/S0099-5428(08)60088-X).
- [60] I. Felix, L. Moreira, O. Chiavone-Filho, and S. Mattedi, "Solubility measurements of amoxicillin in mixtures of water and ethanol from 283.15 to 298.15 K", *Fluid Phase Equilibria*, no. 422, pp. 78-86, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2016.02.040>.

**Citación de Artículo:**

M. Á. Carrillo - Hernández, W. H. Hirota & J.G. Parra, "Comportamiento de la amoxicilina en agua mediante métodos de solvatación implícita y explícita", *Rev. Colomb. Quim.*, vol. 51, no. 2, pp. 25-34, 2022. DOI: <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v51n2.103567>



## Reconocimiento de rutas biosintéticas para semioquímicos mediante técnicas de aprendizaje de máquina

### Resumen

En este trabajo consideramos 148 semioquímicos reportados para la familia *Scarabaeidae*, cuya estructura química fue caracterizada empleando un conjunto de 200 descriptores moleculares de cinco clases distintas. La selección de los descriptores más discriminantes se realizó con tres técnicas: análisis de componentes principales, por cada clase de descriptores, bosques aleatorios y Boruta-Shap, aplicados al total de descriptores. A pesar de que las tres técnicas son conceptualmente diferentes, seleccionan un número de descriptores similar de cada clase. Propusimos una combinación de técnicas de aprendizaje de máquina para buscar un patrón estructural en el conjunto de semioquímicos y posteriormente realizar la clasificación de estos. El patrón se estableció a partir de la alta pertenencia de un subconjunto de estos metabolitos a los grupos que fueron obtenidos por un método de agrupamiento basado en lógica difusa, C-means; el patrón descubierto corresponde a las rutas biosintéticas por las cuales se obtienen biológicamente. Esta primera clasificación se corroboró con el empleo de mapas autoorganizados de Kohonen. Para clasificar aquellos semioquímicos cuya pertenencia a una ruta no quedaba claramente definida, construimos dos modelos de perceptrones multicapa, los cuales tuvieron un desempeño aceptable.

**Palabras clave:** bosques aleatorios; C-means; descriptores moleculares; familia *Scarabaeidae*; perceptrón multicapa; redes neuronales.

## Recognition of biosynthetic pathways for semiochemicals using machine learning techniques

### Abstract

In this work we consider 148 semiochemicals reported for the family *Scarabaeidae*, whose chemical structure was characterized using a set of 200 molecular descriptors from five different classes. The selection of the most discriminating descriptors was carried out with three different techniques: Principal Component Analysis, for each class of descriptors, Random Forests and Boruta-Shap, applied to the total of descriptors. Although the three techniques are conceptually different, they select a similar number of descriptors from each class. We proposed a combination of machine learning techniques to search for a structural pattern in the set of semiochemicals and then perform their classification. The pattern was established from the high belonging of a subset of these metabolites to the groups that were obtained by a grouping method based on fuzzy C-means logic; the discovered pattern corresponds to the biosynthetic pathway by which they are obtained biologically. This first classification was corroborated with Kohonen's self-organizing maps. To classify those semiochemicals whose belonging to a biosynthetic pathway was not clearly defined, we built two models of Multilayer Perceptrons which had an acceptable performance.

**Keywords:** Random forests; C-means; molecular descriptors; family *Scarabaeidae*; multilayer perceptron; neural networks.

## Reconhecimento de vias biossintéticas para semioquímicos usando técnicas de aprendizado de máquina

### Resumo

Neste trabalho consideramos 148 semioquímicos reportados para a família *Scarabaeidae*, cuja estrutura química foi caracterizada usando um conjunto de 200 descriptores moleculares de 5 classes diferentes. A seleção dos descriptores mais discriminantes foi realizada com três técnicas diferentes: Análise de Componentes Principais, para cada classe de descriptores, Florestas Aleatórias e Boruta-Shap, aplicadas a todos os descriptores. Embora as três técnicas sejam conceitualmente diferentes, elas selecionaram um número semelhante de descriptores de cada classe. Nós propusemos uma combinação de técnicas de aprendizado de máquina para buscar um padrão estrutural no conjunto de semioquímicos e então realizar sua classificação. O padrão foi estabelecido a partir da alta pertinência de um subconjunto desses metabolitos aos grupos que foram obtidos por um método de agrupamento baseado em lógica fuzzy, C-means; o padrão descoberto corresponde às rotas biossintéticas pelas quais eles são obtidos biologicamente. Essa primeira classificação foi corroborada com o uso dos mapas autoorganizados de Kohonen. Para classificar os semioquímicos cuja pertença a uma rota não foi claramente definida, construímos dois modelos de Perceptrons Multicamadas que tiveram um desempenho aceitável.

**Palavras-chave:** florestas aleatórias; C-means; descriptores moleculares; família *Scarabaeidae*; perceptron multicamadas; redes neurais.



## Introducción

La ecología química es un campo de conocimiento transdisciplinar que cada vez gana mayor relevancia [1], [2]. Parte fundamental de esta disciplina es la identificación de las moléculas que median la comunicación entre insectos o planta-insecto. En la medida en que se conocen más semioquímicos y se acumulan datos sobre su uso, resulta conveniente la creación de herramientas que contribuyan de una manera rápida y eficiente a establecer patrones y relaciones sobre esta información y así aportar a futuras investigaciones.

En este como en otros campos de la química, las relaciones entre estructura y actividad están en el centro del problema y parte fundamental de este es lograr una buena representación cuantitativa de la estructura química; es decir, una que pueda procesarse computacionalmente [3]. De ahí que actualmente se hayan definido miles de descriptores moleculares que buscan codificar distintos aspectos de la estructura; por ejemplo, características topológicas, propiedades fisicoquímicas, grupos funcionales u otras propiedades dependientes de la conformación espacial de los componentes moleculares [4]. Sin embargo, la selección de los descriptores apropiados es un problema abierto que depende del objetivo que se persigue [5], [6]. Alternativamente, se puede acudir a conjuntos redundantes de los mismos como estrategia multiobjetivo para la búsqueda de patrones [7], [8].

El sistema insecto-semioquímico y la representación de estas moléculas constituyen un sistema complejo para el cual se ha generado y se sigue generando información. Este sistema constituye un espacio propicio para ser explorado mediante técnicas de minería de datos y aprendizaje de máquina, cuya utilización en diversos campos de la ciencia y la tecnología ha sido exitosa. En química, por ejemplo, se han implementado algoritmos de aprendizaje automático de distinta naturaleza que solventan problemas en diversas áreas, que abarcan desde la química analítica hasta la catálisis, pasando por la química orgánica y la química computacional [9]. Algunos de estos estudios apuntan a tratar relaciones estructura-actividad (SAR) por medio del desarrollo de herramientas de aprendizaje automático que facilitan el diseño y la selección de moléculas con la actividad esperada. En particular, algunos hacen uso de perceptrones multicapa y redes neuronales profundas para la clasificación de moléculas [10], [11].

En este trabajo nos proponemos comparar un conjunto de metodologías para la selección de las variables más relevantes y métodos de agrupamiento que pueden ser empleados para el descubrimiento de patrones estructurales en el conjunto de los semioquímicos reportados para los coleópteros de la familia *Scarabaeidae*. A la vez, implementamos modelos de aprendizaje de máquina capaces de realizar la clasificación de este tipo de metabolitos en las categorías establecidas por el patrón descubierto.

## Materiales y métodos

### Sistema de estudio

Para este estudio se empleó un modelo constituido por un conjunto de 148 semioquímicos reportados para 240 especies de insectos de la familia *Scarabaeidae* (orden: *Coleoptera*) que se almacenó en una base de datos relacional SQL [12]<sup>1</sup>.

La estructura química de los compuestos considerados se caracterizó mediante un conjunto redundante de descriptores moleculares de diferentes clases. Así, con el programa RDKit [13] se calcularon 188 descriptores, los cuales clasificamos en cuatro clases: la primera constituida por descriptores 19 derivados esencialmente de propiedades grafo-teóricas, la segunda corresponde a 106 descriptores que dan cuenta de la constitución de las moléculas según la presencia de ciertos fragmentos o tipos de enlaces,

<sup>1</sup> La lista de las moléculas, así como los descriptores empleados para caracterizarlas, pueden ser solicitados a los autores.

la tercera consta de 58 descriptores basados en propiedades que se calculan sobre superficies tridimensionales asociadas a las moléculas y la cuarta está conformada por cinco descriptores asociados a propiedades fisicoquímicas. El listado de los descriptores calculados puede consultarse en la siguiente dirección URL: <https://www.rdkit.org/docs/GettingStartedInPython.html#descriptor-calculation>.

Además, se calcularon 12 descriptores de naturaleza cuántica (HOMO; LUMO; constantes rotacionales en X, Y y Z; extensión espacial electrónica; momento dipolar en X, Y, Z y el total; electronegatividad y dureza) derivados de la matriz de densidad obtenida con el método de funcionales de la densidad B3LYP/6-31(d,p) implementado en Gaussian 09 [14]. De esta forma se propone un total de 200 descriptores moleculares de cinco clases diferentes.

Dado que hemos seleccionado un conjunto redundante de descriptores, es posible que se presenten dependencias entre algunos de ellos o que hayamos incluido algunos poco relevantes en el momento de reproducir un patrón de clasificación; por lo tanto, es necesario seleccionar los descriptores más discriminatorios para evitar sesgos. Este proceso se llevó a cabo de manera paralela mediante tres métodos:

(i) Análisis de componentes principales (ACP) [15]: el ACP suele emplearse para reducir la dimensionalidad del espacio de representación; para ello se definen unas nuevas variables mediante una transformación que asegura que la mayor parte de la varianza de los datos sea explicada por unas pocas de estas variables, los componentes principales. Cuando se emplea para seleccionar entre las variables originales deben escogerse aquellas (los descriptores) que más contribuyen a la conformación de los componentes principales; como criterio de selección se propuso que la suma de los cuadrados de los coeficientes del descriptor con que contribuye a los componentes principales, que describen hasta el 70% de la varianza acumulada de los datos, tuviese un valor superior a 0,3 (la suma sobre todos los componentes principales es por definición la unidad). La selección de descriptores se realizó por separado para las cinco clases mencionadas.

(ii) Bosques aleatorios (BA) [16]: BA es un método de aprendizaje supervisado, basado en árboles de decisión, para clasificar objetos en función de un patrón previamente determinado. Este método establece unas *puntuaciones de importancia* para cada variable según la impureza de Gini, la cual es una medida que evalúa la distribución de los datos por nodo y establece qué tan óptima es una escisión de los datos respecto a cada variable. Estas *puntuaciones de importancia* permiten seleccionar las variables más significativas para reproducir una clasificación propuesta; para este estudio se seleccionaron los descriptores con puntuaciones superiores a 0,41%; este valor nos permitió tener el mismo número de variables que fue hallado mediante el uso de ACP.

(iii) Boruta-Shap (BS) [17]: BS es un método de selección de variables que combina el algoritmo Boruta y la técnica Shap. El primero realiza una selección y eliminación iterativa de variables no relevantes para una función objetivo o patrón de clasificación, teniendo como criterio las *puntuaciones de importancia* de unas variables “sombra” (las cuales son una combinación aleatoria de las variables originales); y la segunda establece las variables que presentan una mayor influencia en las predicciones de los modelos de aprendizaje de máquina con base en la teoría de juegos cooperativos.

Para el ACP se empleó la librería *stats* disponible para lenguaje de programación R [18] y para los métodos de BA y BS se emplearon las librerías *SciKit-learn* [19] y *Boruta-Shap* [17], respectivamente disponibles en Python<sup>2</sup>. Los tres resultados de selección de variables se comparan más adelante.

### Reconocimiento de patrones y técnicas de agrupamiento

Si bien existe una gran cantidad de métodos para el descubrimiento de patrones que utilizan algoritmos no supervisados, en este trabajo se utilizaron dos técnicas diferentes: el método de lógica difusa C-means (FCM, por su

<sup>2</sup> Los códigos fuente están accesibles por solicitud a los autores.

nombre en inglés) [20] y los mapas autoorganizados de Kohonen (SOM, por sus siglas en inglés) [21]. Estos últimos con la intención de corroborar la plausibilidad de posible patrón hallado con el primero.

Los métodos de agrupamientos no jerárquicos como el FCM requieren de la definición *a priori* de un número de centroides o semillas. Probamos un número de semillas entre 2 y 5 y que en todos los casos se observan tres grupos; alternativamente ensayamos diversos métodos de agrupamiento jerárquico, pero no logramos la reproducibilidad de ninguna clasificación [22]. El algoritmo FCM se ejecutó en R [18] con un valor de 2 para el parámetro de difuminado y un criterio de convergencia de  $1 \times 10^{-9}$ .

Las redes neuronales SOM fueron construidas en Python [19] usando la biblioteca MiniSOM [23] y constan de  $m$  neuronas de entrada;  $m$  corresponde al número de variables seleccionadas (descriptores moleculares relevantes) que alimentan la red, y 225 neuronas de salida ( $15 \times 15$ ); lo cual corresponde a la arquitectura óptima respecto al error de cuantización y al número de neuronas que han de especializarse en cada variable. Las SOM fueron entrenadas con una tasa de aprendizaje de 0,01, con un factor sigma de 1,5, durante 1.000 épocas, y como función de vecindad se empleó una función gaussiana. La arquitectura de este sistema neuronal corresponde a una red cuadrada. Para su entrenamiento se emplearon los tres conjuntos de descriptores determinados como los más significativos con los tres métodos mencionados anteriormente [21].

Para clasificar las moléculas no adscritas con certeza a alguno de los grupos encontrados se diseñó y construyó un clasificador multiclase, un perceptrón multicapa (MLP) [24]. Se trata de un algoritmo basado en aprendizaje supervisado, conformado por cinco capas de neuronas: una de entrada de 53 neuronas, una de salida de tres neuronas y tres capas ocultas con 60, 40 y 20 neuronas, respectivamente. Para esta red neuronal se utilizó la función sigmoidea como función de activación y el optimizador de costos "adam" con una tasa de aprendizaje de 0,0001. Esta red neuronal también fue programada en Python usando la biblioteca SciKit-learn [19].

## Resultados y discusión

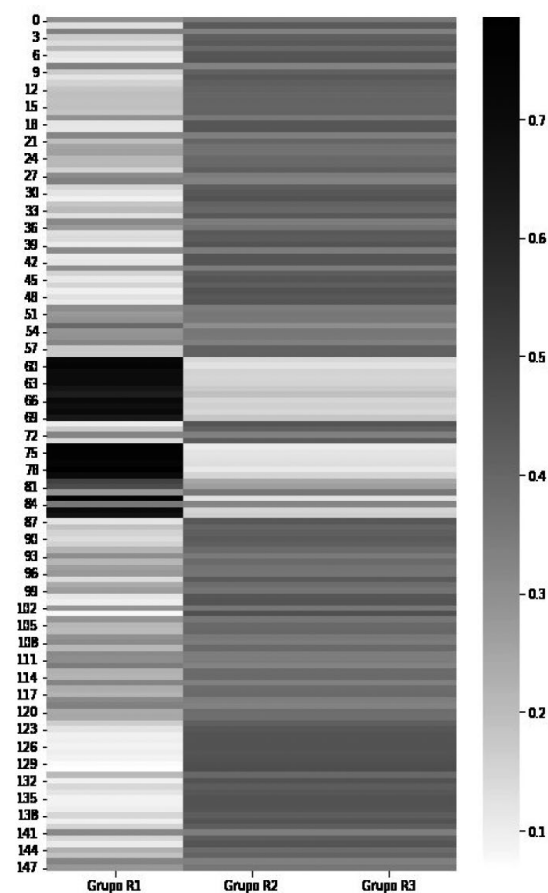
Para consignar la información en nuestra base de datos, se partió de la reportada, para el suborden Polyphaga, en Pherobase [25]. Esta última es una base de datos de libre acceso tanto para consulta como para el registro de datos, por lo cual es común que presente inconsistencias e información errada<sup>3</sup>. En consecuencia, se depuró la información consultando la bibliografía primaria, es decir, un total de 957 artículos reportados en la literatura especializada.

Como anotamos, para caracterizar la estructura química de los semioquímicos empleamos un conjunto redundante de descriptores; por lo tanto, la información que codifican algunas de estas variables puede referirse a un mismo aspecto, ya sea porque fueron propuestos para dar cuenta de una misma característica estructural o bien porque fueron derivados de un mismo descriptor fundamental por autores diferentes. Consideramos que usar un conjunto redundante de variables se justifica en la medida en que no existe el fundamento teórico que permita caracterizar de una manera cuantitativa y unívoca el concepto de estructura química, quizá uno de los más complejos de esta ciencia. La selección de los descriptores más relevantes la hicimos primero mediante ACP y, como mencionamos, la selección de las variables originales que más participan en los componentes principales se realizó por separado para cada una de las seis clases de descriptores moleculares. Este procedimiento lo planteamos con el fin de asegurar que el conjunto final mantuviese lo esencial que pretende codificar cada una de las seis clases de descriptores. Por último, constatamos que no existe mayor correlación entre las variables seleccionadas. Esta metodología nos permitió reducir el conjunto de descriptores; así, pasamos de un conjunto de 200 a uno de 53, que reconocemos como las variables más significativas.

3 Un listado de las inconsistencias y errores detectados se encuentra disponible por solicitud.

Los semioquímicos considerados fueron agrupados mediante el método FCM; como anotamos anteriormente, se observa la existencia de tres grandes grupos. Al comparar los valores de pertenencia de cada molécula a cada grupo notamos que para el grupo R1 hay moléculas con pertenencia superior a 0,85. Para los grupos R2 y R3 las pertenencias más altas apenas superan un valor de 0,45; estos valores indican que hay moléculas con pertenencias similares a estos dos grupos. Escogimos las moléculas con mayor pertenencia a cada grupo para definir su núcleo, de manera que pudiésemos centrar nuestra atención en pequeños conjuntos de moléculas que según FCM deberían ser bastante similares entre sí. Así fue posible identificar un patrón estructural: el núcleo del grupo R1 está formado por hidrocarburos lineales; el núcleo del grupo R2 incluye moléculas aromáticas o con dobles enlaces conjugados y el núcleo del grupo R3 por moléculas de bajo peso molecular que incluye alcoholes, aldehídos, cetonas y ésteres. (Ver Tabla 1).

Vale la pena destacar que las moléculas que conforman cada uno de los tres núcleos propuestos corresponden a metabolitos secundarios que comparten un mismo origen biosintético; por lo tanto, el patrón estructural que se develó con FCM corresponde a la clasificación según las respectivas rutas biosintéticas [26], al menos para las moléculas de alta pertenencia a cada grupo (Véase Figura 1).



**Figura 1.** Representación del grado de pertenencia de cada una de las moléculas a los tres grupos establecidos por el método de lógica difusa FCM. Para el grupo R1, se observa una pertenencia superior a 0,8 para un grupo pequeño de moléculas. Para los otros dos grupos, R2 y R3, las moléculas tienen grados de pertenencia bastante parecidos, aunque bajos; las de mayor pertenencia se diferencian en milésimas.

Una vez hemos reconocido un patrón correspondiente a las rutas biosintéticas, podemos emplearlo como la función de respuesta que requieren las técnicas de BA y BS para hacer la selección de descriptores. Para la técnica de bosques aleatorios, al igual que en el ACP, obtuvimos un conjunto final de 53 descriptores y con Boruta-Shap este conjunto aumentó

a 60 variables<sup>4</sup>. Al comparar los tres conjuntos de variables seleccionadas, encontramos que los métodos de selección dirigida, los cuales consideran el conjunto total de variables, dan lugar a conjuntos de variables óptimas similares a los que hallamos mediante ACP, que realizamos por aparte para cada clase de descriptores. El número de descriptores por tipo seleccionados con cada técnica puede verse en la Tabla 2.

**Tabla 1.** Ejemplo de moléculas pertenecientes al núcleo de cada grupo, los valores de pertenencia y su asociación con su respectiva ruta biosintética [26].

| Semioquímico              | Grupo | Pertenencia | Ruta biosintética |
|---------------------------|-------|-------------|-------------------|
| 9-Pentacoseno             | R1    | 0,899650    | Ácidos grasos     |
| 11-Metiltricosano         |       | 0,886590    |                   |
| Tetracosano               |       | 0,850447    |                   |
| Tricosano                 |       | 0,850364    |                   |
| 9,10-Hexacosadieno        |       | 0,849234    |                   |
| Propanoato de fenilo      | R2    | 0,470915    | Ácido shikímico   |
| Benzoato de metilo        |       | 0,469101    |                   |
| 1,2-Dimetoxibenceno       |       | 0,469077    |                   |
| 2-Fenilacetaldehído       |       | 0,467668    |                   |
| Metoxibenceno             |       | 0,467480    |                   |
| 4-Pentenoato de etilo     | R3    | 0,481187    | Ácido acético     |
| Acetato de (E)-2-hexenilo |       | 0,478890    |                   |
| 4-Pentenoato de metilo    |       | 0,477727    |                   |
| Acetato de (Z)-3-hexenilo |       | 0,476378    |                   |
| Pentanoato de etilo       |       | 0,473211    |                   |

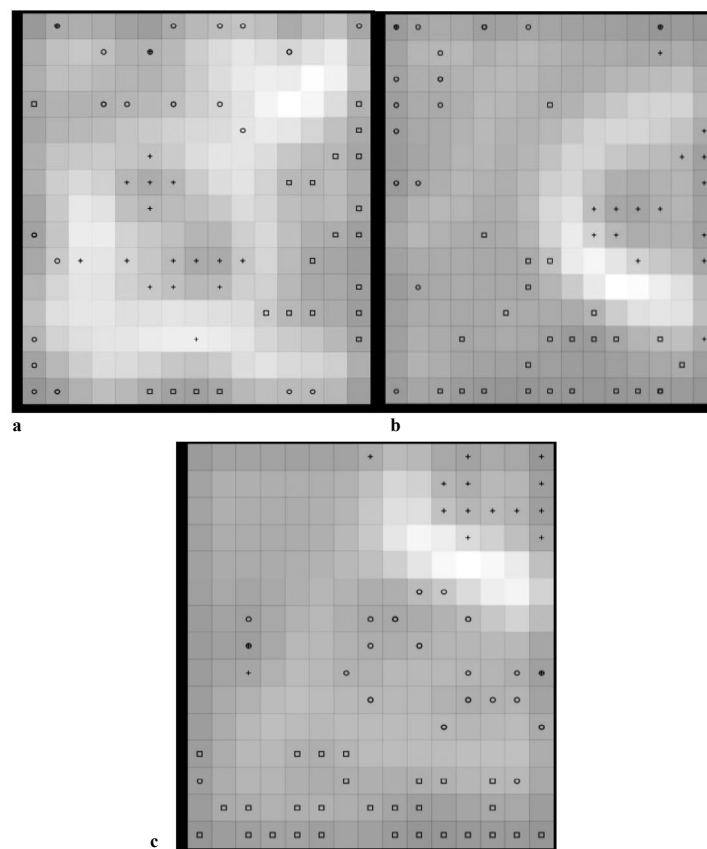
**Tabla 2.** Distribución de descriptores moleculares seleccionados mediante cada metodología por clase de descriptor.

| Técnicas de selección de características |     |    |    |
|--|-----|----|----|
| Clase de descriptores                    | ACP | BA | BS |
| Calculados sobre superficies (3D)        | 11  | 14 | 18 |
| Constitucionales                         | 20  | 12 | 12 |
| Cuánticos                                | 10  | 5  | 8  |
| Grafo-teóricos                           | 10  | 18 | 18 |
| Propiedades fisicoquímicas               | 2   | 4  | 5  |

Por otra parte, al repetir el agrupamiento con el FCM con las variables derivadas de BA y BS encontramos que los núcleos en cada agrupamiento se conservan. Para corroborar estos agrupamientos empleamos mapas autoorganizados de Kohonen (SOM). El entrenamiento y la evaluación de los SOM se llevó a cabo con los 102 compuestos que se encuentran en los núcleos de los grupos derivados del FCM y los tres conjuntos de variables.

<sup>4</sup> Un listado de las variables seleccionadas con cada uno de los métodos se encuentra disponible por solicitud a los autores.

Como resultado obtuvimos tres redes neuronales que logran reproducir la clasificación previamente conseguida según la ruta biosintética, como se muestra en la Figura 2. En ella se observa que el mejor agrupamiento se obtuvo al emplear los descriptores derivados del método de bosques aleatorios, pues separa de mejor manera las distintas moléculas por fronteras de neuronas con baja activación (ver Figura 2), y además presenta el error de cuantización [21] más bajo de las tres: 1,68. A su vez, los SOM alimentados con los descriptores derivados del ACP y BS no logran separar tan claramente algunas moléculas; este es el caso de los subgrupos que se forman para la ruta del ácido shikímico (R2) y la ruta del ácido acético (R3), según se aprecia en las Figuras 2a y 2c; además, el error de cuantización fue mayor: 2,78 y 2,04, respectivamente.



**Figura 2.** Mapas autoorganizados de Kohonen entrenados con los descriptores resultantes de la selección por: a. Análisis de componentes principales, b. Bosques aleatorios y c. Boruta-Shap. Las neuronas que presentan un color más claro tienen una menor activación y constituyen las fronteras entre los grupos: O Ruta del ácido shikímico, + Ruta de los ácidos grasos, + Ruta del ácido acético. Nótese que algunas moléculas pertenecientes a rutas distintas activan una misma neurona.

Si bien fue posible hallar un patrón a partir del método de agrupamiento difuso, y se corroboró la consistencia del mismo con los SOM, aún persisten 46 moléculas que no presentan un grado claro de pertenencia a alguna agrupación o ruta biosintética. Para complementar el modelo de aprendizaje de máquina que estamos presentando, empleamos perceptrones multicapa para clasificar estos 46 semioquímicos. Presentamos dos MLP, uno que usa el conjunto de descriptores determinado por ACP (MLP//ACP), pues fue el punto de partida para establecer el patrón de clasificación, y el otro con los descriptores seleccionados por el método de BA (MLP//BA), ya que estos demostraron ser el conjunto de variables más apropiado para diferenciar las clases en que buscamos clasificar los semioquímicos. Al igual que los SOM, los MLP fueron entrenados con los mismos 102 compuestos bien definidos. Este conjunto se dividió aleatoriamente en una proporción 80-20, en que el 80% de los semioquímicos se empleó para el entrenamiento y el 20% restante se utilizó como conjunto de prueba.

Para ambos modelos se obtuvo una concordancia del 100% entre la respuesta obtenida y la respuesta esperada para el conjunto de entrenamiento. En cuanto al conjunto de prueba, el modelo MLP//ACP presentó una concordancia del 95%, mientras que para el modelo MLP//BA la concordancia fue del 100%. La precisión y la sensibilidad en la clasificación del conjunto de prueba se pueden ver en la Tabla 3. Estos dos modelos se emplearon para establecer las rutas biosintéticas del conjunto de 46 moléculas problema. Dado que se trata de un conjunto pequeño de compuestos a clasificar, pudimos revisar de manera manual la predicción para cada uno de ellos. Así, con los dos modelos 31 de las 46 moléculas son clasificadas de la siguiente manera: 18 en la ruta del ácido shikímico (R2), nueve en la ruta del ácido acético (R3) y cuatro en la ruta de los ácidos grasos (R1). No obstante, de estas 31 moléculas ocho no parecen bien clasificadas; se trata de terpenoides que en principio deberían estar en la ruta R3, pero que se reparten entre la R1 y la R2. Consideramos que esto puede deberse a que la biosíntesis de esta clase de metabolitos involucra múltiples mecanismos que generan una gran diversidad estructural [27] o bien a una deficiente representación de este tipo de compuestos. No obstante, quizá lo más factible es que estas clasificaciones erradas se deban al tamaño de la muestra empleada, en la cual no se cuenta con suficiente representación de todas las posibles categorías.

Por otra parte, quedan 15 moléculas para las cuales se predicen clasificaciones distintas con cada modelo. Al respecto, debe tenerse en cuenta que algunas moléculas se pueden obtener tanto de la ruta de los ácidos grasos como de la ruta del ácido acético; esto podría explicar lo que ocurre con seis de las 15 moléculas (ver Tabla 4, aquellas marcadas con \*). Además, debemos recordar que la ruta del ácido acético también da origen a compuestos aromáticos, lo que podría justificar la clasificación de tres de las nueve restantes (ver Tabla 4, aquellas marcadas con †), resultado que solo se presenta para el MLP//ACP. Las otras seis están bien clasificadas por alguno de los dos modelos.

**Tabla 3.** Precisión y sensibilidad para las clasificaciones obtenidas para el conjunto de prueba con cada modelo.

| Rutas biosintéticas | Precisión |         | Sensibilidad |         |
|---------------------|-----------|---------|--------------|---------|
|                     | MLP//ACP  | MLP//BA | MLP//ACP     | MLP//BA |
| R2                  | 1,00      | 1,00    | 0,86         | 1,00    |
| R3                  | 0,88      | 1,00    | 1,00         | 1,00    |
| R1                  | 1,00      | 1,00    | 1,00         | 1,00    |

En vista de que algunas equivocaciones en la clasificación son más graves que otras, empleamos el coeficiente Kappa de Cohen ponderado [28] para comparar los modelos y evaluar el nivel de acuerdo entre las predicciones y las clasificaciones. Para ello propusimos las siguientes penalidades: tres para las moléculas que presuntamente derivan del ácido shikímico y los perceptrones las clasifican como compuestos derivados de la ruta del ácido acético o de los ácidos grasos y uno para los otros dos casos. Así, Kappa para el perceptrón entrenado con los descriptores derivados de bosques aleatorios (MLP//BA) es de 0,57, mientras que para el modelo entrenado con los descriptores derivados del ACP (MLP//ACP) es de 0,54. En ese sentido, se presenta un mayor acuerdo entre la respuesta esperada y su predicción para el modelo MLP//BA. Si bien el valor  $\kappa = 0,57$  se interpreta como un resultado aceptable para las clasificaciones, ha de tenerse en cuenta que el sistema aquí considerado cuenta con muy pocos registros y, a pesar de esto, la metodología propuesta arroja resultados promisorios.

**Tabla 4.** Moléculas con un grado de pertenencia no definido en FCM y para las cuales se presentan resultados ambivalentes empleando los descriptores derivados del ACP y determinados por bosques aleatorios usando el perceptrón multicapa.

| Molécula   | Ruta biosintética | Predicción con MLP//ACP | Predicción con MLP//BA |
|--|-------------------|-------------------------|------------------------|
| (E)-3,7-Dimetil-2,6-octadien-1-ol                                  | Ac. acético R3    | R3                      | R2                     |
| (E)-2-Nonenal  | Ac. acético R3    | R3                      | R2                     |
| Fenilmetanol   | Ac. shikímico R2  | R3†                     | R2                     |
| 2-Feniletanol  | Ac. shikímico R2  | R3†                     | R2                     |
| 2,6-Dimetil-2,7-octadien-6-ol                                      | Ac. acético R3    | R3                      | R2                     |
| Ácido 2,6-dimetil-5-heptenoico                                     | Ac. acético R3    | R3                      | R2                     |
| 1-Feniletanol  | Ac. shikímico R2  | R3†                     | R2                     |
| (R)-5-Metil-2-(prop-1-en-2-il)-hex-4-en-1-ol                       | Ac. acético R3    | R3                      | R2                     |
| 2,2-dimetil-3-(2-metilpropenil)-ciclopropanecarboxilato de etilo   | Ac. acético R3    | R1*                     | R2                     |
| 4-(2,6,6-Trimetil-1-ciclohexenil)-butan-2-ona                      | Ac. acético R3    | R2                      | R1*                    |
| (R)-(Z)-5-(Dec-1-enil)-oxaciclopentan-2-ona                        | Ac. grasos R1     | R2                      | R1*                    |
| Ftalato de dibutilo  | Ac. shikímico R2  | R2                      | R1                     |
| 2,6,6-Trimetilbicyclo[3.1.1]hept-2-eno                             | Ac. acético R3    | R2                      | R1*                    |
| Anhídrido 2,3-dimetil-7-oxabicyclo[1,2,2]heptano-2,3-dicarboxílico | Ac. acético R3    | R2                      | R1*                    |
| (1S,5S)-4,6,6-Trimetilbicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-ol                 | Ac. acético R3    | R2                      | R1*                    |



## Conclusiones

Conseguimos ensamblar un conjunto de técnicas de aprendizaje de máquina que conforman un modelo para el descubrimiento de patrones sobre conjuntos de compuestos y la posterior clasificación de moléculas problema en función del patrón establecido.

Los descriptores seleccionados a partir del análisis de componentes principales en combinación con la técnica de agrupamiento difuso C-means nos permitió reconocer un patrón entre los semioquímicos estudiados, el cual corresponde a las rutas biosintéticas que dan lugar a estos metabolitos secundarios.

Una vez identificado un patrón, recomendamos la técnica de bosques aleatorios para seleccionar las variables. Finalmente, la combinación de la metodología propuesta con un perceptrón multicapa nos permitió alcanzar una asignación aceptable de las rutas biosintéticas para las moléculas que C-means no clasificó.

Las moléculas cuya clasificación no fue del todo satisfactoria nos muestran la necesidad de ampliar el conjunto de información, para incluir una mayor variabilidad estructural que lleve a conjuntos de entrenamiento más robustos.

## Agradecimientos

Agradecemos al profesor Johan Fabián Galindo del grupo de Química Cuántica y Computacional de la Universidad Nacional de Colombia, por facilitarnos la realización de los cálculos cuánticos.

## Referencias

- [1] N. Bakthavatsalam, "Semiochemicals", en *Ecofriendly Pest Management for Food Security*, Elsevier, 2016, pp. 563-611. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803265-7.00019-1>.
- [2] A. Sharma, R. K. Sandhi, and G. V. P. Reddy, "A Review of Interactions between Insect Biological Control Agents and Semiochemicals", *Insects*, vol. 10, no. 12, p. 439, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/insects10120439>.
- [3] L. David, A. Thakkar, R. Mercado, and O. Engkvist, "Molecular representations in AI-driven drug discovery: a review and practical guide", *Journal of Cheminformatics*, vol. 12, no. 1, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13321-020-00460-5>.
- [4] R. Todeschini, R. Mannhold, H. Kubinyi, V. Consonni, and H. Timmerman, *Handbook of Molecular Descriptors*, John Wiley & Sons, 2008.
- [5] A. Fernández-Torras, A. Comajuncosa-Creus, M. Duran-Frigola, and P. Aloy, "Connecting chemistry and biology through molecular descriptors", *Current Opinion in Chemical Biology*, vol. 66, no. 102090, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2021.09.001>.
- [6] L. Xue and J. Bajorath, "Molecular Descriptors in Chemoinformatics, Computational Combinatorial Chemistry, and Virtual Screening", *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, vol. 3, no. 5, pp. 363-372, 2000. DOI: <https://doi.org/10.2174/1386207003331454>.
- [7] M. Shahlaei, "Descriptor Selection Methods in Quantitative Structure-Activity Relationship Studies: A Review Study", *Chemical Reviews*, vol. 113, no. 10, pp. 8093-8103, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1021/cr3004339>.
- [8] R.-C. Chen, C. Dewi, S.-W. Huang, and R. E. Caraka, "Selecting critical features for data classification based on machine learning methods", *Journal of Big Data*, vol. 7, no. 1, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40537-020-00327-4>.
- [9] T. Cova and A. Pais, "Deep Learning for Deep Chemistry: Optimizing the Prediction of Chemical Patterns", *Frontiers in Chemistry*, vol. 7, pp. 1-22, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00809>.
- [10] Mushliha, A. Bustamam, A. Yanuar, W. Mangunwardoyo, P. Anki, and R. Amalia, "Comparison Accuracy of Multi-Layer Perceptron and DNN in QSAR Classification for Acetylcholinesterase Inhibitors", en *2021 International Conference on Artificial Intelligence and Mechatronics Systems (AIMS)*, Bandung, Indonesia, 28-30 de abril de 2021. IEEE, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1109/aims52415.2021.9466040>.
- [11] M. Hamadache, O. Benkortbi, S. Hanini, and A. Amrane, "Application of multilayer perceptron for prediction of the rat acute toxicity of insecticides", *Energy Procedia*, vol. 139, pp. 37-42, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2017.11.169>.
- [12] P. DuBois, *MySQL Language Reference*, Pearson Education, 2007.
- [13] G. Landrum, "Rdkit documentation", *Release*, vol. 1, no. 1-79, p. 4, 2013.
- [14] G. Zheng, L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hase-gawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, and col., *Gaussian 09*, 2009.
- [15] H. Abdi and L. J. Williams, "Principal component analysis", *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics*, vol. 2, no. 4, pp. 433-459, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1002/wics.101>.
- [16] G. Biau and E. Scornet, "A random forest guided tour", *TEST*, vol. 25, no. 2, pp. 197-227, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11749-016-0481-7>.
- [17] E. Keany, BorutaShap 1.0.16 2021, 2021. Disponible en línea <https://github.com/Ekeany/Boruta-Shap> (Acceso, 20 de noviembre de 2022)
- [18] R Core Team, R: A language and environment for statistical computing, R Foundation for Statistical Computing, 2020, <https://www.R-project.org/>.
- [19] F. Pedregosa, G. Varoquaux, A. Gramfort, V. Michel, B. Thirion, O. Grisel, M. Blondel, P. Prettenhofer, R. Weiss, V. Dubourg, J. Vanderplas, A. Passos, D. Cournapeau, M. Brucher, M. Perrot, and E. Duchesnay, "Scikit-learn: Machine Learning in Python", *Journal of Machine Learning Research*, vol. 12, pp. 2825-2830, 2011.
- [20] J. C. Bezdek, R. Ehrlich, and W. Full, "FCM: The fuzzy c-means clustering algorithm", *Computers & Geosciences*, vol. 10, no. 2-3, pp. 191-203, 1984. DOI: [https://doi.org/10.1016/0098-3004\(84\)90020-7](https://doi.org/10.1016/0098-3004(84)90020-7).
- [21] T. Kohonen, "The self-organizing map", *Proceedings of the IEEE*, vol. 78, no. 9, pp. 1464-1480, 1990. DOI: <https://doi.org/10.1109/5.58325>.
- [22] F. Murtagh and P. Contreras, "Algorithms for hierarchical clustering: an overview", *WIREs Data Mining and Knowledge Discovery*, vol. 2, no. 1, pp. 86-97, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1002/widm.53>.
- [23] G. Vettigli, "MiniSom: minimalistic and NumPy-based implementation of the Self Organizing Map", 2013. Disponible en línea: <https://github.com/JustGlowing/minisom> (Acceso 20 diciembre 2022).
- [24] H. Ramchoun, M. Amine, J. Idrissi, Y. Ghanou, and M. Ettaouil, "Multilayer Perceptron: Architecture Optimization and Training", *International Journal of Interactive Multimedia and Artificial Intelligence*, vol. 4, no. 1, p. 26, 2016. DOI: <https://doi.org/10.9781/ijimai.2016.415>.
- [25] A. M. El-Sayed, "The pherobase: database of insect pheromones and semiochemicals", *HortResearch*, 2019.
- [26] E. D. Morgan, *Biosynthesis in Insects: Advanced Edition*, Royal Society of Chemistry, 2010.
- [27] M. Ashour, M. Wink, and J. Gershenzon, "Biochemistry of Terpenoids: Monoterpenes, Sesquiterpenes and Diterpenes", en *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism*, Oxford, UK: Wiley-Blackwell, pp. 258-303. DOI: <https://doi.org/10.1002/9781444320503.ch5>.
- [28] M. L. McHugh, "Interrater reliability: the kappa statistic", *Biochemia Medica*, vol. 22, no. 3, pp. 276-282, 2012. DOI: <https://doi.org/10.11613/bm.2012.031>.

### Citación de Artículo:

L. S. Valencia-Colman & É. E. Daza C, "Reconocimiento de rutas biosintéticas para semioquímicos mediante técnicas de aprendizaje de máquina", *Rev. Colomb. Quim.*, vol. 51, no. 2, pp. 35-40, 2022. DOI: <https://doi.org/doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v51n2.101546>



## The effect of the acid pre-treatment temperature of natural diatomaceous earth on the Si/Al ratio of ZSM-5 zeolite

### Abstract

Bolivian diatomaceous earth is a potentially lower cost silica source than conventional high purity reagents used in zeolite synthesis. Due to its complex composition, it is necessary to pre-treat it with sulfuric acid in order to reduce impurities and regulate the aluminum content. In the present work several experiments were carried out with natural Bolivian diatomaceous earth in the pre-treatment stage. In order to determine the effect on the final Si/Al ratio, the temperature of the acid pre-treatment was varied between 50 to 155 °C. The results show that the Si/Al ratio can be modulated from 6.2 up to 38.1. These treated diatomaceous earth samples were used to synthesise ZSM-5 zeolite. The obtained ZSM-5 zeolites have a Si/Al ratio in the following range: 9.6 to 40.2. XRD, NH<sub>3</sub>-TPD and Nitrogen Physisorption techniques were used to characterise the properties of the obtained zeolites. The degree of crystallisation and the specific surface area are directly related to the Si/Al ratio, resulting in high values at high Si/Al ratios. The acid sites are composed of strong Brønsted acid sites and, strong and weak Lewis acid sites. For the zeolite with a low Si/Al ratio a high total acidity was found (>0.51 molNH<sub>3</sub>/Kgzeolite), while at high Si/Al ratios the total acidity is reduced (<0.38 molNH<sub>3</sub>/Kg<sub>zeolite</sub>).

**Keywords:** Diatomaceous earth; Si/Al ratio; acid pre-treatment temperature; ZSM-5 zeolite.

## El efecto de la temperatura del pre-tratamiento ácido de tierra de diatomeas natural en la relación Si/Al de zeolitas ZSM-5

### Resumen

La tierra de diatomea boliviana es una fuente de silicio potencialmente más económica en comparación a los reactivos de alta pureza comúnmente utilizados para la síntesis de zeolitas. Dada su composición compleja es necesario realizarle un pretratamiento ácido con el fin de reducir las impurezas y regular el contenido de aluminio. En este artículo se realizaron múltiples experimentos durante la etapa de pretratamiento ácido. La temperatura del pretratamiento ácido fue modificada en un rango entre 50 y 155 °C esto con el fin de determinar su efecto en la relación Si/Al final. Los resultados mostraron que la relación Si/Al puede ser modulada en un rango entre 6,2 y 38,1. Posteriormente, se obtuvieron zeolitas a partir de la tierra de diatomea modificada. Las zeolitas obtenidas presentaron una relación Si/Al entre 9,6 y 40,2. Se aplicaron distintas técnicas de caracterización para la determinación de las propiedades. El grado de cristalinidad y el área superficial específica están directamente relacionadas con la relación Si/Al. Los sitios ácidos están conformados por ácidos fuertes de tipo Brønsted y ácidos fuertes y débiles de tipo Lewis. Para la zeolita con menor relación Si/Al se determinó una elevada acidez total (>0,51 molNH<sub>3</sub>/Kg<sub>zeolita</sub>), mientras que para la zeolita con mayor relación Si/Al la acidez total se redujo considerablemente (<0,38 molNH<sub>3</sub>/Kg<sub>zeolita</sub>).

**Palabras clave:** Tierra de diatomeas; relación Si/Al; temperatura de pre-tratamiento ácido; zeolita ZSM-5.

## O efeito da temperatura de pré-tratamento ácido da terra de diatomáceas natural na relação Si/Al da zeólita ZSM-5

### Resumo

A terra diatomácea boliviana é uma fonte potencialmente mais barata de silício em comparação com os reagentes de alta pureza comumente usados para a síntese de zeólitas. Dada a sua composição complexa, é necessário realizar um pré-tratamento ácido para reduzir as impurezas e regular o teor de alumínio. No presente trabalho, vários experimentos foram realizados durante a etapa de pré-tratamento ácido. A temperatura do pré-tratamento ácido foi modificada em uma faixa entre 50 e 155 °C para determinar seu efeito na relação Si/Al final. Os resultados mostram que a razão Si/Al pode ser modulada em uma faixa entre 6,2 e 38,1. Posteriormente, as zeólitas foram obtidas a partir de terra diatomácea modificada. As zeólitas obtidas possuem uma razão Si/Al entre 9,6 e 40,2. Diferentes técnicas de caracterização foram aplicadas para determinar as propriedades. O grau de cristalinidade e a área superficial específica estão diretamente relacionados com a razão Si/Al. Os sítios ácidos são compostos por ácidos fortes do tipo Brønsted e ácidos fortes e fracos do tipo Lewis. Para a zeólita com menor relação Si/Al, foi determinada uma alta acidez total (>0,51 molNH<sub>3</sub>/Kg<sub>zeólita</sub>), enquanto para a zeólita com maior relação Si/Al, a acidez total foi consideravelmente reduzida (<0,38 molNH<sub>3</sub>/Kg<sub>zeólita</sub>).

**Palavras-chave:** Terra de diatomáceas; razão Si/Al; temperatura de pré-tratamento ácido; ZSM-5 zeólito.



## Introduction

The ZSM-5 zeolite (Zeolite Socony Mobile 5) is a molecular sieve with a well-defined crystalline structure. It has a three-dimensional framework with micropores that give a high specific surface area. Furthermore, ZSM-5 has an acid site distribution divided between Brønsted and Lewis types [1], [2]. These properties in addition to high thermal stability make ZSM-5 a material with a wide range of applications such as ion exchanger, catalyst, membrane separator, and gas adsorber [3]. Also, it is important to remark that most of these properties are defined by their Si/Al ratio and by its chemical composition [4]. Nevertheless, in catalytic processes, some of the properties have to be partially sacrificed to enhance the others. Accordingly, to avoid extra costs, unnecessary treatments and other similar processes, a well-balanced catalyst is commonly the best alternative.

The conventional ZSM-5 zeolite synthesis method involves a gel formation obtained from different chemical reagents such as sodium silicate, aluminum sulfate, and tetrapropylammonium hydroxide (TPA-OH) [5],[6]. These chemical reagents are expensive, so it is convenient to use lower cost materials such as diatomaceous earth [7]-[11]. Due the importance of the Si/Al ratio in zeolite's properties, there are many studies in relation to modulating the Si/Al ratio of a nonmetallic mineral raw material such as kaolin and diatomaceous earth [7]-[9]. Moreover, there are reports regarding the effect of synthesis parameters on the final Si/Al ratio that indicate that every raw material has a different behavior in relation to the acid pre-treatment and synthesis parameters [12]-[14]. As a result, it is necessary to identify the optimal synthesis conditions for regulating the Si/Al ratio according to the final zeolite application. Thus, it would be a more economical process to treat the diatomaceous earth with mineral acids than to regulate the Si/Al ratio by adding high purity reagents, such as sodium silicate or sodium aluminate. In addition, it is important to consider that Bolivia has natural reserves of diatomaceous earth that are not being used for any application and, to the best of our knowledge, there are no reports regarding the effect of synthesis parameters such as the temperature of the acid pre-treatment on the final properties of the ZSM-5 zeolites [15]. Therefore, in the present research work, we report the effect of the temperature during the acid treatment of Bolivian diatomaceous earth and the synthesis of ZSM-5 zeolites obtained from them. Also, the characterization of properties was carried out for every obtained zeolite, allowing to determine the present crystalline phase, degree of crystallinity, specific surface area, micropore volume and acid site concentration and distribution.

## Materials and Methods

### Acid pre-treatment of diatomaceous earth

The diatomaceous earth used in the present work was collected from the locality of Bella Vista in the geological formation of Murmuntani in Potosí, Bolivia at 4,067 m.a.s.l. The diatomaceous earth was pre-treated with a 6 M sulfuric acid solution in a proportion of 1:9 (solid:sample solution) in a hydrothermal reactor for 24 h at 4 different temperatures (50, 85, 120 and 150 °C). Subsequently, the hydrothermal reactor was quenched and the product filtered and washed with distilled water until pH was close to 7. The obtained solid was separated and dried overnight at 100 °C.

### Synthesis of the ZSM-5 zeolite

Four zeolites were synthesised from acid pre-treated diatomaceous earth with different Si/Al ratios. The four zeolites were prepared from the same mixture composition: Mixing the acid pre-treated diatomaceous earth with

distilled water, sodium hydroxide (Merck pure grade 99%) and TPA-OH (Merck reactive 1M solution) as a structural directional agent (SDA). The molar ratio in the synthesis mixture was:  $\text{Na}_2\text{O}/\text{SiO}_2 = 0.18$ ;  $\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3 = X$ ;  $\text{SiO}_2/\text{TPA-OH} = 3.5$ ;  $\text{H}_2\text{O}/\text{SiO}_2 = 30$ . The synthesis mixture was aged under constant stirring at room temperature and then the pH of the mixture was adjusted to 11 with a 1 M solution of hydrochloric acid. Successive to the aging time, the synthesis mixture was hydrothermally treated in a Teflon stainless steel autoclave at 170 °C. Subsequently, the hydrothermal reactor was quenched and the product was washed with distilled water until the pH reached a value close to 7. Finally, the obtained solid was dried at 100 °C overnight and calcinated at 550 °C for 8 h. The aging time and synthesis time were different for each Si/Al ratio in order to improve the degree of crystallinity of the final zeolite (see Table 1).

**Table 1.** Aging time and synthesis time of the obtained ZSM-5 zeolites.

| Precursor Si/Al Ratio | ZSM-5 Zeolite Si/Al ratio | Aging Time [h] | Synthesis time [h] |
|-----------------------|---------------------------|----------------|--------------------|
| 38.1 ± 2.7            | 40.2 ± 1.0                | 24             | 12                 |
| 31.3 ± 1.8            | 37.5 ± 1.7                | 36             | 24                 |
| 9.6 ± 1.9             | 12.6 ± 1.0                | 36             | 32                 |

### NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ion exchange of ZSM-5 zeolite

In order to obtain the protonated form of the zeolite (H-ZSM-5), the ZSM-5 zeolite was mixed with ammonium nitrate 1 M in a reflux system at 80 °C for 12 h. The zeolite to ammonium nitrate ratio was 1:12 (in weight terms). Subsequently, the solid was separated by filtering and washed with distilled water. Finally, the zeolite was dried at 100 °C overnight and calcinated for 8 h at 550 °C. This procedure was carried out twice for each sample.

## Characterisation techniques

The Si/Al ratio of the acid pre-treated diatomaceous earth and the H-ZSM-5 zeolite was quantified by the X-ray fluorescence (XRF) technique. The readings were carried out with a Thermo Scientific Niton XL3t Ultra spectrometer. The Si/Al ratio was quantified using a calibration curve developed from samples prepared with different concentrations of pure silicon oxide and pure alumina. The statistical evaluation (C.I. 95%) was undertaken using the "IBM SPSS statistics 22" software.

The identification of crystalline phases and the ascertainment of the degree of crystallinity of the samples were determined by means of the X-ray diffraction (XRD) technique. The readings were carried out on a PANalytical X-ray Diffractometer with an X-ray copper tube ( $K\alpha = 1.54 \text{ \AA}$ ) and an Xcelerator detector. The operational conditions applied to the X-ray tube were 40 mA and 40 kV. The analysis range was from 5 to 60 °, 2 $\theta$  Bragg degrees. The analyses were carried out in triplicate.

The degree of crystallinity (Eq. 1) [7] was assessed by calculating the area under the principal peaks in the 2 $\theta$  region between 22.0 to 25.0 ° and comparing it with a high crystalline synthetic zeolite.

$$\%Crystallinity = \frac{\sum Area\ under\ peaks\ sample}{\sum Area\ under\ peaks\ reference} \quad Eq. 1$$

The identification and quantification of the acid sites were carried out by the Ammonia Temperature Programmed Desorption (NH<sub>3</sub>-TPD) technique. The readings were carried out on a ChemBET TPR/TPD Quantachrom Analysis equipment. A known weight for zeolite was placed in the analysis cell. Then the zeolite was degassed at 250 °C for 30 min and activated at 550 °C for 1 h under a flow of He (15 mL/min). Subsequently, a flow of 15 mL/min (5% NH<sub>3</sub>/He) was passed through the cell and ammonia adsorption was carried out for 1 h at 100 °C. Finally, the gas flow was changed to He

(15 mL/min) and heated to 850 °C at 9 °C/min. The signals were registered with a TCD detector. For NH<sub>3</sub> quantification previous analysis were carried out to determine a calibration factor between the signal area detected by the TCD and the previous known NH<sub>3</sub> volume. Due the destructive behaviour of the technique, the analysis was carried out only once per sample.

Nitrogen Physisorption was carried out on a ChemBET TPR/TPD Quantachrom Analysis equipment. The pre-treatment of the samples was the same as for the NH<sub>3</sub>-TPD analysis. The weighted sample was placed in the analysis cell and different proportions of N<sub>2</sub>/He (P/P<sub>0</sub> = 0.10 – 0.35) was used according to the BET method. (The analyses were carried out in triplicate).

To quantify the specific surface area, the BET method was applied with the sorption data. The T-Plot method was applied to quantify the micropore volume, micropore area, external area and degree of crystallinity (Eq. 2). The T-Plot method is applied in samples that present microporosity. To estimate the thickness of the pore we used the zeolite equation (Eq. 3) as the literature suggests [16].

$$\%Crystallinity = 100 * \frac{V_{micropore\ sample}}{V_{micropore\ reference}} \quad \text{Eq. 2}$$

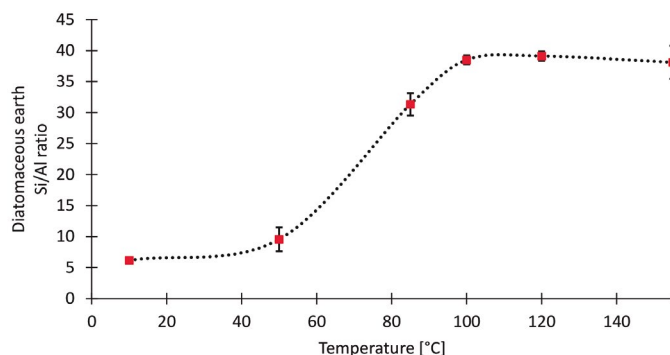
$$X = \left[ \frac{13.9900}{\left( 0.0340 - \log \left( \frac{P}{P_0} \right) \right)} \right]^{\frac{1}{2}} \quad \text{Eq. 3}$$

Finally, the morphology and particle size were performed by an external laboratory as an analysis service.

## Results and Discussion

### Diatomaceous earth pre-treatment: The effect of temperature on the Si/Al ratio

It is well known that diatomaceous earth is often pre-treated with mineral acid in order to reduce the concentration of undesired metallic species (e.g., alkali metals) and regulate the Si/Al ratio [13], [17]. To achieve this, the diatomaceous earth was mixed up with 6M sulfuric acid at five different temperatures for 24 h. The applied temperature during the acid pre-treatment caused significant changes in the Si/Al ratio (see Figure 1) in comparison to the non-treated diatomaceous earth (Si/Al=6.18).



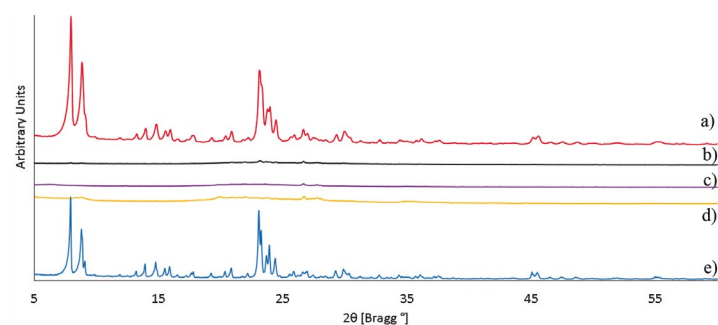
**Figure 1.** Effect of the pre-treatment temperature during the acid pre-treatment of diatomaceous earth on the Si/Al ratio.

The Si/Al ratio of diatomaceous earth can be modulated from Si/Al=6.2 (natural raw material) up to Si/Al=38.1 by controlling the acid pre-treatment

temperature (See Supplementary information section). The highest Si/Al ratio was achieved at 120 °C. At higher temperatures no significant changes were observed in the Si/Al ratio. At lower temperatures the Si/Al ratio decreases because aluminum solubility increases at higher temperatures [13], [17].

### Synthesis of ZSM-5 zeolite from acid pre-treated diatomaceous earth

The acid pre-treated diatomaceous earth samples with different Si/Al ratios were used as precursors to obtain ZSM-5 zeolite. The diffractograms shown in Figure 2 indicate that only the precursor with Si/Al=38.1 (highest ratio) has achieved a ZSM-5 zeolite structure after synthesis conditions. The remainder of the diatomaceous earth precursors do not present any clear crystalline structure after synthesis. The latter may be attributed to the different contents of aluminum in each precursor, since the greater aluminum content reduces the rate of crystal growth because aluminum intrusion is a disruptive process that requires more energy to develop [18].



**Figure 2.** XRD diffractograms of zeolite synthesis from diatomaceous earth precursors: a) Si/Al=38.1, b) Si/Al=31.3, c) Si/Al=9.6, d) pure diatomaceous earth (Si/Al=6.2) and e) reference ZSM-5 zeolite obtained from pure reagents (Si/Al=43.8).

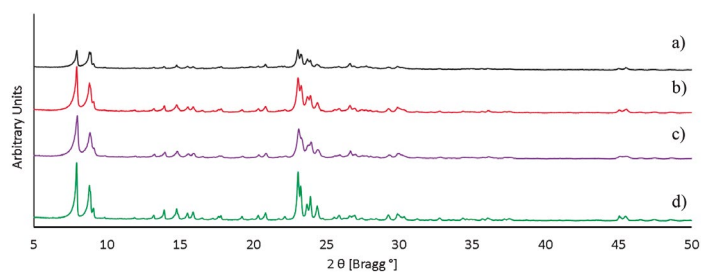
The low intensity and poor definition of the signals observed in Figure 2, suggest that it is necessary to improve aging and synthesis conditions. During aging time, ZSM-5 nuclei are formed and the process is affected by the presence of aluminum. At this point, aluminum interacts with [OH<sup>-</sup>] anions reducing the interaction between silica and [OH<sup>-</sup>]. These interactions lead to delay the Si-O-Si nuclei formation [18], [19]. On the other hand, the synthesis time is also affected by the presence of aluminum. Due to the disruptive nature of aluminum, crystal development requires more energy. As a consequence, more aluminum content will cause crystal growth to proceed at a slower rate [18] - [20]. So, to improve the degree of crystallisation of the ZSM-5 zeolite the aging time and the synthesis time were modified for each acid pre-treated diatomaceous earth sample.

### Optimisation of ZSM-5 zeolite synthesis based on diatomaceous earth with different Si/Al ratios

After improving the “aging and synthesis time” (see Table 2), a typical ZSM-5 zeolite diffractogram was introduced from all the acid pre-treated diatomaceous earth samples, as can be seen in Figure 3.

A direct ratio can be noted between the aluminum content and the degree of crystallinity in the final ZSM-5, in accord with Jacobs et al. [21], i.e., the lower the amount of aluminum species the higher degree of crystallinity (see Table 3). Thus, ZSM-5 zeolites were obtained from acid pre-treated diatomaceous earth samples with different Si/Al ratios. The zeolite with the lowest ratio (Si/Al=12.6) was obtained with a 60% of amorphous phase and a 40.0% of degree of crystallinity, being a predominantly amorphous material. And the ZSM-5 with the highest ratio (Si/Al=40.2) was obtained with a 96.6% degree of crystallinity and 3.4% of amorphous phase, being

a predominantly crystalline material. The synthesis of the ZSM-5 zeolites with different crystallinity and amorphous material percentages was assessed by modulating the “aging time and synthesis time”.



**Figure 3.** XRD diffractograms after improving the aging and synthesis time of ZSM-5 zeolite using: a) Si/Al=9.6 b) Si/Al=31.3 c) Si/Al=40.2 and d) pure reagents as a reference Si/Al=43.8.

**Table 2.** Average Si/Al ratio obtained from diatomaceous earth after acid treatment at different temperatures.

| Temperature [°C] | Si/Al ratio |
|------------------|-------------|
| 155              | 38.1±2.7    |
| 120              | 39.1±0.8    |
| 100              | 38.5±0.7    |
| 85               | 31.3±1.8    |
| 50               | 9.6±1.9     |
| No treatment     | 6.2±0.3     |

**Table 3.** Summary synthesis of the obtained ZSM-5 zeolites from acid pre-treated diatomaceous earth precursors.

| Time [h] |           | Diatomaceous Earth Si/Al ratio | Final ZSM-5 zeolite        |                             |
|----------|-----------|--------------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| Aging    | Synthesis | Precursors Si/Al Ratio         | ZSM-5 Zeolites Si/Al Ratio | Degree of Crystallinity [%] |
| 72       | 120       | 43.8 (Reference)               | 43.8                       | 100.0 ± 8.6                 |
| 24       | 12        | 38.1 ± 2.7                     | 40.2 ± 1.0                 | 96.6 ± 10.2                 |
| 72       | 24        | 31.3 ± 1.8                     | 37.5 ± 1.7                 | 83.7 ± 7.8                  |
| 72       | 32        | 9.6 ± 1.9                      | 12.6 ± 1.0                 | 45.0 ± 3.4                  |

## Nitrogen Physisorption

### Sorption Isotherm

The obtained zeolites have different nitrogen adsorption capacities. A direct correlation can be appreciated between the adsorbed volume and the Si/Al ratio: A high Si/Al ratio leads to an increase in the adsorption capacity of the zeolite (See Table 4). This behaviour can be explained by pore collapse due to the intrusion of aluminum in the crystalline structure. A high aluminum content leads to structure instability causing the structure to collapse within itself [18]-[20].

**Table 4.** Nitrogen adsorption from sorption experiment for ZSM-5 zeolites with different Si/Al ratios.

| ZSM-5 Zeolite Si/Al ratio → | 43.8                               | 40.2                               | 37.5                               | 12.6                               |
|-----------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| Relative Pressure           | Adsorbed Vol. [cm <sup>3</sup> /g] | Adsorbed Vol. [cm <sup>3</sup> /g] | Adsorbed Vol. [cm <sup>3</sup> /g] | Adsorbed Vol. [cm <sup>3</sup> /g] |
| 0.10                        | 105.7                              | 124.6                              | 87.7                               | 47.1                               |
| 0.15                        | 107.9                              | 118.9                              | 112.9                              | 55.2                               |
| 0.20                        | 110.6                              | 127.7                              | 102.5                              | 55.7                               |
| 0.25                        | 112.1                              | 124.5                              | 108.1                              | 45.6                               |
| 0.30                        | 114.6                              | 126.2                              | 98.9                               | 71.5                               |
| 0.35                        | 114.1                              | 128.3                              | 95.8                               | 58.0                               |

### Bruner Emmet Teller (BET)

Based on Table 5 it can be observed that the specific surface area is dependent on the Si/Al ratio: Low aluminum content leads to an increase in the specific surface area and, high aluminum content has the opposite effect in concordance with the literature [21]. This behaviour can be explained by the disruptive effect of the aluminum on the ZSM-5 crystalline structure. A high aluminum content leads to a reduction of the interaction between SiO<sub>2</sub> species with [OH<sup>-</sup>] and, in consequence the degree of crystallinity decreases gradually. Accordingly, the specific surface area also decreases [18].

**Table 5.** BET specific surface area, determination of coefficient and C<sub>BET</sub> constant values.

| ZSM-5 zeolite Si/Al ratio | Specific Surface Area by BET [m <sup>2</sup> /g] | Determination of Coefficient in the BET range (P/P <sub>0</sub> =0.1-0.35) | CBET Constant |
|---------------------------|--|--|---------------|
| 43.8 (Reference)          | 290.0 ± 17.9                                     | 0.99   | -29.8         |
| 40.2 ± 1.0                | 300.0 ± 14.8                                     | 0.99   | -29.0         |
| 37.5 ± 1.7                | 235.1 ± 29.2                                     | 0.96   | -20.6         |
| 12.6 ± 1.0                | 229.0 ± 23.7                                     | 0.99   | 38.0          |

### T-Plot method

On Table 6, it can be appreciated that the micropore properties (volume and internal surface area) and the external surface area are related to the Si/Al ratio as were the BET results. The micropore volume is related to the crystallinity of the zeolite: If the crystalline structure of the zeolite is conformed in a perfect system, the micropore volume reaches a maximum value, because in a perfect system there is no loss in the volume of the pores. In our case, the micropore volume of the reference zeolite is 0.135 cm<sup>3</sup>/g in concordance with the reports of Sayari et al. and Solcová et al. [22]. Furthermore, at high Si/Al ratios (38.1) the micropore volume is almost constant, while at low Si/Al ratios (9.6) it considerably reduces. This behaviour is a consequence of losses of crystallinity between Si/Al= 38.1 and Si/Al=9.6 [18]. Because the internal surface area and the micropore area are directly related to the micropore volume these results present the same behaviour in relation to the Si/Al ratio. Both cases have the same explanation. The intrusion of aluminum species in the synthesis mixture leads to a decrease in crystallinity, reducing the micropore properties including the micropore volume and surface areas.

**Table 6.** T-plot method results of the obtained zeolites.

| ZSM-5 Zeolite Si/Al Ratio | Micropore Volume [cm <sup>3</sup> /g] | Micropore Area [m <sup>2</sup> /g] | External Surface Area [m <sup>2</sup> /g] | % of Crystallinity | Determination of Coefficient |
|---------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|---|--------------------|------------------------------|
| 43.8                      | 0.14                                  | 268                                | 21  | 100.0              | 0.96                         |
| 38.1 ± 1.0                | 0.14                                  | 276                                | 23  | 100.0              | 0.98                         |
| 31.3 ± 1.7                | 0.08                                  | 190                                | 44  | 58.5               | 0.52                         |
| 9.6 ± 1.0                 | 0.05                                  | 206                                | 22  | 35.0               | 0.65                         |

## Scanning Electron Microscopy (SEM)

### Particle Size and Morphology

Particle size and morphology were studied by way of SEM as can be appreciated in figure 4. The calibration bar presented in the lower part of figure 4, was used to measure the average particle size for each zeolite. The summary of the particle sizes is shown on Table 7.

**Table 7.** Average particle size for each ZSM-5 zeolite synthesised from diatomaceous earth.

| ZSM-5 Zeolite Si/Al ratio | Average Particle Size [μm] |
|---------------------------|----------------------------|
| 40.2                      | 2.1 ± 0.3                  |
| 37.5                      | 2.1 ± 0.4                  |
| 12.6                      | 2.5 ± 0.4                  |

Typical rounded shape crystals were obtained from the synthesis of ZSM-5 zeolites from diatomite (figure 5 A, B and C). This shape was expected according to references from researchers who also worked with diatomaceous earth under similar conditions [7]. Also, in figure 4 D it can be appreciated that the round particles are formed by the union of different orthorhombic crystals that develop as twin crystals side by side with a single crystal shape similar to the results found by Sanhueza et al [9]. It is possible to observe laminar residues of diatomaceous earth (shown in figure 4 B and C inside the circles) mainly in the samples with a lower Si/Al ratio. These residues evidence that not all the treated diatomite was transformed into ZSM-5 zeolite.

### Ammonia temperature programmed desorption (NH<sub>3</sub>-TPD)

Figure 5 shows the experimental NH<sub>3</sub>-TPD profiles for each zeolite. The profiles have a typical form of ZSM-5 zeolite from NH<sub>3</sub>-TPD-experiments [23], [24]. Four deconvoluted signals were assigned from the NH<sub>3</sub>-TPD profile for the ZSM-5 zeolite with Si/Al=12.6. For zeolites with Si/Al=40.2 and Si/Al=37.5 only three deconvoluted signals were observed. The first deconvoluted signal has a maximum temperature between 140 to 200 °C. The second deconvoluted signal has a maximum temperature between 220 to 370 °C. The third deconvoluted signal has a maximum temperature between 600 to 750 °C. And the fourth signal has a maximum temperature around 850 °C. The first signal can be attributed to physically desorbed NH<sub>3</sub>, where the NH<sub>3</sub> comes from NH<sub>4</sub><sup>+</sup>nNH<sub>3</sub> species adsorbed on the zeolite surface [23], [25]. The second signal is partially attributed to physically desorbed NH<sub>3</sub> and to interactions between NH<sub>3</sub> and weak Lewis acid sites [23], [26]. Lewis acid sites are generated by the presence of cations in the crystalline structure for charge compensation [26], [27]. The third signal is due to strong Brönsted acid sites (BAS) [23]. Finally, the fourth signal is due to strong Lewis acid sites (LAS) [28]. LAS are generated by the presence of extra framework aluminum species (EFAL).

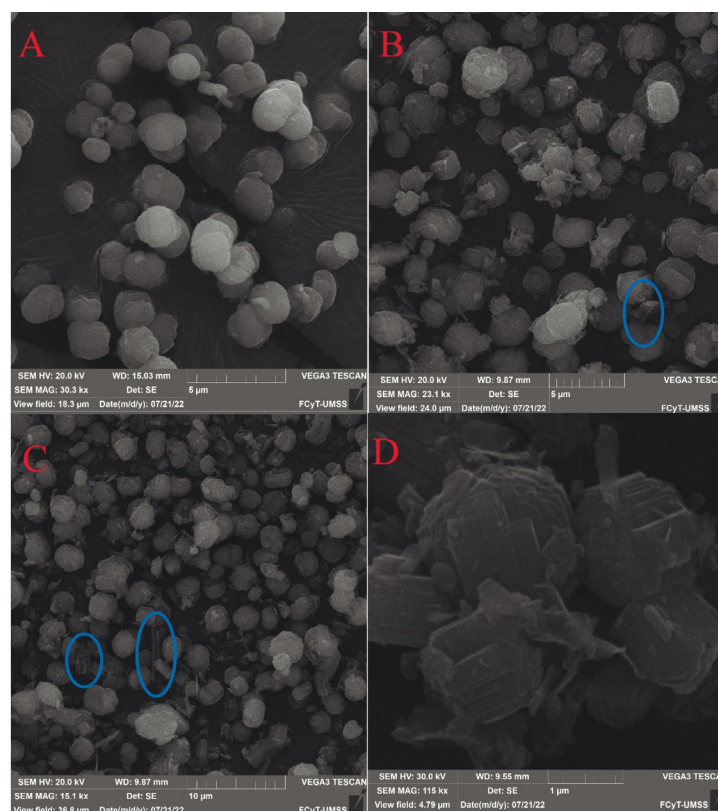
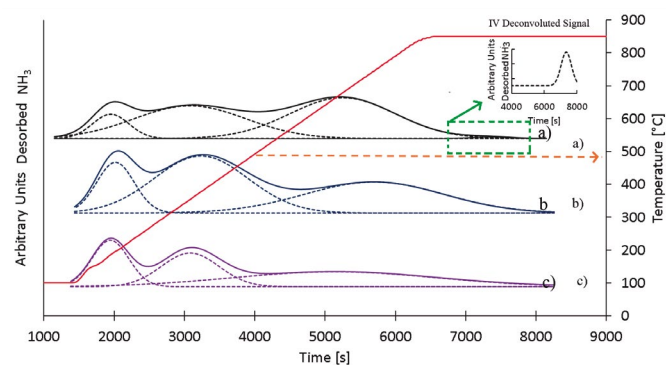

**Figure 4.** SEM micrographs of ZSM-5 zeolites with: A) Si/Al=40.2 B) Si/Al=37.5 C) Si/Al=12.6 and D) Additional zoom on the surface of ZSM-5 with Si/Al=40.2.

**Figure 5.** NH<sub>3</sub>-TPD profiles for: a) ZSM-5 with Si/Al=12.6 b) ZSM-5 with Si/Al=37.5 and c) ZSM-5 with Si/Al=40.2.

Table 8 presents the behaviour of the different acid sites in relation to the Si/Al ratio of the ZSM-5 zeolites. Weak Lewis acid sites are dependent on the acid pre-treatment temperature since high temperatures permit extracting more interfering species, such as metallic species [25], [29] so less weak Lewis acid sites are expected. This is evident with the acid pre-treated diatomaceous earth at 120 °C (Si/Al=40.2) which reduces the quantity of Lewis acid sites by half as compared to the acid pre-treated diatomaceous earth treated at 85 °C (Si/Al=37.5), see Table 8.

The BAS are related to the content of aluminum in the structure of the zeolite. The more aluminum the structure has, the more it needs cations to compensate the generated negative charge. These cations could come from undesired species, such as metallic species (weak Lewis acid sites) or by way of ion exchange. The studied zeolites were in a protonated form (H-ZSM-5), so the final aluminum concentration will determine the BAS concentration [23].

The LAS are related to the content of EFAL in the zeolite. At elevated aluminum content EFAL are formed during the synthesis process due the disruptive nature of aluminum intrusion in the crystalline structure. In the zeolite with Si/Al=12.6 the concentration of aluminum is too high, so part of the Al forms EFAL because the ZSM-5 zeolite undergoes a dealumination process in order to stabilise itself [30]. As a consequence, the aluminum forms penta-coordinated species (EFAL) and remains as part of the aggregate [31]. This phenomenon explains the existence of the fourth signal in the ZSM-5 zeolite Si/Al=12.63 ratio [18], [23], [31].

**Table 8.** Quantification of acid sites type by NH<sub>3</sub>-TPD.

|  | ZSM-5<br>Zeolite Si/Al<br>ratio | 40.2                                | 37.5                                | 12.6                                |
|--|---------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| Type of<br>interaction   | Deconvoluted<br>Signal          | Mole NH <sub>3</sub> /<br>Kgzeolite | Mole NH <sub>3</sub> /<br>Kgzeolite | Mole NH <sub>3</sub> /<br>Kgzeolite |
| NH <sub>3</sub><br>physisorption<br>(n=2)                              | I                               | 0.22±0.03                           | 0.21±0.03                           | 0.10±0.03                           |
| NH <sub>3</sub><br>physisorption<br>(n=1) and weak<br>Lewis acid sites | II                              | 0.24±0.03                           | 0.58±0.03                           | 0.43±0.03                           |
| Strong Brønsted<br>acid sites (BAS)                                    | III                             | 0.38±0.03                           | 0.47±0.03                           | 0.51±0.03                           |
| Strong Lewis<br>acid sites (LAS)                                       | IV                              | -                                   | -                                   | *                                   |
| Total acidity  | III+IV                          | 0.38±0.03                           | 0.47±0.03                           | 0.51±0.03                           |

\* Detectable signal but not quantifiable.

## Conclusions

It is possible to modulate the Si/Al ratio of natural Bolivian diatomaceous earth by changing the temperature of the acid pre-treatment. The pre-treated diatomaceous earth was used to synthesise three ZSM-5 zeolites with different Si/Al ratios in the range 12.6 – 40.2. The obtained ZSM-5 zeolites have different physicochemical properties. The degree of crystallisation, micropore volume, internal surface area and external surface area are dependent on the Si/Al ratio. The results show that high aluminum content leads to a loss of crystallinity, possibly due to pore collapse. The

concentration and distribution of acid sites (BAS and LAS) are dependent on the zeolite's Si/Al ratio. High total acidity amounts (>0.52 molNH<sub>3</sub>/Kg<sub>zeolite</sub>) are found at low Si/Al ratios and are composed of strong Brønsted and strong Lewis acid sites. At high Si/Al ratios a reduction of the total acidity amount is reported (<0.38 molNH<sub>3</sub>/Kg<sub>zeolite</sub>). Further investigation is needed to develop the potential applications of the obtained zeolites in areas such as heterogeneous catalysis, gas adsorption, etcetera.

## Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the financial support from The World Academy Science (TWAS) and Swedish International Development Cooperation (SIDA). As well as to Ing. Mario Blanco for providing diatomaceous earth samples and facilitating the use of XRD equipment.

## References

- [1] M. Moshoeshoe, M. Silas Nadiye-Tabbiruka, and V. Obuseng, "A review of the chemistry, structure, properties and applications of zeolites," *Am. J. Mater. Sci.*, vol. 2017, no. 5, pp. 196–221, 2017, <http://article.sapub.org/10.5923.j.materials.20170705.12.html>
- [2] Jose María Martínez Blanes, Tesis doctoral, *Obtención de zeolitas utilizando líquidos iónicos como agentes directores de estructura*. Universidad de Sevilla.
- [3] C. T. O'Connor, E. Van Steen, and M. E. Dry, "New catalytic applications of zeolites for petrochemicals," *Stud. Surf. Sci. Catal.*, vol. 102, pp. 323–362, 1996, DOI: [https://doi.org/10.1016/S0167-2991\(06\)81407-2](https://doi.org/10.1016/S0167-2991(06)81407-2)
- [4] X. Yu, B. Liu, and Y. Zhang, "Effect of Si/Al ratio of high-silica HZSM-5 catalysts on the prins condensation of isobutylene and formaldehyde to isoprene," *Heliyon*, vol. 5, no. 5, p. e01640, 2019, <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01640>.
- [5] J. Dedecek, V. Balgová, V. Pashkova, P. Klein, and B. Wichterlová, "Synthesis of ZSM-5 zeolites with defined distribution of Al atoms in the framework and multinuclear MAS NMR analysis of the control of Al distribution," *Chem. Mater.*, vol. 24, no. 16, pp. 3231–3239, 2012, DOI: <https://doi.org/10.1021/cm301629a>.
- [6] S. Narayanan, A. Sultana, K. Krishna, P. Mériaudeau, and C. Naccache, "Synthesis of ZSM-5 type zeolites with and without template and evaluation of physicochemical properties and aniline alkylation activity," *Catal. Letters*, vol. 34, no. 1–2, pp. 129–138, 1995, DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00808329>.
- [7] W. Aguilar-Mamani, G. García, J. Hedlund, and J. Mouzon, "Comparison between leached metakaolin and leached diatomaceous earth as raw materials for the synthesis of ZSM-5," *Springerplus*, vol. 3, no. 1, pp. 1–10, 2014, <https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-292>.
- [8] C. A. R. Reyes, C. D. Williams, and O. M. C. Alarcón, "Synthesis of zeolite LTA from thermally treated kaolinite," *Rev. Fac. Ing. Univ. Antioquia*, vol. unknown, no. 53, pp. 30–41, 2010.
- [9] V. Sanhueza, U. Kelm, R. Cid, and L. López-Escobar, "Synthesis of ZSM-5 from diatomite: A case of zeolite synthesis from a natural material," *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, vol. 79, no. 7, pp. 686–690, 2004, DOI: <https://doi.org/10.1002/jctb.1022>.
- [10] Y. Li, L. Li, and J. Yu, "Applications of zeolites in sustainable chemistry," *Chem*, vol. 3, no. 6, pp. 928–949, 2017, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chempr.2017.10.009>.
- [11] Y. Li et al., "Synthesis of ZSM-5 zeolite from diatomite for fluid catalytic cracking (FCC) application," *Appl. Petrochemical Res.*, vol. 5, no. 4, pp. 347–353, 2015, DOI: <https://doi.org/10.1007/s13203-015-0113-2>.

- [12] D. Valeev et al., "Extraction of aluminium by autoclave hydrochloric acid leaching of boehmite- kaolinite bauxite," *Light Met.* 2016, pp. 23–28, 2016, DOI: <https://doi.org/10.1002/9781119274780.ch5>.
- [13] P. wang Zhu et al., "Aluminum extraction from coal ash by a two-step acid leaching method," *J. Zhejiang Univ. Sci. A*, vol. 16, no. 2, pp. 161–169, 2015, <https://doi.org/10.1631/jzus.A1400195>.
- [14] F. Chigondo, B. C. Nyamunda, and V. Bhebhe, "Extraction of water treatment coagulant from locally abundant kaolin clays," *J. Chem.*, vol. 2015, 2015, DOI: <https://doi.org/10.1155/2015/705837>.
- [15] W. Acapiri "Estudio y aplicación de los recursos diatomáceos de las localidades charaña y bella vista, departamentos de la paz y potosi," 2013.
- [16] S. Lowell, Joan E. Shields, Martin A. Thomas, Matthias Thommes Characterization of porous solids and powders: surface area, pore size, and density, vol. 42, no. 09. 2005.
- [17] Peter A. Jacobs, Johan A. Martens "Synthesis of ZSM-5 zeolites in the presence of tetrapropylammonium ions," *Stud. Surf. Sci. Catal.*, vol. 33, no. C, pp. 47–111, 1987, DOI: [https://doi.org/10.1016/S0167-2991\(09\)60467-5](https://doi.org/10.1016/S0167-2991(09)60467-5).
- [18] S. L. Burkett and M. E. Davis, "Mechanism of structure direction in the synthesis of pure-silica zeolites. 2. Hydrophobic hydration and structural specificity," *Chem. Mater.*, vol. 7, no. 8, pp. 1453–1463, 1995, DOI: <https://dx.doi.org/10.1021/10.1021/cm00056a009>.
- [19] R. M. Mohamed, H. M. Aly, M. F. El-Shahat, and I. A. Ibrahim, "Effect of the silica sources on the crystallinity of nanosized ZSM-5 zeolite," *Microporous Mesoporous Mater.*, vol. 79, no. 1–3, pp. 7–12, 2005, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2004.10.031>.
- [20] L. Shirazi, E. Jamshidi, and M. R. Ghasemi, "The effect of Si/Al ratio of ZSM-5 zeolite on its morphology, acidity and crystal size," *Cryst. Res. Technol.*, vol. 43, no. 12, pp. 1300–1306, 2008, DOI: <https://doi.org/10.1002/crat.200800149>.
- [21] P. Hudec, A. Smiešková, and V. Jorík, "Sensitivity of the C-constant of BET-isotherm to the content of micropore volume in mesoporous matrix," *Stud. Surf. Sci. Catal.*, vol. 174, no. B, pp. 981–984, 2008, DOI: [https://doi.org/10.1016/S0167-2991\(08\)80054-7](https://doi.org/10.1016/S0167-2991(08)80054-7).
- [22] F. Lónyi and J. Valyon, "On the interpretation of the NH<sub>3</sub>-TPD patterns of," *Microporous Mesoporous Mater.*, vol. 47, no. 2–3, pp. 293–301, 2001.
- [23] R. M. Lara Prado et al., "Síntesis de zeolita ZSM-5 utilizando diatomita como precursor; su aplicación en el proceso de metanol a hidrocarburos (Mth)," *Rev. Boliv. Química*, vol. 36, no. 5, pp. 198–209, 2019, 10.34098/2078-3949.36.5.2. [https://www.researchgate.net/publication/342069518\\_Sintesis\\_de\\_Zeolita\\_ZSM-5\\_utilizando\\_Diatomita\\_como\\_precursor\\_su\\_aplicacion\\_en\\_el\\_proceso\\_de\\_Metanol\\_a\\_hidrocarburos\\_MTH](https://www.researchgate.net/publication/342069518_Sintesis_de_Zeolita_ZSM-5_utilizando_Diatomita_como_precursor_su_aplicacion_en_el_proceso_de_Metanol_a_hidrocarburos_MTH)
- [24] M. Takeuchi, T. Tsukamoto, A. Kondo, and M. Matsuoka, "Investigation of NH<sub>3</sub> and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> adsorbed on ZSM-5 zeolites by near and middle infrared spectroscopy," *Catal. Sci. Technol.*, vol. 5, no. 9, pp. 4587–4593, 2015, DOI: <https://doi.org/10.1039/C5CY00753D>.
- [25] C. Lu et al., "Plausibility of potassium ion-exchanged ZSM-5 as soot combustion catalysts," *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, pp. 3–10, 2017, DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03504-3>.
- [26] M. Huang, S. Kaliaguine, and A. Auroux, "Lewis basic and Lewis acidic sites in zeolites," *Stud. Surf. Sci. Catal.*, vol. 97, no. C, pp. 311–318, 1995, DOI: [https://doi.org/10.1016/S0167-2991\(06\)81903-8](https://doi.org/10.1016/S0167-2991(06)81903-8).
- [27] L. E. Sandoval-Díaz, J. A. González-Amaya, and C. A. Trujillo, "General aspects of zeolite acidity characterization," *Microporous Mesoporous Mater.*, vol. 215, pp. 229–243, 2015, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2015.04.038>.
- [28] G. Garcia, *Synthesis of zeolites from Bolivian raw materials for catalysis and detergency applications*. 2015.
- [29] C. Y. Wu, H. F. Yu, and H. F. Zhang, "Extraction of aluminum by pressure acid-leaching method from coal fly ash," *Trans. Nonferrous Met. Soc. China (English Ed.)*, vol. 22, no. 9, pp. 2282–2288, 2012, DOI: [https://doi.org/10.1016/S1003-6326\(11\)61461-1](https://doi.org/10.1016/S1003-6326(11)61461-1).
- [30] C. Bernardon, M. Ben Osman, G. Laugel, B. Louis, and P. Pale, "Acidity versus metal-induced Lewis acidity in zeolites for Friedel-Crafts acylation," *Comptes Rendus Chim.*, vol. 20, no. 1, pp. 20–29, 2017, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.crci.2016.03.008>.
- [31] F. R. Chen, J. G. Davis, and J. J. Fripiat, "Aluminum coordination and Lewis acidity in transition aluminas," *J. Catal.*, vol. 133, no. 2, pp. 263–278, 1992, DOI: [https://doi.org/10.1016/0021-9517\(92\)90239-E](https://doi.org/10.1016/0021-9517(92)90239-E).

**Article citation:**

R. M. Lara Prado, L. Lopez N. & S. Cabrera M., "The effect of the acid pre-treatment temperature of natural diatomaceous earth on the Si/Al ratio of ZSM-5 zeolite", *Rev. Colomb. Quim.*, vol. 51, no. 2, pp. 41-47, 2022. DOI:10.15446/rev.colomb.quim.v51n2.101096