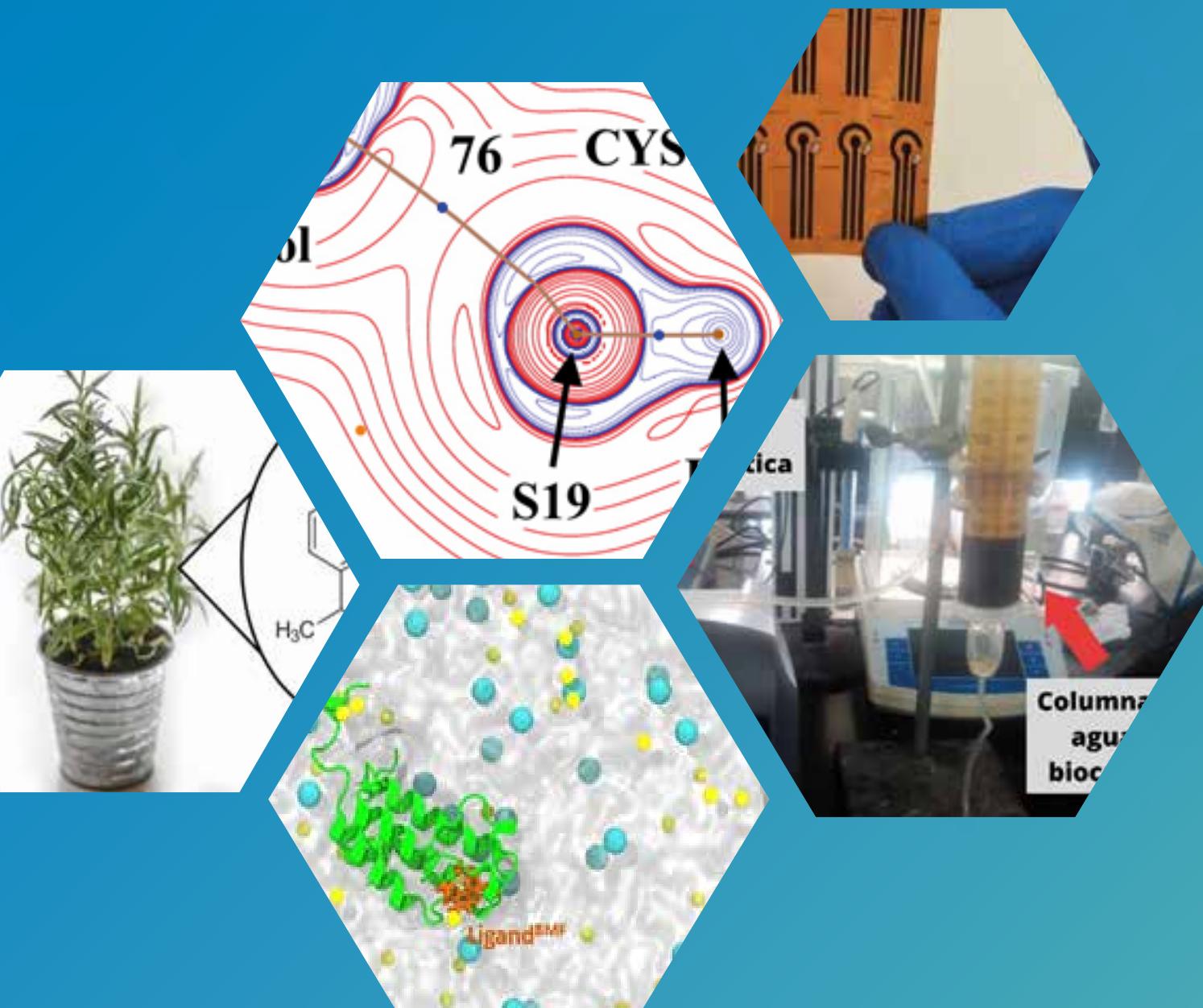




VOL. 52 NÚM. 1 - 2023

Revista Colombiana de Química

ISSN: 2357-3791





VOL. 52 NÚM. 1 -2023

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

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.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 Narváez Cuenca, Ph. D
Universidad Nacional de Colombia, Bogotá

Asistentes editoriales

Angie Carolina Guevara
Universidad Nacional de Colombia, Bogotá
Carolina Gómez Pulido
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
Pennsylvania 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:
Proceditor Ltda.
Diseño y maquetación:
Carolina Gómez Pulido



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Tabla de contenido

Química Orgánica y Bioquímica

Dynamics and Energetics of a Bromodomain in complex with bromosporine from *Leishmania donovani*

Dinámica y energética de un Bromodominio en complejo con bromosporina de *Leishmania donovani*

Dinâmica e energética do um bromodomínio em complexo com bromosporina de *Leishmania donovani*

Georcki Ropón-Palacios, Manuel Chenet-Zuta, Jean Ramos-Galarza, Alfonzo Gervacio-Villarreal, Kewin Otazu, Reyna Cárdenas-Cárdenas, Fidel Casillas-Muñoz

Síntesis y actividad antiproliferativa de una mezcla de derivados de (+/-) 7-cloro-(4-tioalquilquinolina). Inducción de apoptosis y daño sobre el ADN/ARN

Synthesis and antiproliferative activity of a mixture (+/-) 7-chloro-(4-thioalkylquino-line) derivatives. Inducing apoptosis and DNA/RNA damage

Síntese e atividade antiproliferativa de uma mistura de derivados de 7-clo-ro-(4-tioalquilquinolina). Indução de apoptose e dano de DNA/RNA

Jaime Charris Charris, Joyce E. Gutiérrez, Esteban Fernández-Moreira, Juan B. De Sanctis, Soňa Gurská, Petr Džubák, Marián Hajdúch, Hegira Ramírez

3-9

10-18

19-24

25-41

42-48

49-54

Química Aplicada y Analítica

Características principales del biocarbón derivado de restos de *Theobroma cacao* L. para su uso en suelos agrícolas

Key features of the biochar derived from *Theobroma cacao* L. residues for use on agricultural soils

Principais características do biochar derivado de resíduos de *Theobroma cacao* L. para utilização em solos agrícolas

Salomon Barrezueta Unda, Hugo Romero Bonilla, Maylin Ríos Hidalgo

Drogas emergentes: detección mediante sensores electroquímicos

Emerging drugs: detection by electrochemical sensors

Drogas emergentes: detecção usando sensores eletroquímicos

Jerson González-Hernández

Fisicoquímica y Química Inorgánica

Estudio computacional de las interacciones moleculares entre el timol y los residuos HIS41 y CYS145 presentes en el sitio activo de la proteasa 3CLpro

Computational study of the molecular interactions between thymol and the HIS41 and CYS145 residues present in the active site of the 3CLpro protease

Estudo computacional das interações moleculares entre o timol e os resíduos HIS41 e CYS145 presentes no sítio ativo da protease 3CLpro

José Gregorio González Acosta, José Gregorio Parra, Peter Iza

Síntesis de tioureas con isoniacida y niacida estructural: test frente a bacterias Gram + y Gram -

Synthesis of thioureas with structural isoniazid and niazid: test against Gram + and Gram - bacteria

Síntese de tioureas com isoniazida e niazida estruturais: teste contra bactérias Gram + e Gram -

Carlo Felipe Tovar-Taboada, Jorge Angulo-Cornejo



Dynamics and Energetics of a Bromodomain in complex with bromosporine from *Leishmania donovani*

Abstract

Leishmaniasis continues to be a neglected tropical disease, affecting people and animals and causing significant economic losses. Therefore, there is interest in the study and evaluation of new drug targets. In fact, it has been shown that by interfering with lysine-reading proteins such as bromodomain (BMD) there is a decrease in parasite survival. In this study, we researched the dynamics and energetics of the *Leishmania donovani* BMD in complex with bromosporin, which is considered to be a pan-inhibitor of BMDs, with the aim of understanding the molecular recognition mechanism. Molecular dynamics (MD) and non-equilibrium free energy calculation guided by steered molecular dynamics (SMD) simulations showed that the BMD has three flexible amino acid regions and bromosporin exhibiting various recognition states during the interaction. These results corroborate the promiscuity of bromosporin for energetically favourable sites, with the possibility of expanding its inhibition to other bromodomains. Furthermore, these results suggest that Van der Waals interactions have more relevance for complex recognition and residues ASN-87 and TRP-93 are key in forming hydrophobic and H-bond interactions, respectively. This research provides new insights for understanding the recognition mechanism, dynamics and energetics of the complex for the development of new therapeutic strategies.

Keywords: Bromodomain; bromosporine; molecular dynamics; free energy.

Dinámica y Energética de un Bromodominio en complejo con bromosporina de *Leishmania donovani*

Resumen

La leishmaniasis sigue siendo una enfermedad tropical desatendida, que afecta a personas y animales y causa importantes pérdidas económicas. De ahí el interés por estudiar y evaluar nuevas dianas farmacológicas. De hecho, se ha demostrado que al interferir con proteínas lectoras de lisina como el bromodominio ("bromodomain", BMD) se produce una disminución de la supervivencia del parásito. En este artículo estudiamos la dinámica y la energética del BMD de *Leishmania donovani* en complejo con bromosporina, que se considera un pan-inhibidor de BMD, con el objetivo de comprender el mecanismo de reconocimiento molecular. Las simulaciones de dinámica molecular (DM) y el cálculo de energía libre de no-equilibrio guiado por dinámica molecular de estiramiento (DMS) mostraron que BMD tiene tres regiones de aminoácidos flexibles y la bromosporina presenta varios estados de reconocimiento durante la interacción. Estos resultados corroboran la promiscuidad de la bromosporina por sitios energéticamente favorables, siendo posible expandir su inhibición a otros bromodomínios. Además, los resultados sugieren que las interacciones de Van der Waals tienen más relevancia para el reconocimiento del complejo y los residuos ASN-87 y TRP-93 son clave en la formación de interacciones hidrofóbicas y de puentes de hidrógeno, respectivamente. Esta investigación proporciona nuevos conocimientos para comprender el mecanismo de reconocimiento molecular, la dinámica y la energética del complejo para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

Palabras clave: Bromodominio; bromosporina; dinámica molecular; energía libre.

Dinâmica e energética de um bromodomínio em complexo com bromosporina de *Leishmania donovani*

Resumo

A leishmaniose continua a ser uma doença tropical negligenciada, que afeta os seres humanos e os animais e causa perdas econômicas significativas. Daí o interesse em estudar e avaliar novos alvos de medicamentos. De fato, a interferência com proteínas leitoras de lisina, como o bromo domínio ("bromodomain", BMD), tem demonstrado diminuir a sobrevivência do parasita. Neste trabalho, estudamos a dinâmica e a energética do BMD de *Leishmania donovani* em complexo com a bromosporina, considerada um pan-inibidor da BMDs, com o objetivo de compreender o mecanismo de reconhecimento molecular. As simulações de dinâmica molecular (MD) e cálculo de energia livre de não-equilíbrio guiada por dinâmica molecular esticamento (MDS) mostraram que o BMD tem três regiões de aminoácidos flexíveis e que a bromosporina apresenta vários estados de reconhecimento durante a interação. Esses resultados corroboram a promiscuidade da bromosporina para locais energeticamente favoráveis, possibilitando a expansão de sua inibição para outros bromodomínios. Além disso, os resultados sugerem que as interações de Van der Waals são mais relevantes no momento do reconhecimento do complexo e os resíduos ASN-87 e TRP-93 são fundamentais na formação de interações hidrofóbicas e de ligações de hidrogênio, respectivamente. Essa pesquisa fornece novos insights para compreender o mecanismo de reconhecimento, a dinâmica e a energética do complexo para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

Palavras-chave: Bromodomínio; bromosporina; dinâmica molecular; energia livre.

Introduction

Parasitic infections remain one of the most pressing global health concerns of our day, affecting billions of people and producing unsustainable economic burdens [1]–[3]. One of these parasites is *Leishmania*. *Leishmania* are unicellular parasites that cause human and animal illness, considered as a neglected tropical disease, which is transmitted by infected mosquitoes, resulting in a wide range of pathologies [4]–[6]. *Leishmania (L.) donovani*, is a species of this group of parasites that causes highly virulent fatal visceral leishmaniasis.

Worldwide *L. donovani* is known to cause between 50 000 to 90 000 new cases of kala-azar or visceral leishmaniasis (VL) [7]–[9], with a total of ~0.2 to 0.4 million people in 98 countries. Added to this, the World Health Organisation (WHO) considers leishmaniasis to be prominent among the global causes of death by infectious diseases. Due to the global health problems that this parasite entails, the re-evaluation of new chemotherapeutic treatments is necessary, since it is known that the current ones can fail. It is currently known that antimonials are the first line of treatment against leishmaniasis in many regions of the world [10]–[12].

The recurrent use of antimonials and other pharmacological treatments as a treatment for leishmaniasis, have generated resistance of these parasites to these drugs [13]–[15]. This creates a serious problem, especially in regions where sanitary conditions are poor, and the combination of drugs is not feasible. Therefore, the search for new strategies and targets for drug development becomes an imperative need [16]–[18].

In this regard, it is known that proteins related to transcriptional processes could emerge as excellent targets. A group of proteins known as molecular “readers” of lysine acetylation, containing a bromodomain (BRD) have emerged as key gene expression regulators and a promising new class of drug targets ([1], [19], [20]). The bromodomain was first described in the characterisation of the *Drosophila melanogaster* nuclear remodelling comprised of ~110 amino acids. The bromodomain folds into a left-handed bundle of four α -helices linked by two variable-loop regions (BC and ZA) that form a hydrophobic pocket for the acetylated lysine ([4], [21], [22]).

There is evidence that lysine acetylation is critical in kinetoplastids (*Trypanosoma spp.* and *Leishmania spp.*) [1], [23]–[25]. Therefore, in this research we study the dynamics and energetics of the bromodomain of *L. donovani* in complex with bromosporine, which is considered as a bromodomain pan-inhibitor, with the aim of understanding the mechanism of molecular recognition, and energetics, in order to use this information in future drug development rationally for this group of proteins.

Materials and Methods

System setup

The system was prepared by means of the CHARMM-GUI [26] tool, using the Solution Builder [27] module. Missing atoms in the middle of the bromodomain chain (PDBID: 5C4Q) were added with PDBReader [28], the protein was protonated to pH 7.0 with the PDB2PQR tool [29]. Next, the system was solvated with the TIP3P [30] water model, into a 15 Å cubic box of padding, and a 150 mM concentration of NaCl. Finally, the bromosporine inhibitor was parameterised with the CGenff tool [31]. All simulations were run with NAMD 2.14 [32] and CHARMM36 FF [33] using CGenFF [31] for the ligand only.

MD protocol

The constructed systems were minimised in the presence of a harmonic restraint of 5 kcal mol⁻¹ Å⁻² on the heavy atoms of the ligand and the backbones of the protein for 10 000 steps. Next, the system

was equilibrated in a NVT assembly at a temperature of 300 K for 5 ns, then the system was equilibrated in a second phase in a NpT assembly maintaining a pressure of 1 bar for 10 ns with the same restraint. Finally, production in NpT at 310 K and 1 bar of pressure was performed for 300 ns, for a total of three independent replicates (3 x 300 ns) accumulating a total of 0.9 μs.

In the equilibration and production steps the Lavengin thermostat and the Nosé-Hoover Langevin piston were used to control temperature and pressure. Atoms of rigid hydrogens were maintained with SETTLE algorithm [34] in waters, while to solute the RATTLE/SHAKE algorithm was used [35]. Short-range, non-bonded and long-range non-bonded interactions were treated with a cut-off scheme at 12 Å and PME [36], respectively. The r-RESPA multiple time step scheme [37] was used in all cases with 2 fs time integration steps.

Non-equilibrium free energy calculation

For this, the system was prepared and equilibrated with the standard protocol of QwikMD [38], with the only exception that a 40 Å extra padding was added into the Z axis to enable pulling. For pulling a potential bias of the form $U^{SMD}(x) = \frac{1}{2}k[vx - (\xi_L - \xi_0)]^2$ was added for the original potential $H^\pm = V_{original} + U^{SMD}$ through the colvars module [39], getting a modified potential (H^\pm). For this, the centre of mass of the ligand ξ_L , was pulling with a speed v of 10 Å ns⁻¹ and k of 7 kcal mol⁻¹ Å⁻² during 4 ns, enough to reach the unbound state. During the pulling the C_α atoms were restrained with a force of 5 kcal mol⁻¹ Å⁻². A total of 20 independent replicates were performed (total 80 ns). The work was computed for numerical integration using $W = v \int_0^{t_f} dt' F(t')$.

Based on these simulations, the potential of mean force ($PMF(\xi), \Phi(\xi)$) was reconstructed by means of Jarzynski identity as show in the following equations [40]:

$$\exp[-\beta\Phi(\xi)] = \langle \exp[-\beta W] \rangle_0 \quad (1)$$

If rearranging the equation, it shields the $\Phi(\xi)$:

$$\Phi(\xi) = -\frac{1}{\beta} \log \{ \langle \exp[-\beta W] \rangle \} \quad (2)$$

and expanding this equation for the 2nd order cumulant:

$$\Phi(\xi) = \langle W \rangle - \frac{\beta}{2} [\langle W^2 \rangle - \langle W \rangle^2] + \dots \quad (3)$$

Where $\Phi(\xi)$ is the potential of mean force, i.e the free energy profile over the collective variable (ξ), W is the work done along ξ , and β is the inverse of thermal energy ($1/k_B T$), where k_B is Boltzmann's constant.

On the other hand, to calculate the ΔG_{bind}° standard, we used the following expression:

$$\Delta G_{neq}^{Jarzynski} = \Phi(\xi)^{unbound} - \Phi(\xi)^{bound} \quad (4)$$

then:

$$\Delta G_{bind}^\circ = \Delta G_{neq}^{Jarzynski} + k_B T \ln \left[\frac{C^{comp}}{C^\circ} \right] \quad (5)$$

Where ΔG_{bind}° in kcal mol⁻¹, k_B in kcal mol⁻¹ K⁻¹, C^{comp} = 1 ligand Box⁻¹ vol⁻¹ is the concentration used in the simulation in Å³ and C° = 1/1661 Å³ is the standard concentration yielding 1 ligand × 1661 Å⁻³. These last two terms are added to pass from the computational system to the standard system. Here $\Phi(\xi)^{bound}$ and $\Phi(\xi)^{unbound}$ correspond to $\Phi(\xi)$ the associated and dissociated thermodynamics state (i.e macrostates) respectively.

Molecular data analysis

All analyses were performed through in-house Tcl/Python scripts based on VMD 1.9.4 [41] and MDAnalysis 2.0 [42], respectively. The images were rendered with VMD 1.9.4 [41]. The plots were generated with R 3.4 [43] and the ggplot [44] library. Interactions throughout the simulations were computed with an in-house python im-

plementation of molecular dynamics interaction plot tool (<https://github.com/tavolivos/Molecular-dynamics-Interaction-plot>).

Results

This work explores the interactions and recognition mechanism of bromosporin in complex with bromodomain. Figure 1 shows the two systems that were constructed, one system (1A) focused on performing conventional molecular dynamics and the second (1B) used to perform the steered molecular dynamics method.

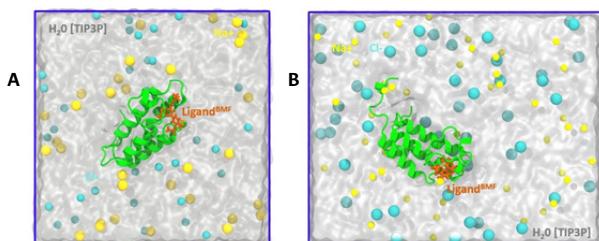


Figure 1. System setup representation **A**. Conventional molecular dynamics representation and **B**. SMD of the bromosporine ligand bound to the bromodomain. All systems contain Na^+ (sky blue) and Cl^- (yellow) ions, while water is represented as the surface in white.

Bromodomain contains flexible regions

In order to evaluate changes in the rigidity/flexibility of the bromodomain structure, root-mean-square fluctuations (RMSF) analyses of the backbone were performed. Protein flexibility and dynamics are essential for the molecular recognition process and play a fundamental role in virtually all biochemical processes in living organisms [45]. The results in Figure 2A show that all the replicates present three flexible regions in the protein and present RMSF values from 1 to 4 Å. Furthermore, Figures 2A, 2B and 2C show the structure of the receptor and the location of the flexible regions. R'_1 ranges from PRO-36 to THR-50, R'_2 from ARG-58 to VAL-72 and finally R'_3 from ASP-85 to ASP-95. The aforementioned flexible regions are structurally composed of loops that play a key role in molecular recognition.

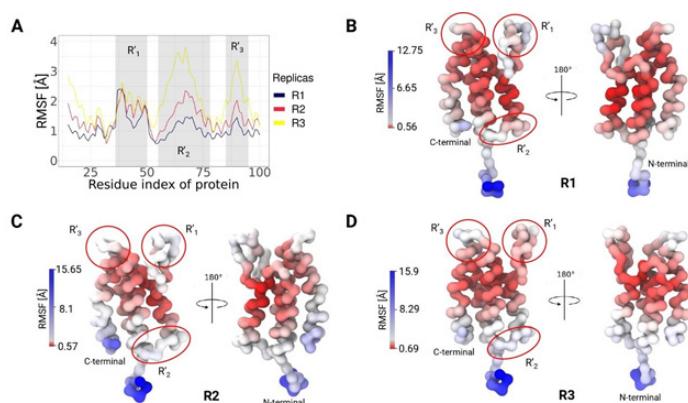


Figure 2. RMSF observed in the bromodomain-bromosporine system by MD. **A**. The bromodomain RMSF is shown except for the terminal regions, where there are three regions of flexibility (R'_1 , R'_2 and R'_3), consistent with the three replicates performed. **B**, **C** and **D** highlight the regions of highest flexibility in the bromodomain, excluding the terminal regions. All replicates were presented coloured by β factor on the structure, where red indicates the most stable regions and blue the most fluctuating ones.

Bromosporine presents several recognition states

The stability and structural changes of the bromodomain and bromosporine were evaluated through root-mean-square deviations (RMSD). Figure 3A and 3B indicated different stability values for both; bromodomain presented high values with an average around 5 Å, and bromosporine presented low values 2 Å. The results also indicated that bromosporine presents more than one conformational change. According to the RMSD density plots we noticed three forms of recognition that bromosporin may have in order to interact favourably with the receptor. The obtained RMSD values of the ligand and complex present a correlation because the conformatio-

nal changes of the complex, specifically the high plasticity of the pocket, cause freedom of movement of the ligand and could generate several rearrangements during the simulation.

Figures 3D, 3E and 3F using a 2D free energy landscape approach revealed that the ligand scans through three different conformational states had similar results obtained based on the RMSD of the ligand. In addition, based on the RMSD values the 3D structure of the receptor and ligand in the initial structure were obtained, as well as the one showing the maximum RMSD. Both structures were aligned for comparison purposes and to observe the regions showing the highest variability. Figure 3C indicates that the greatest variations in the structure, with respect to the initial one, are in the N-terminal and C-terminal regions.

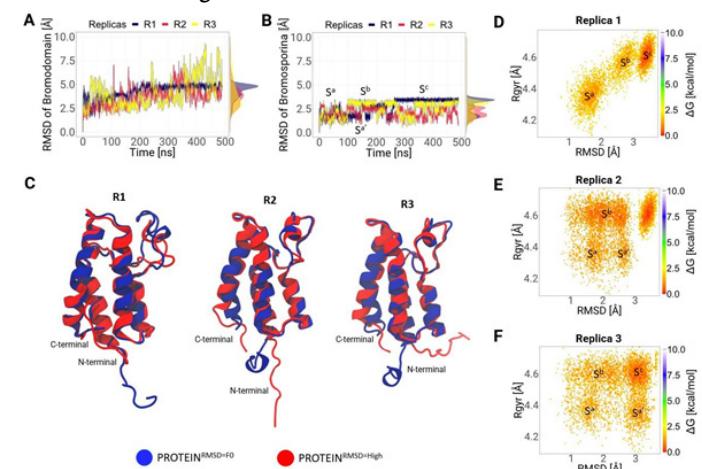


Figure 3. Evolution of the conformational states of the ligand next to the receptor throughout the simulation. **A**. Comparison of the conformational change in the backbone of the bromodomain of the three replicates. **B**. Conformational change of the ligand, where at least three conformational states (S'_a , S'_b and S'_c) were determined. **C**. Structural comparison of the bromodomain at the initial time and at the RMSD max value. **D**, **E** and **F** 2D Free energy landscape (FEL) plot of the ligand to the three replicates respectively. All figures contain highlights of the possible conformational states found in the scan.

Pocket

Figure 4 is a set of 3D images showing the bromodomain binding cavity and its associated ligand at three different times. In each image a different conformation of the ligand within the binding cavity is observed. The first image shows the conformation of the ligand at 28 ns with an area of interaction with the receptor determined by the area bounded by the red line. The second image shows a modified conformation of the ligand and the interaction area increases to 193 ns. Finally, the third image shows a new rearrangement of the ligand within the cavity and an increase in the contact area with the receptor. In addition, the images indicate conformational trends of the pocket during the simulation in all replicates, indicating the importance of pocket plasticity.

The relative freedom that can be observed of the ligand during the course of the simulation is due to the constant movement of the loops surrounding the enzyme pocket. The movements allow the ligand to interact with key residues in the complex and start rearranging its atoms until it finds the thermodynamically stable location. The bromosporine at the end of the simulation can fit better because it interacts with the ZA loop which is deeper with in the enzyme pocket than the BC loop [46].

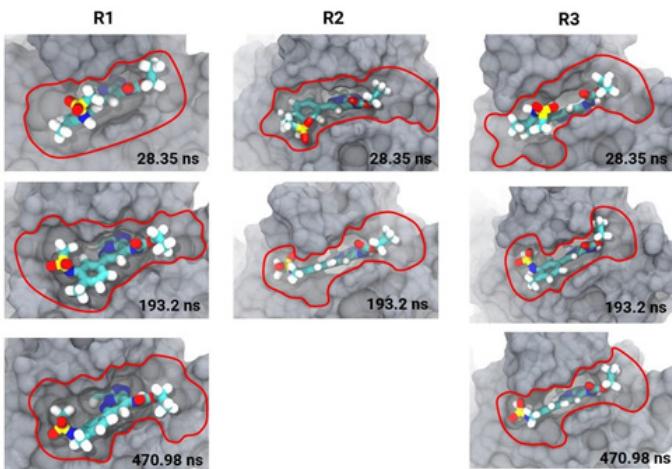


Figure 4. 3D structure of bromosporine in complex with the bromodomain. R1, R2 and R3 present the ligand interaction area in the enzyme pocket, from three replicas, and the conformational states of the ligand at three different times of the simulation.

Van der Waals energy key to molecular recognition

In molecular dynamics simulations, non-bonded energy interactions such as Van der Waals and Coulomb were calculated. Figure 5A and 5B shows the average of the replicas of both energies. Van der Waals interactions contribute more to molecular recognition because they present a strong average energy value of $-40 \text{ kcal mol}^{-1}$ compared to Coulomb interactions with an average weak value of $-27 \text{ kcal mol}^{-1}$. Figure 5C shows a Kruskal-Wallis statistical study performed on both interactions to observe the significant differences between each replicate with a value of $n=5000$. The analyses indicated that there is a significant difference between the replicates in both Van der Waals and Coulomb force.

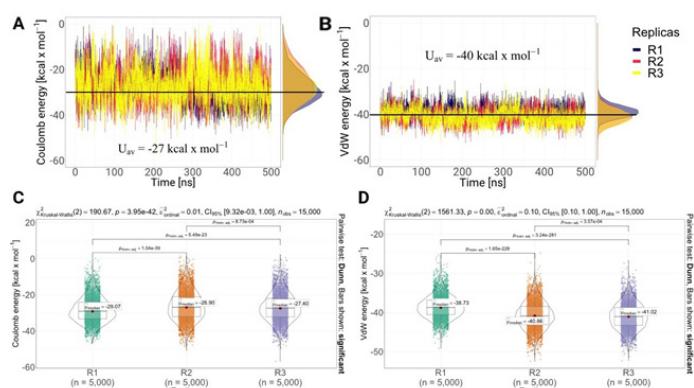


Figure 5. The Non-bonded energy of the three replicas shows slight changes (A, B). Kruskal-Wallis statistical test for the C. Electrostatics and D. Van der Waals interaction energies, in which all replicates are statistically different.

Free energy

In Figure 6A, we present the average strength profiles as a function of distance obtained from 20 SMD simulations for the ligand bromosporine bound to the bromodomain complex. At the beginning of each simulation ($t = 0 \text{ ns}$), the ligand is in a bound state, interacting with the protein residues at the binding site. We observe the separation force of the bromosporine bound to the bromodomain complex. In the 20 replicates performed, it is observed that there is a peak of 175 pN near 5 \AA indicating that there was bond breaking or interactions within the complex. After the peak, near 10 \AA of separation of the complex, the force values drop and do not present any additional energy barrier. In addition, the work of the system was studied. Figure 6B showed a trend in all replicates, where at the beginning of the simulation, the work has an exponential trend up to 25 \AA . After that, the work continues to increase gradually up to 30 \AA and then the system stabilizes, causing the work to not increase and generating an asymptote in the replicas. Finally, we calculate the potential of mean force (PMF) using the Jarzynski equation; Figure 6C shows the PMF profiles as a function of stretching distance between the 20 replicates performed along the coordinate set. The

profile consists of two peaks, the first one is near 10 \AA which is the highest value with 60 kcal mol^{-1} and the second one starts after 20 \AA and reaches a value of 40 kcal mol^{-1} at a distance of 25 \AA . The obtained energy (ΔG_{bind}°) value was $43.79 \text{ kcal mol}^{-1}$.

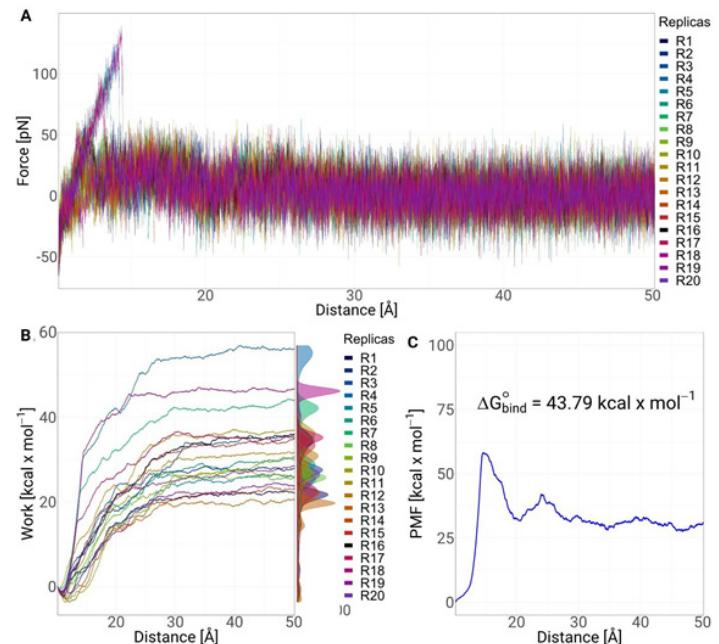
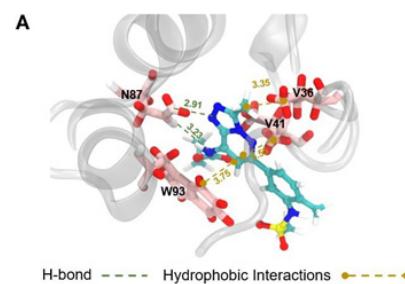


Figure 6. SMD of the bromodomain-bromosporine system. A. Force as a function of distance is shown for the 20 replicates; B. Cumulative system work as a function of distance is shown. C. Potential of mean force (PMF) of the system with respect to the distance is shown.

Asparagine and tryptophan key residues in the binding site

Figure 5A shows 3D images of hydrogen bond interactions and hydrophobic interactions with their respective distances. Key amino acids, especially ASN-87 and TRP-93 interacting with bromosporine and surrounding the hydrophobic bromodomain pocket are observed. In addition, Figures 5B, 5C and 5D show the percentage occurrences of hydrophobic, hydrogen bonding and π -stacking interactions respectively of the bromodomain protein amino acids in the three replicates. Hydrophobic interactions indicated that the amino acid TRP-93 is the one that presented the highest frequency, reaching 20 % followed by two Valines at position 36 and 41 that have a similar frequency of 7.5 %. On the other hand, in the hydrogen bond the amino acid ASN-87 was the one that clearly presented the highest and most significant values with respect to the remainder of the amino acids. Finally, π -stacking interactions presented the lowest percentage of occurrence with values less than 1 %. Both of the aforementioned residues provide the major contribution in the binding of the bromosporine inhibitor to the complex. Therefore, these residues may be effective targets for the development of selective bromodomain inhibitors in *L. donovani*.



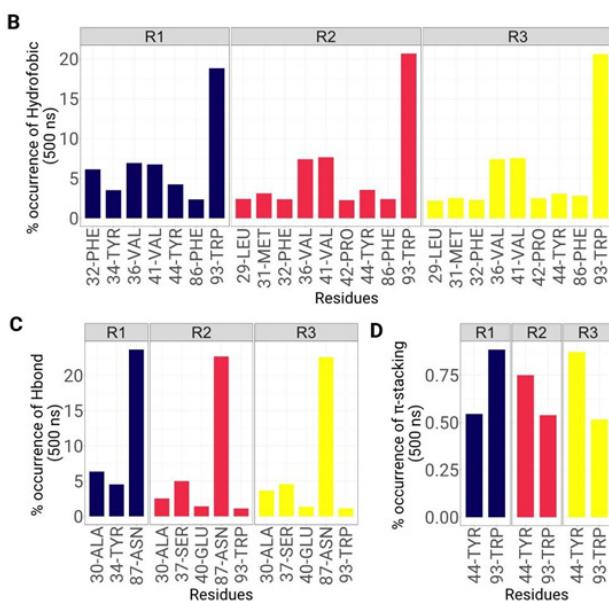


Figure 7. Molecular interactions of the bromosporine-bromodomain system observed during MD. A. The spatial conformation of the system and the key amino acids are shown with the approximate distance in Å, from the crystal structure. B, C, and D show the frequency of occurrence in % of the hydrophobic, H-bond and π -stacking interactions.

Discussion

In this work, we used conventional molecular dynamics and steered molecular dynamics simulations to evaluate the structural dynamics, energetics and recognition mechanism of the bromosporin inhibitor coupled to the bromodomain complex of *L. donovani*.

The analyses showed that in all replicates there are three regions with high fluctuation values. Regions R'_1 and R'_3 correspond to the binding loops; BC and ZA. The values are as expected because both belong to the active site that comes in direct contact with the ligand and it has been shown that the movement of the residues is important for ligand recognition in the bromodomain. The results are similar to those obtained by [47] who analysed eight ligand-coupled bromodomain complexes showing high RMSF values at the active site. The R'_2 region corresponds in the same way to a loop so it is expected to vibrate more with respect to the helix regions [48].

The RMSD values indicated that the replicates obtained from the bromodomain present values > 3.0 Å indicating that they have low stability during the simulation. This may occur due to interaction with the ligand or hydrophobic residues in the loops that may contribute to the instability of the structure [49], [50]. In the case of the ligand results, they showed stability and it could be determined that there are three conformational states. A possible reason for finding multiple states in the ligand is because it is promiscuous and can interact with different structural subfamilies of bromodomains [51]. In fact, it was designed to interact not only with the identified binding site but also with a channel formed by the ZA loop and helix A that is present in almost all bromodomain structures. However, this pocket has rarely been observed to undergo interaction by histone peptide ligands. The observed variations in conformations suggest changes in orientation, position and possible interactions between the ligand and the linker pocket over time. These conformational changes may be essential for the stability and specific interactions between the ligand and the active site. Taken together, the images capture the dynamics of the ligand-cavity complex and provide key information for understanding their interaction at different times in the process [52].

In the case of SMD simulations, the force profiles showed that there is a peak at cleavage of the bromosporin with the bromodomain complex. The observed energy barrier is due to the cleavage

of H-bonds, in this case of ASN-87 with the ligand. Subsequently, the values were observed to drop to zero indicating that the ligand completely dissociates from the binding pocket of the receptor [53], [54]. Similar results were observed in the calculations of work required for uncoupling and PMF which after presenting peaks both started to stabilise after 25 Å [55].

Finally, the binding interaction results between bromodomain and bromosporin indicated that in all three replicates there is H-bond formation of the ASN-87 residue [56]. The data are as expected due to previous investigations, where ligands recognise the central cavity of the receptor and anchor via hydrogen bridging to an asparagine residue present in most bromodomains. In addition, it could be determined that in the BC loop there is TRP-93 which together with VAL-41 and VAL-46 located in the ZA loop are key residues in the hydrophobic interactions allowing the ligand to fully enter the binding site [57], [58].

Conclusion

In this work, we performed computer biomolecular simulations of the bromosporin ligand bound to the bromodomain complex. RMSF and RMSD analyses indicated that the bromodomain has greater flexibility than the ligand, causing the ligand to have freedom of movement and producing three conformational states during the simulation. In addition, it was determined that Van Der Waals interactions are key for the recognition of the ligand to the active site to occur. Finally, it could be determined that residues ASN-87 and TRP-93 surround the enzyme pocket and are located in the BC loop of the complex. Therefore, the findings of this study provide useful dynamic information related to conformational alterations and structure-affinity relationship at atomistic levels for new therapeutic strategies towards the bromodomain.

References

- [1] V. Jeffers, C. Yang, S. Huang, and W. J. Sullivan, "Bromodomains in protozoan parasites: Evolution, function, and opportunities for drug development," *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 81, Mar. 2017, DOI: <https://doi.org/10.1128/mmbr.00047-16>.
- [2] C. Tallant et al., "Expanding bromodomain targeting into neglected parasitic diseases," *ACS Infectious Diseases*, vol. 7, no. 11, pp. 2953–2958, 2021, DOI: <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.1c00387>.
- [3] A. Pezza et al., "Essential bromodomain TcBDF2 as a drug target against chagas disease," *ACS Infectious Diseases*, vol. 8, no. 5, pp. 1062–1074, 2022, DOI: <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.2c00057>.
- [4] N. G. Jones et al., "Bromodomain factor 5 is an essential regulator of transcription in leishmania," *Nature Communications*, vol. 13, Dec. 2022, DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31742-1>.
- [5] P. Lypaczewski and G. Matlashewski, "Leishmania donovani hybridisation and introgression in nature: A comparative genomic investigation," *The Lancet Microbe*, vol. 2, pp. e250–e258, Jun. 2021, DOI: [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(21\)00028-8](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(21)00028-8).
- [6] P. Grech, S. M. Vella, and T. Piscopo, "Leishmania donovani mucosal leishmaniasis in malta," *BMJ Case Reports*, vol. 13, Nov. 2020, DOI: <https://doi.org/10.1136/bcr-2020-237687>.
- [7] S. Moulik, S. Sengupta, and M. Chatterjee, "Molecular tracking of the leishmania parasite," *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, vol. 11, Feb. 2021, DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.623437>.
- [8] E. C. Ashby, J. L. Havens, L. M. Rollosson, J. Hardin, and D. Schulz, "Chemical inhibition of bromodomain proteins in insect-stage African trypanosomes perturbs silencing of the variant surface glycoprotein repertoire and results in widespread changes in the transcriptome," *Microbiology Spectrum*, vol. 11,

- no. 3, pp. e00147-23, 2023, DOI: <https://doi.org/10.1128/spectrum.00147-23>.
- [9] S. A. A. Das Sonali and Mukherjee, "Super enhancer-mediated transcription of miR146a-5p drives M2 polarization during leishmania donovani infection," *PLOS Pathogens*, vol. 17, no. 2, pp. 1-27, Feb. 2021, DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009343>.
- [10] A. Ponte-Sucre et al., "Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 11. Public Library of Science, Dec. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006052>.
- [11] E. Ashby et al., "Genomic occupancy of the bromodomain protein Bdf3 is dynamic during differentiation of African trypanosomes from bloodstream to procyclic forms," *mSphere*, vol. 7, no. 3, pp. e00023-22, 2022, DOI: <https://doi.org/10.1128/mSphere.00023-22>.
- [12] J. N. Roson et al., "Histone H2B.v demarcates strategic regions in the trypanosoma cruzi genome, associates with a bromodomain factor and affects parasite differentiation and host cell invasion," *bioRxiv*, 2021, DOI: <https://doi.org/10.1101/2021.06.08.447515>.
- [13] R. García-Hernández, J. I. Manzano, S. Castanys, and F. Gamarró, "Leishmania donovani develops resistance to drug combinations," *PLoS Neglected Tropical Diseases*, vol. 6, Dec. 2012, DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001974>.
- [14] M. A. J. Fleck Krista and Nitz, "Reading' a new chapter in protozoan parasite transcriptional regulation," *PLOS Pathogens*, vol. 17, no. 12, pp. 1-21, Dec. 2021, DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010056>.
- [15] S. Pradhan, R. A. Schwartz, A. Patil, S. Grabbe, and M. Goldust, "Treatment options for leishmaniasis," *Clinical and Experimental Dermatology*, vol. 47, no. 3, pp. 516-521, Mar. 2022, DOI: <https://doi.org/10.1111/ced.14919>.
- [16] V. Geoghegan, N. G. Jones, A. Dowle, and J. C. Mottram, "Protein kinase signalling at the leishmania kinetochore captured by XL-BioID," *bioRxiv*, 2021, DOI: <https://doi.org/10.1101/2021.07.08.451598>.
- [17] M. A. A. Jafarzadeh Abdollah and Nemati, "Bidirectional cytokine-microRNA control: A novel immunoregulatory framework in leishmaniasis," *PLOS Pathogens*, vol. 18, no. 8, pp. 1-17, Aug. 2022, DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010696>.
- [18] S. S. Çınaroğlu and E. Timuçin, "Comprehensive evaluation of the MM-GBSA method on bromodomain-inhibitor sets," *Briefings in Bioinformatics*, vol. 21, no. 6, pp. 2112-2125, Nov. 2019, DOI: <https://doi.org/10.1093/bib/bbz143>.
- [19] A. K. Gupta, S. Das, M. Kamran, S. A. Ejazi, and N. Ali, "The pathogenicity and virulence of leishmania - interplay of virulence factors with host defenses," *Virulence*, vol. 13, no. 1, pp. 903-935, 2022, DOI: <https://doi.org/10.1080/21505594.2022.2074130>.
- [20] E. Rodriguez Araya, M. L. Merli, P. Cribb, V. C. de Souza, and E. Serra, "Deciphering divergent trypanosomatid nuclear complexes by analyzing interactomic datasets with AlphaFold2 and genetic approaches," *ACS Infectious Diseases*, vol. 9, no. 6, pp. 1267-1282, 2023, DOI: <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.3c00148>.
- [21] A. Jafarzadeh et al., "The expression of PD-1 and its ligands increases in leishmania infection and its blockade reduces the parasite burden," *Cytokine*, vol. 153, p. 155839, 2022, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2022.155839>.
- [22] S. Zaib and I. Khan, "Synthetic and medicinal chemistry of phthalazines: Recent developments, opportunities and challenges," *Bioorganic Chemistry*, vol. 105, p. 104425, 2020, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.104425>.
- [23] C. M. C. Laurin et al., "Fragment-based identification of ligands for bromodomain-containing factor 3 of trypanosoma cruzi," *ACS Infectious Diseases*, vol. 7, no. 8, pp. 2238-2249, 2021, DOI: <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.0c00618>.
- [24] J. A. Kavouris et al., "Discovery of pyrazolopyrrolidinones as potent, broad-spectrum inhibitors of leishmania infection," *Frontiers in Tropical Diseases*, vol. 3, 2023, DOI: <https://doi.org/10.3389/fitd.2022.1011124>.
- [25] S. Khandibharad, K. Kharat, and S. Singh, "Single cell ATAC sequencing identifies sleepy macrophages during reciprocity of cytokines in *L.major* infection," *bioRxiv*, 2023, DOI: <https://doi.org/10.1101/2023.01.30.526191>.
- [26] S. Jo, T. Kim, V. G. Iyer, and W. Im, "CHARMM-GUI: A web-based graphical user interface for CHARMM," *Journal of Computational Chemistry*, vol. 29, no. 11, pp. 1859-1865, 2008, DOI: <https://doi.org/10.1002/jcc.20945>.
- [27] Y. Qi, X. Cheng, W. Han, S. Jo, K. Schulten, and W. Im, "CHARMM-GUI PACE CG builder for solution, micelle, and bilayer coarse-grained simulations," *Journal of Chemical Information and Modeling*, vol. 54, no. 3, pp. 1003-1009, 2014, DOI: <https://doi.org/10.1021/ci500007n>.
- [28] S. Jo et al., "Chapter eight - CHARMM-GUI PDB manipulator for advanced modeling and simulations of proteins containing nonstandard residues," in *Biomolecular modelling and simulations*, T. Karabencheva-Christova, Ed., in *Advances in protein chemistry and structural biology*, vol. 96. Academic Press, 2014, pp. 235-265. DOI: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2014.06.002>.
- [29] T. J. Dolinsky, J. E. Nielsen, J. A. McCammon, and N. A. Baker, "PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations," *Nucleic Acids Research*, vol. 32, no. suppl_2, pp. W665-W667, Jul. 2004, DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkh381>.
- [30] 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, Jul. 1983, DOI: <https://doi.org/10.1063/1.445869>.
- [31] K. Vanommeslaeghe and A. D. Jr. MacKerell, "Automation of the CHARMM general force field (CGenFF) i: Bond perception and atom typing," *Journal of Chemical Information and Modeling*, vol. 52, no. 12, pp. 3144-3154, 2012, DOI: <https://doi.org/10.1021/ci300363c>.
- [32] J. C. Phillips et al., "Scalable molecular dynamics with NAMD," *Journal of Computational Chemistry*, vol. 26, no. 16, pp. 1781-1802, 2005, DOI: <https://doi.org/10.1002/jcc.20289>.
- [33] Y. Xu, K. Vanommeslaeghe, A. Aleksandrov, A. D. MacKerell Jr., and L. Nilsson, "Additive CHARMM force field for naturally occurring modified ribonucleotides," *Journal of Computational Chemistry*, vol. 37, no. 10, pp. 896-912, 2016, DOI: <https://doi.org/10.1002/jcc.24307>.
- [34] S. Miyamoto and P. A. Kollman, "SETTLE: An analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models," *J. Comput. Chem.*, vol. 13, no. 8, pp. 952-962, Oct. 1992, DOI: <https://doi.org/10.1002/jcc.540130805>.
- [35] H. C. Andersen, "Rattle: A 'velocity' version of the shake algorithm for molecular dynamics calculations," *Journal of Computational Physics*, vol. 52, no. 1, pp. 24-34, 1983, DOI: [https://doi.org/10.1016/0021-9991\(83\)90014-1](https://doi.org/10.1016/0021-9991(83)90014-1).
- [36] U. Essmann, L. Perera, M. L. Berkowitz, T. Darden, H. Lee, and L. G. Pedersen, "A smooth particle mesh Ewald method," *The Journal of Chemical Physics*, vol. 103, no. 19, pp. 8577-8593, Nov. 1995, DOI: <https://doi.org/10.1063/1.470117>.
- [37] M. Tuckerman, B. J. Berne, and G. J. Martyna, "Reversible multiple time scale molecular dynamics," *The Journal of Chemical Physics*, vol. 97, no. 3, pp. 1990-2001, Aug. 1992, DOI: <https://doi.org/10.1063/1.463137>.
- [38] J. V. Ribeiro et al., "QwikMD - integrative molecular dynamics toolkit for novices and experts," *Scientific reports*, vol. 6, May 2016, DOI: <https://doi.org/10.1038/srep26536>.
- [39] J. Hénin, L. J. S. Lopes, and G. Fiorin, "Human learning for molecular simulations: The collective variables dashboard in VMD," *Journal of Chemical Theory and Computation*, vol. 18, no. 3, pp. 1945-1956, 2022, DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.1c00441>.

- jctc.1c01081.
- [40] M. A. Cuendet and O. Michielin, "Protein-protein interaction investigated by steered molecular dynamics: The TCR-PMHC complex," *Biophysical Journal*, vol. 95, no. 8, pp. 3575–3590, 2008, DOI: <https://doi.org/10.1529/biophysj.108.131383>.
- [41] W. Humphrey, A. Dalke, and K. Schulten, "VMD: Visual molecular dynamics," *Journal of Molecular Graphics*, vol. 14, no. 1, pp. 33–38, 1996, DOI: [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5).
- [42] N. Michaud-Agrawal, E. J. Denning, T. B. Woolf, and O. Beckstein, "MDAnalysis: A toolkit for the analysis of molecular dynamics simulations," *Journal of Computational Chemistry*, vol. 32, no. 10, pp. 2319–2327, 2011, DOI: <https://doi.org/10.1002/jcc.21787>.
- [43] R. Ihaka and R. Gentleman, "R: A language for data analysis and graphics," *Journal of Computational and Graphical Statistics*, vol. 5, no. 3, pp. 299–314, 1996, DOI: <https://doi.org/10.1080/10618600.1996.10474713>.
- [44] P. M. Valero-Mora, "ggplot2: Elegant graphics for data analysis," *Journal of Statistical Software, Book Reviews*, vol. 35, no. 1, pp. 1–3, 2010, DOI: <https://doi.org/10.18637/jss.v035.b01>.
- [45] M. A. Lill, "Efficient incorporation of protein flexibility and dynamics into molecular docking simulations," *Biochemistry*, vol. 50, p. 6157, Jul. 2011, DOI: <https://doi.org/10.1021/B12004558>.
- [46] M. Li et al., "Selective mechanism of inhibitors to two bromodomains of BRD4 revealed by multiple replica molecular dynamics simulations and free energy analyses," *Chinese Journal of Chemical Physics*, Online First, pp. 1–15, Jul. 2022, DOI: <https://doi.org/10.1063/1674-0068/CJCP2208126>.
- [47] S. D. Vita, M. G. Chini, G. Bifulco, and G. Lauro, "Insights into the ligand binding to bromodomain-containing protein 9 (BRD9): A guide to the selection of potential binders by computational methods," *Molecules (Basel, Switzerland)*, vol. 26, Dec. 2021, DOI: <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26237192>.
- [48] L. Wang, Y. Wang, Z. Yang, S. Xu, and H. Li, "Binding selectivity of inhibitors toward bromodomains BAZ2A and BAZ2B uncovered by multiple short molecular dynamics simulations and MM-GBSA calculations," *ACS Omega*, vol. 6, pp. 12036–12049, May 2021, DOI: https://doi.org/10.1021/ACSMOMEA.1C00687/ASSET/IMAGES/LARGE/AO1C00687_0008.JPG.
- [49] P. Filippakopoulos et al., "Histone recognition and large-scale structural analysis of the human bromodomain family," *Cell*, vol. 149, pp. 214–231, Mar. 2012, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.013>.
- [50] Ran. T et al., "Insight into the key interactions of bromodomain inhibitors based on molecular docking, interaction fingerprinting, molecular dynamics and binding free energy calculation," *Molecular BioSystems*, 2015, DOI: <https://doi.org/10.1039/C4MB00723A>
- [51] S. Picaud et al., "Promiscuous targeting of bromodomains by bromosporine identifies BET proteins as master regulators of primary transcription response in leukemia," *Science Advances*, vol. 2, Oct. 2016, DOI: <https://doi.org/10.1126/SCIAADV.1600760>.
- [52] J. Zuber et al., "RNAi screen identifies Brd4 as a therapeutic target in acute myeloid leukaemia," *Nature*, vol. 478, pp. 524–528, Oct. 2011, DOI: <https://doi.org/10.1038/NATURE10334>.
- [53] J. S. Patel, A. Berteotti, S. Ronsisvalle, W. Rocchia, and A. Cavigli, "Steered molecular dynamics simulations for studying protein-ligand interaction in cyclin-dependent kinase 5," *Journal of Chemical Information and Modeling*, vol. 54, pp. 470–480, Feb. 2014, DOI: https://doi.org/10.1021/CI4003574/SUPPL_FILE/CI4003574_SI_001.PDF.
- [54] N. Martella et al., "Bromodomain and extra-terminal proteins in brain physiology and pathology: BET-ing on epigenetic regulation," *Biomedicines*, vol. 11, p. 750, Mar. 2023, DOI: <https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES11030750>.
- [55] P. C. Do, E. H. Lee, and L. Le, "Steered molecular dynamics simulation in rational drug design," *Journal of Chemical Information and Modeling*, vol. 58, pp. 1473–1482, Aug. 2018, DOI: https://doi.org/10.1021/ACS.JCIM.8B00261/ASSET/IMAGES/MEDIUM/CI-2018-00261D_0001.GIF.
- [56] D. J. Owen et al., "The structural basis for the recognition of acetylated histone H4 by the bromodomain of histone acetyltransferase gcn5p," *The EMBO journal*, vol. 19, pp. 6141–6149, Nov. 2000, DOI: <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/19.22.6141>.
- [57] S. G. Smith and M. M. Zhou, "The bromodomain: A new target in emerging epigenetic medicine," *ACS chemical biology*, vol. 11, p. 598, Mar. 2016, DOI: <https://doi.org/10.1021/ACS-CHEMBIO.5B00831>.
- [58] J. Meslamani, S. G. Smith, R. Sanchez, and M. M. Zhou, "Structural features and inhibitors of bromodomains," *Drug discovery today. Technologies*, vol. 19, p. 3, Mar. 2016, DOI: <https://doi.org/10.1016/J.DDTEC.2016.09.001>.

Article citation:

G. Ropón-Palacios, M. Chenet-Zuta, J. Ramos-Galarza, A. Gervacio-Villarreal, K. Otazu, R. Cárdenas-Cárdenas, F. Casillas-Muñoz, "Dynamics and Energetics of a Bromodomain in complex with bromosporine from *Leishmania donovani*", *Rev. Colomb. Quim.*, vol. 52, no. 1, pp. 3-9, 2023. DOI: <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v52n1.110374>



Síntesis y actividad antiproliferativa de una mezcla de derivados de (+/-) 7-cloro-(4-tioalquilquinolina). Inducción de apoptosis y daño sobre el ADN/ARN

Resumen

Después de las enfermedades cardiovasculares, el cáncer, una patología no transmisible, ha sido considerado como la segunda causa de muertes cada año a nivel global y como la barrera más importante para aumentar la esperanza de vida en el siglo 21. Se han alcanzado avances de gran relevancia en su prevención y tratamiento; sin embargo, existe aún un largo camino por recorrer para alcanzar un tratamiento efectivo para cada tipo de cáncer. En este trabajo se describen enfoques de reposicionamiento y síntesis de moléculas híbridas con potencial actividad antineoplásica. Para obtener el aldehído intermedio clave, se empleó la metodología de oxidación de Dess-Martin, que fue acoplado con las cetonas correspondientes usando LDA; se generó así una mezcla racémica para cada uno de los compuestos híbridos propuestos. La actividad antiproliferativa *in vitro* de los compuestos finales se evaluó frente a ocho líneas celulares derivadas de tumores sólidos humanos, y cuatro líneas celulares no cancerosas. El compuesto **11d** resultó ser el más efectivo y con mayor índice de seguridad. Los resultados sugirieron que estos compuestos podrían bloquear el ciclo celular e inducir la apoptosis y la muerte en las células CCRF-CEM de forma dependiente de la dosis *in vitro*.

Synthesis and antiproliferative activity of a mixture (+/-) 7-chloro-(4-thioalkyl-quinoline) derivatives. Inducing apoptosis and DNA/RNA damage

Abstract

After cardiovascular diseases, cancer, a non-communicable pathology, has been considered the second cause of death each year globally and as the most important barrier to increasing life expectancy in the 21st century. Advances of great relevance have been made in its prevention and treatment, however, there is still a long way to go to achieve an effective treatment for each type of cancer. This paper describes approaches to reposicioning and synthesis of hybrid molecules with potential antineoplastic activity. To obtain the key intermediate aldehyde, the Dess-Martin oxidation methodology was used, which was coupled with the corresponding ketones using LDA. The final hybrid compounds were obtained as a racemic mixture. The *in vitro* antiproliferative activity of the final compounds was evaluated against eight cell lines derived from human solid tumors, and four non-cancerous cell lines. The compound **11d** turned out to be the most effective and with the highest safety index. The results suggested that these compounds could block the cell cycle and induce apoptosis and death in CCRF-CEM cells in a dose-dependent manner *in vitro*.

Síntese e atividade antiproliferativa de uma mistura de derivados de (+/-) 7-cloro-(4-tioalquilquinolina). Indução de apoptose e dano de DNA/RNA

Resumo

Depois das doenças cardiovasculares, o câncer, uma patologia não transmissível, tem sido considerado como a segunda causa de mortes a cada ano em todo o mundo e como a barreira mais importante para o aumento da expectativa de vida no século 21. Avanços de grande relevância têm sido feitos na sua prevenção e tratamento, no entanto, ainda há um longo caminho a percorrer para alcançar um tratamento eficaz para cada tipo de câncer. Este artigo descreve abordagens para o reposicionamento e síntese de moléculas híbridas com potencial atividade antineoplásica. Para a obtenção do aldeído intermediário chave, foi utilizada a metodologia de oxidação de Dess-Martin, que foi acoplada com as cetonas correspondentes usando LDA. Os compostos híbridos finais foram obtidos como uma mistura racêmica. A atividade antiproliferativa *in vitro* dos compostos finais foi avaliada contra oito linhagens celulares derivadas de tumores sólidos humanos e quatro linhagens celulares não cancerosas. O composto **11d** revelou-se o mais eficaz e com o maior índice de segurança. Os resultados sugeriram que estes compostos poderiam bloquear o ciclo celular e induzir apoptose e morte em células CCRF-CEM de forma dose-dependente *in vitro*.

Palabras clave: cáncer; ciclo celular; derivados sulfanilos; mezcla racémica.

Keywords: cancer; cell cycle; sulfanyl derivatives; racemic mixture.

Palavras-chave: câncer; ciclo celular; derivados sulfanilos; mezcla racémica.

Introducción

El cáncer es un término genérico empleado para definir a un grupo de enfermedades caracterizadas por el crecimiento y diseminación descontrolada de células anormales, que pueden afectar cualquier parte del organismo y que sin un tratamiento adecuado pueden provocar la muerte. Aunque las causas del desarrollo del cáncer no han sido completamente dilucidadas, se sabe que numerosos factores aumentan el riesgo, pues actúan de manera simultánea para iniciar y/o promover su crecimiento, incluidos muchos que son potencialmente evitables, como el consumo de tabaco, alcohol, el exceso de peso corporal y el sedentarismo, y otros que no lo son, por ejemplo, las mutaciones genéticas y las afecciones virales, entre otros factores. El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo y representó casi diez millones de muertes en 2020 [1]. La proyección de la Sociedad Americana del Cáncer estima que para 2023 se reportarán 1.958.310 nuevos casos, con un número de fallecidos en el orden de los 609.820. El tipo de cáncer que sufrirá un mayor incremento será el cáncer de próstata, con un 3 %, después de haber tenido una disminución en estas últimas dos décadas [2].

Se estima que existen dos causas del desarrollo anormal en cánceres humanos: la primera es la alteración de las vías de señalización en las células y la segunda es la interrupción del ciclo celular [3], [4]. La farmacorresistencia es considerada otra de las principales dificultades en la terapia del cáncer; puede desarrollarse en todos los tipos de cáncer y en estrategias terapéuticas como la inmunoterapia, la terapia molecularmente dirigida y la quimioterapia [5]. Son muchos los esfuerzos que se han hecho para reducir los efectos adversos durante la terapia contra el cáncer, entre ellos, la prevención de los efectos secundarios en las células y tejidos cercanos, el aumento de la acumulación de fármacos y la eficacia en la lesión, así como el desarrollo de nuevos sistemas de administración y focalización de fármacos [6]. Para alcanzar estos objetivos, un proceso que ha recibido gran atención en estos últimos tiempos es el relacionado con el “reposiciónamiento”, que consiste en encontrar nuevas indicaciones terapéuticas para los medicamentos utilizados clínicamente en el tratamiento de patologías diferentes al cáncer [7]-[11]. Otra estrategia alternativa para el desarrollo de nuevos fármacos es el enfoque de hibridación, que ha demostrado ser exitoso para el desarrollo de agentes biológicamente eficaces [12], [13]. El término “fármaco híbrido” generalmente se refiere a la combinación de dos o más moléculas biológicamente activas o dos grupos farmacofóricos de diferentes compuestos en una molécula. La combinación da como resultado una nueva molécula, ahora conocida como híbrida, que puede ser más potente, menos potente o idéntica a su compuesto precursor. En las moléculas híbridas, un conector puede estar presente (híbridos con enlazadores) o no (híbridos fusionados), o pueden estar fusionados (químicos) [14]-[19].

Como fragmento privilegiado, la quinolina es una molécula plana rígida, que se comporta como un farmacóforo presente en el núcleo de numerosos agentes fisiológicamente activos que muestran interesantes propiedades terapéuticas; por ejemplo, la cloroquina (CQ) 1, hidroxicloroquina (HCQ) 2, camptotecina 3, levatinib 4 [20]-[23] (Figura 1). Del mismo modo, cuando las quinolinas están constituidas en su estructura, con heteroátomos como el azufre, han resultado ser efectivas en modelos de enfermedades en donde su mecanismo de acción se ha asociado con la inhibición de la formación de β -hematina, inhibición de la adhesión, migración, e invasión celular, inducción de apoptosis, estrés oxidativo, por su acción antipalúdica y antituberculosa, como agentes hipocolesterolémicos, y por su actividad antiproliferativa contra células cancerosas [24]-[32].

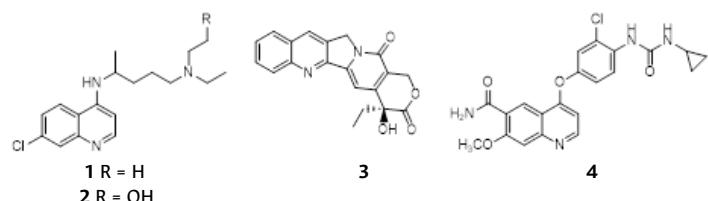


Figura 1. Moléculas con el núcleo de la quinolina con diferentes actividades biológicas.

Otro núcleo privilegiado está constituido por la indanona, que en combinación con aldehídos genera las arilidenindanonas, que son consideradas como las primas rígidas de las chalconas y se generan incorporando al sistema α,β -insaturado cetónico de chalconas un anillo cíclico de cinco miembros. Generalmente son sintetizadas a partir de 1-indanona y benzaldehídos por medio de una reacción aldólica, por ejemplo, los compuestos 5 y 6 con actividad para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y antineoplásicos, respectivamente [33], [34]. En la naturaleza encontramos algunas indanonas como la pterosina P 7 aislada del helecho de la especie *Pteridium aquilinum* [35]-[37], con actividad como antibacteriano, antiespasmódico, citotóxico, entre otras actividades [38], [39] (Figura 2).

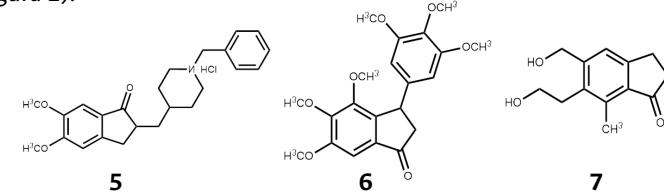


Figura 2. Moléculas con el núcleo de la 1-indanona con diferentes actividades biológicas.

En este trabajo presentamos el diseño y síntesis de nuevas moléculas que busca optimizar aún más los agentes anticancerígenos basados en la CQ; en ellas se modificó selectivamente la cadena lateral de la funcionalidad cuatro amino con un grupo que contiene azufre y la incorporación de indanonas metoxisustituidas (Figura 1). Seleccionamos este enfoque fundamentándose en el hecho de que a los análogos de CQ sustituidos por 4-sulfanilindanonas aún no les ha sido explorada en profundidad su actividad anticancerígena. Se pudo observar que algunos de ellos muestran actividad antiproliferativa más efectiva que la CQ y la indanona individualmente; en el estudio de su potencial mecanismo de acción se pudo observar que existe una acumulación significativa de células en fases G2/M, que se acompañó de un aumento de células con G0/G1, y una disminución de S, ADN y contenido de ARN. Además, los compuestos indujeron distintos valores sub-G1, que representan la población de células apoptóticas y muertas.

Materiales y métodos

Los puntos de fusión se determinaron en un fusiómetro Fisher-Johns^{MR} y no están corregidos. La cromatografía en capa fina (CCF) se llevó a cabo en placas Merck^{MR} sílica F254 de 0,255 mm y las manchas se visualizaron mediante fluorescencia UV a 254 nm. Los espectros IR se determinaron mediante un espectrofotómetro Perkin-Elmer^{MR} Spectrum two y se expresan en cm^{-1} . Los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C se realizaron usando un espectrómetro JEOL Eclipse^{MR} 270 (a 270 MHz para espectros de ^1H y 67,9 MHz para espectros de ^{13}C), usando CDCl_3 como solvente, y se reportan en ppm empleando como referencia el CHCl_3 residual (δ 7,25 para RMN ^1H y 77,0 para RMN ^{13}C , respectivamente). Los reactivos químicos se obtuvieron de Aldrich Chemical Co^{MR}, EE.UU. de Norteamérica. Todos los disolventes se destilaron y secaron de la manera habitual. El intermedio 8 ha sido reportado previamente [40].

Procedimiento general para la obtención de los derivados 2-{3-[(7-cloroquinolin-4-il) sulfanil]-1-hidroxipropil}-indanosustituida-2,3-dihidro-1H-inden-1-ona (11a-e)

Para la obtención del aldehído **9**, se disolvió el intermediario **8** (1 Eq) en 20 mL de diclorometano (DCM) seco, se agregó 10 Eq de bicarbonato de sodio (NaHCO_3), 1,2 Eq de reactivo de Dess-Martin (DMP), en 5 mL DCM seco; la mezcla se mantuvo con agitación constante por 30 min a temperatura ambiente y atmósfera de N_2 . Finalizada la reacción, se lavó con solución saturada de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (4×10 mL), solución saturada de NaHCO_3 (2×10 mL), y con agua destilada (2×10 mL). La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhídrico, se filtró y el solvente se eliminó a presión reducida [41]. Debido a su inestabilidad, el compuesto **9** se usó sin previa caracterización.

Paralelamente, se procedió a sintetizar la diisopropilamina de litio (LDA), que se obtuvo al hacer reaccionar diisopropilamina seca 1 Eq (la diisopropilamina se secó con hidruro de calcio a 120 °C y posterior destilación a presión normal) y n-butillitio 1 Eq (disuelto en tolueno 1,6 M), a -78 °C, en atmósfera de Ar y agitación continua por 20 min. Se agregó gota a gota, por medio de una inyectadora, la indanona respectiva **10a-e** (0,85 Eq) disuelta en 2 mL de THF seco en un tiempo de 15 min; seguidamente se adicionó el aldehído **9** disuelto en 1 mL de THF seco; la mezcla de reacción se agitó por 30 min hasta que la temperatura alcanzó los -50 °C [42]. La reacción se monitoreó por CCF; finalizada la reacción se adicionó al balón una solución saturada de cloruro de amonio (NH_4Cl , 10 mL), además de una mezcla de acetato de etilo AcOEt:agua (1:1) (15 mL). La fase orgánica se separó y se trató con Na_2SO_4 anhídrico; se filtró y evaporó el solvente a presión reducida. El sólido obtenido se purificó utilizando cromatografía de columna, con mezclas de ciclohexano:acetato de etilo (Cy:AcOEt); se obtuvo una mezcla de diasteroisómeros con rendimientos que van desde 55 % a un 75 % [43], [44].

(+/-)2-{10-[(7-cloroquinolin-4-il)sulfanil]-8-hidroxipropil}-2,3-dihidro-1H-inden-1-ona **11a**

Sólido cristalino blanco. Purificación por columna: 100% Cy, 85:15, 75:25, 65:35, 3:2 Cy:AcOEt. Rendimiento: 75%. Punto de fusión: 173 - 175 °C. Infrarrojo (cm^{-1}): 3406 (-OH), 2923 (C-H alifática), 1691 (C=O). RMN ^1H (270 MHz, CDCl_3) δ ppm: 2,02-2,09 (m, 4H, H9); 2,71-2,88 (m, 2H, H2); 3,17-3,42 (m, 8H, H3, 10); 3,98-4,04 (m, 1H, H8); 4,54-4,57 (m, 1H, H8); 4,73 (sa, 1H, OH); 7,17 (d, 1H, H3', J = 4,94 Hz); 7,26 (d, 1H, H3', J = 4,94 Hz); 7,31-7,48 (m, 6H, H4, 6, 6'); 7,60 (d, 1H, H6, J = 7,18 Hz); 7,71 (d, 1H, H7, J = 7,67 Hz); 7,76 (d, 1H, H7, J = 7,67 Hz); 7,98 (d, 1H, H5', J = 8,91 Hz); 7,98-8,02 (m, 3H, H5', 8' x 2); 8,65-8,69 (d, 1H, H2', J = 4,94 Hz). RMN ^{13}C (68 MHz, CDCl_3) δ ppm: 27,0(C3 ó 10); 27,6(C3 ó 10); 27,9(C3 ó 10); 29,8(C3 ó 10); 33,4(C9); 34,5(C9); 51,7(C2); 53,2(C2); 69,6(C8); 71,4(C8); 116,2(C3'); 123,9(C7); 124,2(C7); 125,0(C5' ó 8'); 125,1(C5' ó 8'); 126,6(C6' ó 4 ó 6); 126,7(C6' ó 4 ó 6); 127,3(C6' ó 4 ó 6); 127,3(C6' ó 4 ó 6); 127,6(C6' ó 4 ó 6); 127,9(C6' ó 4 ó 6); 128,9(C5' ó 8'); 135,2(C5'); 135,6(C5'); 135,8: 135,8; 136,4; 137,1; 147,9; 147,9; 148,0; 150,2(C2); 150,3(C2); 153,5; 153,4; 207,6(C1); 209,6(C1). F.M: $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{ClNO}_2\text{S}$, P.M: 383,89 g/mol.

(+/-)2-{10-[(7-cloroquinolin-4-il)sulfanil]-8-hidroxipropil}-5-metoxi-2,3-dihidro-1H-inden-1-ona **11b**

Sólido cristalino blanco. Purificación por columna: 100% Cy, 4:1:3:2, 1:1, 2:3, 3:7 Cy:AcOEt. Rendimiento: 65%. Punto de fusión: 158 - 160 °C. Infrarrojo (cm^{-1}): 3375 (-OH), 2925 (C-H alifática), 1677 (C=O), 1026 (ar C-O-C al). RMN ^1H (270 MHz, CDCl_3) δ ppm: 1,94-2,06 (m, 4H, H9); 2,65-2,86 (m, 2H, H2); 3,10-3,27 (m, 4H, H3); 3,35-3,41 (m, 4H, H10); 3,86 (s, 3H, OMe), 3,92-4,01 (m, 1H, H8); 4,46-4,53 (m, 1H, H8); 4,90 (sa, 1H, OH); 6,83-6,91 (m, 4H,

H4, 6); 7,18 (d, 1H, H3', J = 4,67 Hz); 7,22 (d, 1H, H3, J = 4,67 Hz); 7,45 (dd, 2H, H6', J = 1,97, 8,91 Hz); 7,62 (d, 1H, H7, J = 8,67 Hz); 7,68 (d, 1H, H7, J = 8,67 Hz); 7,97 (d, 1H, H5', J = 8,91 Hz); 7,99-8,02 (m, 3H, H5', 8' x 2); 8,65 (d, 1H, H2', J = 4,94 Hz); 8,68 (d, 1H, H2', J = 4,94 Hz). RMN ^{13}C (68 MHz, CDCl_3) δ ppm: 27,0(C3 ó 10); 27,7(C3 ó 10); 27,9(C3 ó 10); 33,3(C9); 34,6(C9); 51,6(C2); 53,2(C2); 55,8(OMe); 69,8(C8); 71,6(C8); 109,7(C4 ó 6); 109,9(C4 ó 6); 115,7(C3'); 116,0(C4 ó 6); 116,2(C4 ó 6); 125,0(C5' ó 8'); 125,1(C5' ó 8'); 125,6(C7); 125,9(C7); 127,3(C6'); 127,3(C6'); 128,9(C5' ó 8'); 130,4; 135,7; 148,0; 150,2(C2); 150,3(C2); 156,6; 157,4; 165,9; 166,2; 205,7(C1); 207,3(C1). F.M: $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{ClNO}_3\text{S}$, P.M: 413,92 g/mol.

(+/-)2-{10-[(7-cloroquinolin-4-il)sulfanil]-8-hidroxipropil}-4,5-dimetoxi-2,3-dihidro-1H-inden-1-ona **11c**

Sólido amarillo. Purificación por columna: 100% Cy, 95:5,9:1, 85:15, 4:1, 75:25, 7:3, 65:35, 3:2, 55:45, 1:1, 45:55, 2:3, 35:65, 3:7 Cy:AcOEt. Rendimiento: 60%. Punto de fusión: 130 - 132 °C. Infrarrojo (cm^{-1}): 3392 (-OH), 2927 (C-H alifática), 1693 (C=O), 1081 (ar C-O-C al). RMN ^1H (270 MHz, CD_3OD) δ ppm: 1,97-2,04 (m, 2H, H9); 2,20-2,27 (m, 2H, H9); 2,97-3,08 (m, 2H, H2); 3,23-3,25 (m, 4H, H3); 3,35-3,53 (m, 4H, H10); 3,88 (s, 3H, OMe); 3,94 (s, 3H, OMe); 4,18-4,21 (m, 2H, H8); 4,39-4,42 (m, 1H, OH); 7,12 (d, 2H, H6, J = 8,42 Hz); 7,45 (d, 2H, H7, J = 8,40 Hz); 7,75-7,77 (m, 4H, H3', 6'); 8,05 (d, 2H, H8', J = 1,97 Hz); 8,31 (d, 2H, H5', J = 8,88 Hz); 8,77 (d, 2H, H2', J = 5,70 Hz). RMN ^{13}C (68 MHz, CD_3OD) δ ppm: 25,9(C3 ó 10); 27,9(C3 ó 10); 31,7(C9); 52,4(C2); 55,6(OMe); 59,3(OMe); 70,7(C8); 112,9(C6); 115,9(C3'); 119,9(C7); 122,7(C8'); 124,6; 125,6(C5'); 128,6(C6'); 130,9; 145,3; 147,1(C2'); 158,3; 206,2(C1). F.M: $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{ClNO}_4\text{S}$, P.M: 443,94 g/mol.

(+/-)2-{10-[(7-cloroquinolin-4-il)sulfanil]-8-hidroxipropil}-4,7-dimetoxi-2,3-dihidro-1H-inden-1-ona **11d**

Sólido marrón. Purificación por columna: 100% Cy, 4:1, 7:3, 3:2, 55:45, 1:1, 4:3 Cy:AcOEt. Rendimiento: 69%. Punto de fusión: 143 - 145 °C. Infrarrojo (cm^{-1}): 3243 (-OH), 2921 (C-H alifática), 1695 (C=O), 1026 (ar C-O-C al). RMN ^1H (270 MHz, CDCl_3) δ ppm: 2,04-2,10 (m, 4H, H9); 2,62-2,83 (m, 2H, H2); 2,98-3,15 (m, 4H, H3); 3,30-3,46 (m, 4H, H10); 3,82 (s, 3H, OMe); 3,89 (s, 3H, OMe); 3,96-4,12 (m, 1H, H8); 4,40-4,55 (m, 1H, H8); 4,94 (sa, 1H, OH); 6,68 (d, 1H, H5, J = 8,91 Hz); 6,73 (d, 1H, H5, J = 8,91 Hz); 6,97 (d, 1H, H6, J = 8,64 Hz); 7,01 (d, 1H, H6, J = 8,64 Hz); 7,40-7,42 (m, 2H, H3'); 7,53 (dd, 2H, H6', J = 9,13 Hz); 8,06 (d, 2H, H5', J = 8,88 Hz); 8,27 (sa, 2H, H8'); 8,68 (d, 2H, H2', J = 5,43 Hz). RMN ^{13}C (68 MHz, CDCl_3) δ ppm: 24,3(C3 ó 10); 26,2(C3 ó 10); 27,3(C3 ó 10); 28,1(C3 ó 10); 33,2(C9); 34,3(C9); 51,5(C2); 53,2(C2); 56,0(OMe); 56,1(OMe); 69,8(C8); 71,4(C8); 109,7(C5); 110,1(C5); 115,5(C3'); 117,4(C6); 117,8(C6); 124,8(C5' ó 8'); 125,1(C5' ó 8'); 125,4(C5' ó 8'); 126,1(C5' ó 8') 128,6(C6'); 128,7(C6'); 143,9; 146,7(C2'); 150,3; 150,6; 151,8; 152,1; 207,3(C1). F.M: $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{ClNO}_4\text{S}$, P.M: 443,94 g/mol.

(+/-)2-{10-[(7-cloroquinolin-4-il)sulfanil]-8-hidroxipropil}-5,6-dimetoxi-2,3-dihidro-1H-inden-1-ona **11e**

Sólido amarillo. Purificación por columna: 100% Cy, 4:1,7:3, 3:2, 55:45, 1:1, 45:55, 2:3, 35:65, 3:7 Cy:AcOEt. Rendimiento: 55%. Punto de fusión: 142 - 143 °C. Infrarrojo (cm^{-1}): 3263 (-OH), 2923 (C-H alifática), 1687 (C=O), 1030 (ar C-O-C al). RMN ^1H (270 MHz, CDCl_3) δ ppm: 1,94-2,04 (m, 4H, H9); 2,61-2,73 (m, 1H, H2); 2,84-2,88 (m, 1H, H2); 3,04-3,28 (m, 4H, H3); 3,37-3,42 (m, 4H, H10); 3,84 (s, 3H, OMe); 3,89 (s, 3H, OMe); 3,91-3,99 (m, 1H, H8); 4,46-4,52 (m, 1H, H8); 4,87 (sa, 1H, OH); 6,83 (s, 1H, H4); 6,87 (s, 1H, H4); 7,08 (s, 1H, H7); 7,14 (s, 1H, H7); 7,19 (d, 1H, H3', J = 4,70 Hz); 7,27 (d, 1H, H3', J = 4,70 Hz); 7,45 (dd, 2H, H6', J = 1,73, 8,91 Hz); 7,99 (d, 1H, H5', J = 8,88 Hz); 8,01-8,03 (m, 3H, H5', 8' x 2); 8,65

(d, 1H, H2', J = 4,70 Hz); 8,69 (d, 1H, H2', J = 4,70 Hz). RMN ^{13}C (68 MHz, CDCl_3) δ ppm: 27,0(C3); 27,5(C3); 27,9(C10); 29,6(C10); 33,3(C9); 34,7(C9); 51,8(C2); 53,2(C2); 56,2(OMe); 56,3(OMe); 69,9(C8); 71,6(C8); 104,4(C7); 104,6(C7); 107,4(C4); 107,6(C4); 116,2(C3'); 116,2(C3'); 125,0(C5'); 125,1; 127,3(C6'); 127,3(C6'); 128,9(C8'); 129,0; 129,8; 135,8; 135,8; 148,0; 149,1 149,8; 150,0; 150,1; 150,2(C2'); 150,2(C2'); 156,2; 156,5; 206,0(C1); 207,6(C1). F.M: $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{ClNO}_4\text{S}$, P.M: 443,94 g/mol.

Actividad biológica

Líneas celulares

Todas las líneas celulares fueron suministradas por la American Tissue Culture Collection (ATCC). La línea celular A549 es derivada de adenocarcinoma de pulmón. Las líneas celulares MRC-5 y BJ se utilizaron como control no tumoral y representan fibroblastos humanos. MRC-5 LD y BJLD son líneas celulares de fibroblastos de pulmón humano resistentes a la doxorubicina. La línea CCRF-CEM se deriva de la leucemia linfoblástica T, con una alta químicosensibilidad, mientras que K562 representa células de una muestra de paciente con leucemia mieloide aguda con translocación bcr-abl. La sublínea resistente a daunorubicina de células CCRF-CEM (CEM-DNR bulk) y la sublínea resistente a paclitaxel K562-TAX fueron seleccionadas mediante el cultivo de líneas celulares maternas en concentraciones crecientes de daunorubicina o paclitaxel, respectivamente. Las células CEM-DNR sobreexpresan MRP-1 y proteína P-glicoproteína, mientras que las células K562-TAX sobreexpresan solo la glicoproteína P. Ambas proteínas pertenecen a la familia de transportadores ABC y están implicadas en el fenómeno primario y/o adquirido de resistencia a múltiples fármacos. La línea celular U2OS se deriva de osteosarcoma, HCT116 es una línea celular tumoral colorrectal y su contraparte (HCT116p53-/-, Horizon Discovery Ltd, Reino Unido) es un modelo de cánceres humanos con mutación del gen p53 que frecuentemente es asociada con mal pronóstico [45], [46]. Las células se mantuvieron en matraces plásticos nunc/corning de 80 cm^2 para cultivo de tejido y se cultivaron en un medio de cultivo celular de acuerdo con las recomendaciones ATCC u Horizon (DMEM/RPMI 1640 con 5 g/L de glucosa, 2 mM de glutamina, 100 U/mL de penicilina, 100 mg/mL de estreptomicina, 10% de suero fetal de ternera y NaHCO_3) [45]-[48].

Ensayo de citotoxicidad empleando MTS

La actividad de los compuestos se determinó utilizando 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (MTS) y se realizó en el Instituto de Medicina Molecular y Traslacional mediante una plataforma robótica (High-ResBiosolutions). Las suspensiones celulares se prepararon y diluyeron de acuerdo con el tipo de célula en particular y la densidad celular objetivo esperado (25000-35000 células/mL según las características de crecimiento celular). Las células se añadieron mediante pipeta automática (30 μL) en placas de microtitulación de 384 pozos. Todos los compuestos ensayados se disolvieron en DMSO al 100% y se añadieron diluciones cuádruples de la concentración de ensayo prevista en alícuotas de 0,15 μL en el momento cero a los pozos de la placa de microtitulación mediante el manipulador de líquidos sin contacto eco-acústico Echo550 (Labcyte^{MR}). Los experimentos se realizaron en duplicados y tres réplicas biológicas al menos. Las células se incubaron con los compuestos ensayados durante 72 h a 37 °C, en una atmósfera de CO_2 al 5% al 100% de humedad. Al final del período de incubación, las células se analizaron mediante la prueba MTS. Las alícuotas (5 μL) de la solución madre MTS se pipetearon en cada pozo y se incubaron durante 1-4 h adicionales. Después de este período de incubación, la densidad óptica (DO) se midió a 490 nm con un lector Envision (PerkinElmer^{MR}). La supervivencia de las células tumorales (SCT) se calculó mediante la siguiente ecuación: SCT = (pozo expuesto a DOdrug/posos DOcontrol medios) \times 100%.

El valor de Cl_{50} , la concentración compuesta que es letal para el 50% de las células tumorales, se calculó a partir de las curvas de dosis-respuesta apropiadas en el software Dotmatics [45]-[48].

Análisis del ciclo celular y de la apoptosis

Las células CCRF-CEM se sembraron a una densidad de 1×10^6 células por mL en placas de seis pozos (TTP) y se cultivaron con compuestos en concentraciones correspondientes a 1 x ó 5 x valor Cl_{50} . Junto con las células tratadas con compuestos, se recolectó una muestra tratada con vehículo en el mismo punto de tiempo. Después de 24 h, las células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato frío (PBS) y se fijaron en etanol al 70% añadido gota a gota y almacenado durante la noche a -20 °C. Posteriormente, las células se lavaron en tampón de citrato hipotónico, se trataron con RNasa (50 $\mu\text{g/mL}$) y se tiñeron con yoduro de propidio. Para la medición se utilizó citometría de flujo utilizando un láser de haz único de 488 nm (Becton Dickinson^{MR}). El ciclo celular fue analizado por el software ModFitLT (Verity^{MR}), y la apoptosis se midió en un modelo logarítmico que expresa el porcentaje de partículas con contenido de propidio inferior al de las células en la fase G0/G1 (<G1) del ciclo celular. La mitad de la muestra se utilizó para el marcado de anticuerpos pH3Ser10 (Sigma^{MR}) y el posterior análisis de citometría de flujo de las células en mitosis [46].

Análisis de incorporación de BrDU

Las células se cultivaron y procesaron como se describe en el método anterior [45]-[48]. Antes de la cosecha, se agregó 5-bromo-2-deoxiuridina (BrDU) 10 μM a las células para el marcado de pulsos durante 30 min. Luego, las células se lavaron con PBS y se fijaron con etanol frío al 70% de -20 °C y se almacenaron en un congelador durante la noche. Antes del análisis, las muestras se incubaron en hielo durante 30 min, se lavaron una vez con disolución salina tamponada con fosfato (PBS) y se volvieron a suspender en HCl 2 M durante 30 min a temperatura ambiente (Ta) para desnaturalizar su ADN. Después de la neutralización con una solución de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (bórax) 0,1 M, las células se lavaron con PBS que contenía 0,5% de Tween-20 y 1% de albúmina de suero bovino (BSA). A continuación, se realizó la tinción con anticuerpo primario anti-BrDU (Exbio) durante 30 min a Ta en la oscuridad. Luego, las células se lavaron con PBS y se tiñeron con anticuerpos secundarios anti-ratón-FITC (Sigma^{MR}) a Ta y en la oscuridad. Después de otro lavado con PBS e incubación con yoduro de propidio (0,1 mg/mL) y RNasa A (0,5 mg/mL) durante 1 h a Ta en la oscuridad, las células se analizaron mediante citometría de flujo utilizando un láser de haz único de 488 nm (FACSCalibur, Becton Dickinson^{MR}, Franklin Lakes, NJ, EE.UU).

Análisis de incorporación de BrU

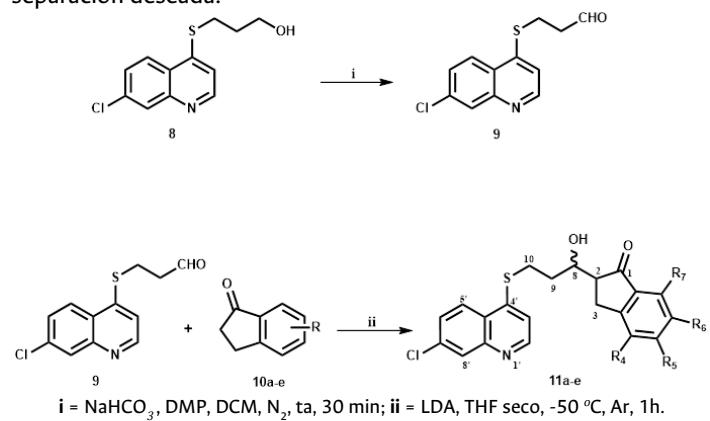
Las células se cultivaron y trataron como se describió anteriormente [45]-[48]. Antes de la cosecha, siguió el etiquetado de pulsos con 1 mM de 5-bromouridina (BrU) durante 30 min. Las células se fijaron en paraformaldehído tamponado al 1% con NP-40 al 0,05% a Ta durante 15 min, y luego se almacenaron a 4 °C durante la noche. Antes de la medición, se lavaron con glicina al 1% en PBS, se lavaron con PBS nuevamente y se tiñeron con anticuerpos primarios anti-BrDU de reacción cruzada a BrU (Exbio) durante 30 min a Ta en la oscuridad. A partir de este punto, el experimento se realizó exactamente como en el método anterior.

Resultados y discusión

Síntesis

Para la síntesis de los derivados **11a-e**, se realizaron varios intentos a fin de alcanzar el aldehído respectivo **9**; entre los procedimientos empleados se mencionan diferentes agentes oxidantes, como el ácido 2-iodoxibenzoico (IBX), ácido 2-iodobenzoico estabilizado (SIBX), reacción de Swern y el reactivo de Dess-Martin (DMP);

sin embargo, el mejor resultado fue encontrado con el reactivo de DMP, con el cual se obtuvo el compuesto **9** (Figura 3); debido a su inestabilidad no fue posible su purificación, por lo que se usó sin caracterización previa en el siguiente paso de reacción. La reacción de condensación se realizó con diferentes indanonas **10a-e**, empleando como base di-isopropilamina de litio (LDA), en tetrahidrofurano (THF) seco, atmósfera de Ar, a una temperatura de -78 °C. La reacción se completa en un período de 50 min aproximadamente, con rendimientos que van desde 55 a 75%. Obtenida la mezcla de diasteroisómeros, se realizaron intentos para separar dicha mezcla, por medio de una columna chromatográfica, en donde se elevó progresivamente la polaridad de la fase móvil, pero no se obtuvo la separación deseada.



No	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇
11a	H	H	H	H
11b	H	OCH ₃	H	H
11c	OCH ₃	OCH ₃	H	H
11d	OCH ₃	H	H	OCH ₃
11e	H	OCH ₃	OCH ₃	H

El compuesto 2-[10-[(7-cloroquinolín-4-il)sulfanil]8-hidroxipropiol]5,6-dimetoxi-2,3-dihidro-1H-inden-1-ona (**11e**) se empleará como modelo para ilustrar la discusión. Este compuesto se obtuvo como una mezcla de diasteroisómeros con una fórmula molecular C₂₃H₂₂ClNO₄S, como un sólido amarillo, soluble en DCM, su punto de fusión fue de 142-143 °C y se obtuvo con un rendimiento de 55%. En el espectro de IR se observaron: una banda intensa a 3263 cm⁻¹, correspondiente al estiramiento O-H, a 2923 cm⁻¹ aparece una banda característica de estiramientos C-H de la zona alifática, a 1687 cm⁻¹ una banda típica de carbono carbonílico C=O de cetona, y a 1030 cm⁻¹ la banda correspondiente a los estiramientos C-O-C de los grupos metoxi presentes en la molécula. Cuando se procede a analizar el espectro de RMN ¹H, se observa que varias señales aparecen duplicadas, lo que se atribuye a que el compuesto se encuentra bajo la forma de una mezcla de diasteroisómeros. El espectro nos muestra a campo alto un multiplete con un desplazamiento químico desde 1,94 a 2,04 ppm, que integra para 4H, que se asignó a los protones enlazados al carbono nueve; entre 2,61-2,73 y 2,84-2,88 ppm se observan dos multipletes que integran para 1H cada uno, asignado al protón sobre el carbono dos del anillo de la indanona, entre 3,04-3,28 ppm se presenta un multiplete que integra para 4H, que fue asignado a los protones unidos al carbono tres de la indanona. Entre 3,37-3,42 ppm se tiene un multiplete que integra para 4H asignados a los protones sobre el carbono diez en la cadena alifática. A 3,84 y 3,89 ppm se observan dos singletes que integran para 6H cada uno, que fueron asignados a los grupos metoxi en las posiciones cinco y seis del anillo de la indanona. A 3,91-3,99 y 4,46-4,52 ppm se observan dos multipletes que integran para 1H cada uno, los cuales fueron asignados al protón del carbono ocho presente en la cadena alifática. Y, para finalizar, en la zona alifática se

muestra un singlete ancho a 4,87 ppm, que se asigna al protón del grupo hidroxilo en el compuesto **11e**. A campo bajo se presentan seis señales que se asignan a siete protones aromáticos. A 6,83 y 6,87 ppm se presentan dos singletes que integran cada uno para 1H, asignado al protón cuatro, y seguidamente, a 7,08 y 7,14 ppm, otros dos singletes que integran para 1H cada uno asignado al protón siete presente en el anillo de la indanona. En cuanto a los protones del anillo quinolínico, las señales se encuentran duplicadas, pero no se observa una diferencia significativa en lo que respecta a los desplazamientos y la multiplicidad, al ser comparada con los espectros de los compuestos quinolínicos previamente discutidos.

En el espectro de RMN ¹³C se confirma igualmente la presencia de los productos de condensación, con base en la presencia de cuatro señales a 27,0 y 27,5 ppm, que se asigna al carbono tres del anillo de la indanona, a 51,8 y 53,2 ppm el carbono dos, a 69,9 y 71,6 ppm las señales correspondientes al carbono ocho y en 206,0 y 207,6 ppm las señales correspondientes al C carbonílico de la cetona. Todas estas señales se encuentran duplicadas por presentar una mezcla de diasteroisómeros en la muestra. En el espectro se observan 38 señales totales pertenecientes a los carbonos no equivalentes en el compuesto **11e**, dentro de lo que cabe mencionar que dos corresponden con los carbonos metílicos de los grupos metoxi, seis se corresponden con carbonos metilénicos, 16 con carbonos metínicos y 14 señales que indican el número de carbonos cuaternarios. A 27,9 y 296 ppm se muestran dos señales asignadas al carbono diez. A 33,3 y 34,7 ppm se observan las señales asignadas al carbono nueve. A 56,2 y 56,3 ppm se tienen las señales de los grupos metoxi que se encuentran unidos en las posiciones cinco y seis del anillo de la indanona. En lo que respecta a la zona aromática se evidencian dos señales en 104,4 y 104,6 ppm asignada al carbono siete y a 107,4 y 107,6 ppm se tienen dos señales que son asignadas al carbono cuatro, correspondientes al anillo de la indanona. Las señales asignadas a los protones metínicos del anillo quinolínico no presentan diferencias significativas en los desplazamientos cuando se comparan con los del compuesto reportados previamente. En cuanto a las diferencias de los desplazamientos de los carbonos en la estructura de los derivados **11a-e**, se observa diferencia en los desplazamientos y multiplicidad que se atribuye al patrón de sustitución presente sobre el anillo aromático de la indanona. Estas asignaciones inequívocas se realizaron apoyándose además en el análisis de los espectros DEPT 135°, COSY, HETCOR.

Actividad citotóxica

La actividad citotóxica *in vitro* de los compuestos finales **11a-e** se evaluó después de tres días de incubación frente a ocho líneas celulares derivadas de tumores sólidos humanos, incluidos carcinomas de pulmón (células A549) y colon (HCT116 y HCT116p53^{-/-}), así como líneas celulares de leucemia (CCRF-CEM, CEM-DNR, K562 y K562-TAX) y osteosarcoma (células U2OS). A modo de comparación, se usaron líneas celulares resistentes a la doxorubicina de fibroblastos BJ y MRC-5 no malignos y de fibroblastos BJLD y MCR-5LD. Las concentraciones que inhiben el crecimiento celular en un 50% (CI₅₀) se determinaron mediante una tinción metabólica cuantitativa con 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (MTS) y se resumen en la Tabla 1.

Los resultados mostraron que la línea celular CCRF-CEM fue la más sensible a los derivados de **11a, c-d**. Con la excepción del compuesto **11d** con un valor de CI₅₀ en el rango de 11,2 μ M, los compuestos fueron menos activos contra sus homólogas CEM-DNR resistentes a la daunorubicina. Con algunas excepciones, en el caso de las células K562 y la correspondiente línea celular K562-TAX resistente a taxol, se observó una diferencia significativa para el derivado **11b** con un valor dos veces mayor contra K562-TAX que la línea celular K562. Por otro lado, con la excepción de **11b** y **d** los compuestos

Tabla 1. Actividad citotóxica (IC_{50} , μM) de derivados de 11a-e después de 72 h de incubación con líneas celulares humanas cancerosas y no cancerosas.

No	A549	BJ	BJLD	CCRF-CEM	CEM-DNR	HCT116	HCT116-p53	K562	K562-TAX	MRC-5	MRC5-LD	U2OS
11a	38,19	48,72	43,16	5,5	41,27	25,27	24,01	16,63	33,93	35,32	34,65	9,72
11b	30,51	37,65	39,23	12,15	27	>50	>50	>50	21,07	37,07	37	>50
11c	32,41	>50	ND	4,09	14,97	>50	>50	5,27	13,11	>50	>50	33,03
11d	15,14	25,04	23,88	3,81	11,2	17,47	17,35	9,6	11,23	30,01	24,31	7,36
11e	>50	>50	ND	4,13	23,16	>50	>50	4,6	23,29	>50	ND	>50

A549: adenocarcinoma de pulmón, MRC-5 y BJ: células no tumorales de fibroblastos humanos, MRC-5 LD y BJLD: fibroblastos de pulmón humano resistentes a la doxorubicina, CCRF-CEM: leucemia linfoblástica T, K562: leucemia mieloide aguda con translocación bcr-abl, CCRF-CEM: sublínea celular de leucemia resistente a daunorubicina, K562-TAX: sublínea celular de leucemia mieloide aguda resistente a paclitaxel, U2OS: línea celular de osteosarcoma, HCT116: línea celular tumoral colorrectal, HCT116p53-/-: línea celular tumoral colorrectal con mutación en el gen p53.

11a, c y e fueron en el rango de dos y cinco veces más potentes contra K562 que la línea celular resistente K562-TAX. Estos resultados indican que otros mecanismos, además de la glicoproteína P, que es común para ambas líneas celulares, son responsables de la resistencia.

A excepción del derivado 11d, el resto de los compuestos pueden considerarse inactivos frente al adenocarcinoma de pulmón humano A549 ($IC_{50} > 15 \mu M$). La actividad citotóxica de todos los compuestos probados contra las líneas celulares de carcinoma de colon (HCT116 y HCT116p53-/-) fue similar, poco activos. Se observó un ligero aumento en la actividad citotóxica de los compuestos 11a y d frente a células cancerosas humanas de osteosarcoma (U2OS) ($IC_{50} 9,72$ y $7,36 \mu M$), respectivamente. Los compuestos 11a-e se pueden considerar como no tóxicos en las líneas celulares no cancerosas BJ, MRC-5, BJLD y MRC-5LD.

A partir de estos resultados, es obvio, con algunas excepciones, que el derivado 11d exhibió una citotoxicidad selectiva más pronunciada (en comparación con las células BJ y MRC-5) contra las células cancerosas humanas de HCT116 (cáncer colorrectal humano con p53 de tipo salvaje) y HCT116p53-/- (cáncer colorrectal humano con p53 eliminado), así como líneas celulares de leucemia (CCRF-CEM, CEM-DNR, K562 y K562-TAX), pulmón (A549) y células de osteosarcoma (U2OS). También se detectó una buena selectividad

en los compuestos 11c y 11e para células cancerosas leucémicas y colorrectales (con y sin delección de p53) (en comparación con MRC-5). Con respecto al compuesto 11a, exhibió una selectividad moderada (en comparación con las líneas celulares BJ y MRC-5) para las células A549; sin embargo, presentó buena selectividad (en comparación con las células BJ y MRC-5) para las células cancerosas derivadas de pulmón, carcinoma de colon, así como en células leucémicas y de osteosarcoma.

Como era de esperar, la citotoxicidad de los compuestos evaluados se observa significativamente afectada por el estado de oxidación del átomo de azufre unido a la posición C-4 de la quinolína y por la oxidación del nitrógeno quinolínico, como ha sido reportado previamente [49], y por el número y patrón de sustitución en que se encuentran los grupos metoxilos en el núcleo de la 1-indanona.

Análisis del ciclo y muerte celular

Por otro lado, queríamos averiguar si los compuestos 11a-e pueden detener el ciclo celular de las células cancerosas, como se reportó anteriormente para la cloroquina y análogos [49]- [54]. Con el fin de obtener una descripción más detallada de la actividad biológica de los derivados estudiados, realizamos un análisis del ciclo de las células CCRF-CEM más sensibles después de 24 h de incubación con los nuevos derivados de 7-cloro-(4-tioalquilquinolína) (Tabla 2).

Tabla 2. Citotoxicidad de los compuestos 11c-e en el ciclo celular en linfoblastos CCRF-CEM.

n.º	Conc. (μM)	% población de células totales				G2/M	>G2/M	M ^a	ADN ^b Síntesis	ARN ^b Síntesis
		Sub-G1 Apoptosis	G0/G1	S						
11c	4,09	3,14	39,78	33,66		23,56	10,82	2,02	26,37	17,46
	20,5	10,63	29,48	42,88		27,64	12,99	6,08	2,53	16,67
11d	3,81	3,36	37,93	43,41		18,66	9,71	1,87	2,76	19,4
	19,1	7,59	27,73	39,33		32,94	10,56	8,29	24,01	24,95
11e	4,13	5,09	35,7	47,92		16,38	14,2	1,42	39,66	16,23
	20,7	5,83	49,76	30,92		19,32	9,11	2,12	15,47	20,85
Control	0	2,89	36,23	44,01		19,77	10,01	1,8	39,62	21,56

^a Mitosis Fosfo-Histona3 (Ser10).

^b Síntesis de ADN y ARN en linfoblastos CCRF-CEM (% de células positivas). Se usó análisis de citometría de flujo para cuantificar la distribución del ciclo celular y el porcentaje de células apoptóticas. La suma del porcentaje de G0/G1, S y G2/M es igual al 100%.

Se determinó el efecto de los compuestos en la distribución del ciclo celular para obtener información sobre el mecanismo de su actividad antiproliferativa. Como puede verse en la Tabla 2, una exposición de 24 h de células CCRF-CEM a concentraciones supresoras del crecimiento de derivados de 7-cloro-(4-tioalquilquinolína) ($1 \times IC_{50}$ y $5 \times IC_{50} \mu M$) resultó en una acumulación significativa de células en fase G2/M que se acompañó de un aumento de células con G0/G1 y una disminución del contenido de S, ADN y ARN. Todos los compuestos probados exhibieron un aumento dependiente de la dosis en la población de células mitóticas (pH3Ser10 positivas). Por ejemplo, en comparación con el control, el porcentaje de células en la fase G2/M aumentó mediante el tratamiento con $5 \times IC_{50} \mu M$ de compuestos durante 24 h (Tabla 2). Los compuestos también

indujeron distintos valores sub-G1, que representan la población de células apoptóticas y muertas. Como se muestra en la Tabla 2, hubo un marcado aumento en el sub-G1 comparado con el valor de 2,89 en las células no tratadas. La 5-bromo-2-desoxiuridina (BrDU) se incorpora al ADN recién sintetizado y, por lo tanto, el marcado de pulsos de 5-bromouridina (BrU) se usa comúnmente como marcador de proliferación. La baja incorporación de BrDU y BrU en el ADN o el ARN, respectivamente, de las células tratadas con todos los compuestos a $5 \times IC_{50}$ reflejó la inhibición de la síntesis de ADN y ARN, lo que indica cambios apoptóticos irreversibles. El porcentaje de células BrU negativas que incorporan 5-bromouridina es proporcional a la actividad transcripcional de las células CCRF-CEM.

Estos resultados sugirieron que estos compuestos podrían bloquear el ciclo celular e inducir la apoptosis y la muerte en las células CCRF-CEM de forma dependiente de la dosis *in vitro*.

Conclusiones

En este trabajo describimos un método conveniente para la síntesis de una mezcla de diasteroisómeros derivados de [(7-cloroquinolín-4-il)tol]alquil-1-indanones **11a-e** a través de la reacción de [(7-cloroquinolín-4-il)tol]alcohol, previa oxidación con el reactivo de Dess-Martin para obtener el aldehído respectivo, que fue acoplado con las 1-indanonas correspondientes usando LDA. Los compuestos fueron evaluados por su potencial acción como citotóxicos con efecto *in vitro* a concentraciones micromolares contra las células derivadas del carcinoma de pulmón y colorrectal. Los compuestos, con excepción de **11b**, muestran una buena selectividad sobre la proliferación de líneas celulares cancerosas con baja toxicidad para los fibroblastos MRC o BJ no malignos. Se observó una baja citotoxicidad frente a líneas celulares de cáncer multirresistentes (CEM-DNR, K562-TAX), lo que sugiere que son sustratos para transportadores farmacológicos. A concentraciones más altas ($5 \times \text{IC}_{50}$) de los compuestos **11c-e**, contra la línea celular de cáncer CCRF-CEM, observamos la acumulación de las células en la fase celular G0/G1, la inhibición de la síntesis de ADN y ARN y la inducción de la apoptosis. El mecanismo molecular de este último efecto requiere investigación adicional.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Instituto de Investigaciones Farmacéuticas, al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela, así como al Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación de Venezuela, proyectos 20220PGP65, 2023PGP99, a la Escuela de Medicina, Universidad de Especialidades Espíritu Santo (UEES), 2022-MED-001, y the Czech Ministry of Education, Youth and Sports (CZ-OPENSCREEN-LM2018130, and EATRIS-CZ-LM2018133), por sus apoyos parciales al financiamiento de esta investigación.

Referencias

- [1] World Health Organization (WHO), 2002. DOI: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
- [2] R. L. Siegel, K. D. Miller, N. S. Wagle, and A. Jemal, "Cancer statistics, 2023", *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 73, no. 1, pp. 17-48, 2023. DOI: <https://doi:10.3322/caac.21763>
- [3] M. Xi, T. Chen, C. Wu, X. Gao, Y. Wu, X. Luo, K. Du, L. Yu, T. Cai, R. Shen, and H. Sunet, "CDK8 as a therapeutic target for cancers and recent developments in discovery of CDK8 inhibitors", *Eur. J. Med. Chem.*, no. 164, pp. 77-91, 2019. DOI: <https://doi:10.1016/j.ejmech.2018.11.076>.
- [4] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "Hallmarks of cancer: The next generation", *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 646-674, 2011. DOI: <https://doi:10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- [5] F. S. Liu, "Mechanisms of chemotherapeutic drug resistance in cancer therapy-a quick review", *Taiwan. J. Obstet. Gynecol.*, vol. 48, no. 3, pp. 239-244, 2009. DOI: [https://doi:10.1016/S1028-4559\(09\)60296-5](https://doi:10.1016/S1028-4559(09)60296-5).
- [6] J. Iqbal, B. A. Abbasi, T. Mahmood, S. Kanwal, B. Ali, S. A. Shah, and A. T. Khalil, "Plant-derived anticancer agents: a green anticancer approach", *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, vol. 7, no. 12, pp. 1129-1150, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2017.10.016>.
- [7] M. A. A. Al-Bari, "Chloroquine analogues in drug discovery: new directions of uses, mechanisms of actions and toxic manifestations from malaria to multifarious diseases", *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 70, no. 6, pp. 1608-1621, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/dkv018>.
- [8] D. Plantone and T. Koudriavtseva, "Current and future use of chloroquine and hydroxychloroquine in infectious, immune, neoplastic, and neurological diseases: A mini-review", *Clin. Drug Invest.*, vol. 38, no. 8, pp. 653-671, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40261-018-0656-y>.
- [9] A. M. Shukla and A. W. Shukla, "Expanding horizons for clinical applications of chloroquine, hydroxychloroquine, and related structural analogues", *Drugs Context.*, vol. 8, no. 2019-9-1, 2019. DOI: <https://doi.org/10.7573/dic.2019-9-1>.
- [10] C. Verbaanderd, H. Maes, M. B. Schaaf, V. P. Sukhatme, P. Pantziarka, V. Sukhatme, P. Agostinis, and G. Bouche, "Repurposing Drugs in Oncology (ReDO)-chloroquine and hydroxychloroquine as anti-cancer agents", *Ecancermedicalscience*, vol. 11, no. 781, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3332/ecancer.2017.781>.
- [11] P. Samaras, M. Tusup, T. D. L. Nguyen-Kim, B. Seifert, H. Bachmann, R. von Moos, A. Knuth, and S. Pascolo, "Phase I study of a chloroquine-gemcitabine combination in patients with metastatic or unresectable pancreatic cancer", *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 80, no. 5, pp. 1005-1012, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00280-017-3446-y>
- [12] S. Fortin and G. Bérubé, "Advances in the development of hybrid anticancer drugs", *Expert Opin. Drug Discov.*, vol. 8, no. 8, pp. 1029-1047, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1517/17460441.2013.798296>.
- [13] J. A. Marinho, D. S. Martins Guimaraes, N. Glanzmann, G. de Almeida-Pimentel, K. I. da Cost Nunes, H. M. Gualberto-Pereira, M. Navarro, F. de Pilla-Varotti, D. A. da Silva, and C. Abramo, "In vitro and in vivo antiplasmodial activity of novel quinoline derivative compounds by molecular hybridization", *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 215, 113271, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113271>.
- [14] R. Morphy and Z. Rankovic, "Designed multiple ligands. An emerging drug discovery paradigm", *J. Med. Chem.*, vol. 48, no. 21, pp. 6523-6543, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1021/jm058225d>.
- [15] F. W. Muregi and A. Ishih, "Next-generation antimalarial drugs: Hybrid molecules as a new strategy in drug design", *Drug Dev. Res.*, vol. 71, no. 1, pp. 20-32, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1002/ddr.20345>.
- [16] B. Meunier, "Hybrid molecules with a dual mode of action: Dream or reality?", *Acc. Chem. Res.*, vol. 41, no. 1, pp. 69-77, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1021/ar7000843>.
- [17] A. Pawełczyk, K. Sowa-Kasprzak, D. Olander, and L. Zaprutko, "Molecular consortia - various structural and synthetic concepts for more effective therapeutics synthesis", *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 19, no. 4, pp. 1104-1123, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms19041104>.
- [18] H. M. Sampath, L. Herrmann, and S. B. Tsogoeva, "Structural hybridization as a facile approach to new drug candidates", *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 30, no. 23, 127514, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2020.127514>.
- [19] O. M. Soltan, M. F. Shoman, S. A. Abdel-Aziz, A. Narumi, H. Konno, and M. Abdel-Aziz, "Molecular hybrids: A five-year survey on structures of multiple targeted hybrids of protein kinase inhibitors for cancer therapy", *Eur. J. Med. Chem.*, no. 225, 113768, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113768>.
- [20] O. Afzal, S. Kumar, R. Haider, R. Ali, R. Kumar, M. Jaggi, and S. Bawa, "A review of the anticancer potential of bioactive heterocycle quinoline", *Eur. J. Med. Chem.*, no. 97, pp. 871-910, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.07.044>.
- [21] R. Kaur and K. Kumar, "Synthetic and medicinal perspective of quinolines as antiviral agents", *Eur. J. Med. Chem.*, no. 215, 113220, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113220>.
- [22] B. S. Matada, R. Pattanashettar, and N. G. Yernale, "A comprehensive review on the biological interest of quinoline and its derivatives", *Bioorg. Med. Chem.*, no. 32, 115973, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2020.115973>.
- [23] S. Mah, J. H. Park, H.-Y. Jung, K. Ahn, S. Choi, H. S. Tae, K. H. Jung, J. K. Rho, J. C. Lee, S.-S. Hong, and S. Hong, "Identification

- of 4-phenoxyquinoline based inhibitors for L1196M mutant of anaplastic lymphoma kinase by structure-based design”, *J. Med. Chem.*, vol. 60, no. 22, pp. 9205-9221, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b01039>.
- [24] J. R. Rodrigues, J. Charris, R. Ferrer, N. Gamboa, J. Ángel, B. Nitzsche, M. Hoepfner, M. Lein, K. Jung, and C. Abramjuk, “Effect of quinolinyl acrylate derivatives on prostate cancer in vitro and in vivo”, *Invest. New Drugs*, vol. 30, no. 4, pp. 1426-1433, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10637-011-9716-3>.
- [25] J. A. Romero, M. E. Acosta, N. D. Gamboa, M. R. Mijares, J. B. De Sanctis, and J. E. Charris, “Optimization of antimalarial, and anticancer activities of (E)-methyl 2-(7-chloroquinolin-4-ylthio)-3-(4-hydroxyphenyl) acrylate”, *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 26, no. 4, pp. 815-823, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.12.022>.
- [26] H. Ramírez, E. Fernández, J. Rodrigues, S. Mayora, G. Martínez, C. Celis, J. B. De Sanctis, M. Mijares, and J. Charris, “Synthesis and antimalarial and anticancer evaluation of 7-chlorquinoline-4-thiazoleacetic derivatives containing aryl hydrazide moieties”, *Arch. Pharm.*, vol. 354, no. 77, e2100002, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1002/ardp.202100002>.
- [27] S. Chitra, N. Paul, S. Muthusubramanian, P. Manisankar, P. Yogeeshwari, and D. Sriram, “Synthesis of 3-heteroarylthioquinoline derivatives and their in vitro antituberculosis and cytotoxicity studies”, *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 46, no. 10, pp. 4897-4903, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.07.046>.
- [28] Y. H. Kim, J. M. Kauffman, W. O. Foye, “Synthesis and Antileukemic Activity of 2-(2-Methylthio-2-aminovinyl)-1-methylquinolinium Iodides”, *J. Pharm. Scienc.*, vol. 72, no. 11, pp. 1356-1358, 1983. DOI: <https://doi.org/10.1002/jps.2600721132>.
- [29] Z. Cai, W. Zhoua, and L. Sun, “Synthesis and HMG CoA reductase inhibition of 4-thiophenylquinolines as potential hypocholesterolemic agents”, *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 15, no. 24, pp. 7809-7829, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.08.044>.
- [30] E. S. Coimbra, L. M. Antinarelli, N. P. Silva, I. O. Souza, R. S. Meinel, M. N. Rocha, R. P. Soares, and A. D. da Silva, “Quinoline derivatives: Synthesis, leishmanicidal activity and involvement of mitochondrial oxidative stress as mechanism of action”, *Chem. Biol. Interact.*, no. 260, pp. 50-57, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.10.017>.
- [31] E. Lukevics, E. Abele, P. Arsenyan, R. Abele, K. Rubina, I. Sheshtakova, I. Domracheva, and V. Vologdina, “Synthesis and cytotoxicity of silicon containing pyridine and quinoline sulfides”, *Met. Based Drugs*, vol. 9, no. 1, 2, pp. 45-51, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1155/MBD.2002.45>.
- [32] W. Mól, M. Matyja, B. Filip, J. Wietrzyk, and S. Boryczka, “Synthesis and antiproliferative activity in vitro of novel (2-butynyl) thioquinolines”, *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 16, no. 17, pp. 8136-8141, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.07.047>.
- [33] H. Sugimoto, Y. Iimura, Y. Yamanishi, and K. Yamatsu, “Synthesis and Structure-Activity Relationships of acetylcholinesterase inhibitors: 1-Benzyl-4-[(5,6-dimethoxy-1-oxoindan-2-yl)methyl]piperidine hydrochloride and related compounds”, *J. Med. Chem.*, vol. 38, no. 24, pp. 4821-4829, 1995. DOI: <https://doi.org/10.1021/jm00024a009>.
- [34] H. O. Saxena, U. Faridi, S. Srivastava, J. K. Kumar, M. P. Darokar, S. Luqman, C. S. Chanotiya, V. Krishna, A. S. Negi, and S. P. S. Khanuja, “Gallic acid-based indanone derivatives as anticancer agents”, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 18, no. 14, pp. 3914-3918, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.06.039>.
- [35] A. I. Syrchina and A. A. Semenov, “Natural indanones”, *Chem. Nat. Compd.*, no. 18, pp. 1-11, 1982. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00581584>.
- [36] N. V. Kovganko, Z. N. Kashkan, and S. N. Krivenok, “Bioactive compounds of the flora of Belarus. 4. pterosins a and b from *Pteridium aquilinum*”, *Chem. Nat. Compd.*, no. 40, pp. 227-229, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1023/B:CONC.0000039129.46159.ce>.
- [37] X. Ge, G. Ye, P. Li, W.-J. Tang, J.-L. Gao, and W.-M. Zhao, “Cytotoxic Diterpenoids and Sesquiterpenoids from *Pteris multifida*”, *J. Nat. Prod.*, vol. 71, no. 2, pp. 227-231, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1021/np0706421>.
- [38] H. Sheridan, N. Frankish, and R. Farrell, “Synthesis and antispasmodic activity of analogues of natural pterosins”, *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 34, no. 11, pp. 953-966, 1999. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0223-5234\(99\)00113-0](https://doi.org/10.1016/S0223-5234(99)00113-0).
- [39] J. C. Menezes, “Arylidene indanone scaffold: medicinal chemistry and structure-activity relationship view”, *RSC Adv.*, no. 7, pp. 9357-9372, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1039/c6ra28613e>.
- [40] J. E. Gutiérrez, E. Fernández-Moreira, M. E. Acosta, H. Ramírez, and J. E. Charris, “Optimization of the synthesis, in silico ADME/Tox profiling studies, and evaluation of the antimalarial activity of (7-chloroquinolin-4-ylthio)alkylbenzoate derivatives”, *J. Chem. Res.*, vol. 47, no. 3. DOI: <https://doi.org/10.1177/17475198231175326>.
- [41] P. A. Peixoto, R. Severin, C.-C. Tseng, and D. Y.-K. Chen, “Formal asymmetric synthesis of echinopine A and B”, *Angew. Chem. Int. Ed.*, vol. 50, no. 13, pp. 3013-3016, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1002/anie.201008000>.
- [42] Y. J. Kim, M. P. Bernstein, A. S. Galiano, F. E. Romesberg, P. G. Williard, D. J. Fuller, A. T. Harrison, and D. B. Collum, “On the structure and reactivity of Lithium Diisopropylamide (LDA) in hydrocarbon solutions. Formation of unsolvanted ketone, ester, and carboxamide enolates”, *J. Org. Chem.*, vol. 56, no. 14, pp. 4435-4439, 1991. DOI: <https://doi.org/10.1021/jo00014a019>.
- [43] O. Provot, J. F. Berrien, H. Moskowitz, and J. Mayrargue, “Trifluoromethyl ketones chemistry: efficient access to silyl enol ethers or silyl carbinds using lithium diisopropylamide”, *J. Fluorine Chem.*, vol. 86, no. 2, pp. 185-186, 1997. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0022-1139\(97\)00098-5](https://doi.org/10.1016/S0022-1139(97)00098-5).
- [44] Y. Yamamoto, Y. Yasuda, H. Oulyadi, J. Maddaluno, and K. Tomioka, “NMR studies of a ternary complex reagent of lithium ester enolate, chiral diether, and lithium diisopropylamide in an asymmetric Michael reaction”, *Tetrahedron*, vol. 66, no. 13, pp. 2470-2473, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tet.2010.01.072>.
- [45] M. Jurášek, P. Džubák, S. Rimpelová, D. Sedlák, P. Konečný, I. Frydrych, S. Gurská, M. Hajdúch, K. Bogdanová, M. Kolář, M. T. Müller, E. Kmoníčková, T. Rumí, J. Harmatha, and P. B. Drašar, “Trilobolide-steroid hybrids: Synthesis, cytotoxic and antimycobacterial activity”, *Steroids*, no. 117, pp. 97-104, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2016.08.011>.
- [46] J. Řehulka, K. Vychodilová, P. Krejčí, S. Gurská, P. Hradil, M. Hajdúch, P. Džubák, and J. Hlaváč, “Fluorinated derivatives of 2-phenyl-3-hydroxy-4(1H)-quinolinone as tubulin polymerization inhibitors”, *Eur. J. Med. Chem.*, no. 192, 112176, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112176>.
- [47] S. Rimpelová, T. Zimmermann, P. B. Drašar, B. Dolenský, J. Bejček, E. Kmoníčková, P. Cihlářová, S. Gurská, L. Kuklíková, M. Hajdúch, T. Rumí, L. Opletal, P. Džubák, and M. Jurášek, “Steroid glycosides hyrcanoside and deglucohyrcanoside: On isolation, structural identification, and anticancer activity”, *Foods*, vol. 10, no. 1, p. 136, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods10010136>.
- [48] P. Džubák, S. Gurská, K. Bogdanová, D. Uhríková, N. Kanjaková, S. Combet, T. Klunda, M. Kolář, M. Hajdúch, and M. Poláková, “Antimicrobial and cytotoxic activity of (thio)alkyl hexopyranosides, nonionic glycolipid mimetics”, *Carbohydr. Res.*, no. 488, 107905, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carres.2019.107905>.
- [49] J. E. Gutiérrez, E. Fernández-Moreira, M. A. Rodríguez, M. R. Mijares, J. B. De Sanctis, S. Gurská, P. Džubák, M. Hajdúch, J. Bruno-Colmenarez, L. Rojas, D. Deffieux, L. Pouységú, S. Quiudeau, J. Charris, and H. Ramírez, “Novel 7-Chloro-(4-thioalkylquinoline) derivatives: Synthesis and antiproliferative activity through inducing apoptosis and DNA/RNA damage”, *Pharmaceuticals*, no. 15, 1234, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods10010136>.

ph15101234.

- [50] K. Sasaki, N. H. Tsuno, E. Sunami, G. Tsurita, K. Kawai, Y. Okaji, T. Nishikawa, Y. Shuno, K. Hongo, M. Hiyoshi, M. Kaneko, J. Kitayama, K. Takahashi, and H. Nagawa, "Chloroquine potentiates the anti-cancer effect of 5-fluorouracil on colon cancer cells", *BMC Cancer*, no. 10, p. 370, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-370>.
- [51] H. Monma, Y. Iida, T. Moritani, T. Okimoto, R. Tanino, Y. Tajima, and M. Harada, "Chloroquine augments TRAIL-induced apoptosis and induces G2/M phase arrest in human pancreatic cancer cells", *PLoS ONE*, vol. 13, no. 3, e0193990, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193990>.
- [52] T. Hu, P. Li, Z. Luo, X. Chen, J. Zhang, C. Wang, P. Chen, and Z. Dong, "Chloroquine inhibits hepatocellular carcinoma cell

growth in vitro and in vivo", *Oncol. Rep.*, vol. 35, no. 1, pp. 43-49, 2016. DOI: <https://doi.org/10.3892/or.2015.4380>.

[53] L. Jia, J. Wang, T. Wu, J. Wu, J. Ling, and B. Cheng, "In vitro and in vivo antitumor effects of chloroquine on oral squamous cell carcinoma", *Mol. Med. Rep.*, no. 16, pp. 5779-5786, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7342>.

[54] P. Jiang, Y. Zhao, W. Shi, X. Deng, G. Xie, Y. Mao, Z. Li, Y. Zheng, S. Yang, and Y. Wei, "Cell Growth Inhibition, G2/M Cell cycle arrest, and apoptosis induced by chloroquine in human breast cancer cell line Bcap-37", *Cell Physiol. Biochem.*, vol. 22, no. 5, 6, pp. 431-440, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1159/000185488>.

Citación del artículo:

J. E. Gutiérrez et al., "Síntesis y actividad antiproliferativa de una mezcla de derivados de (+/-)-7-cloro-(4-tioalquilquinolína). Inducción de apoptosis y daño sobre el ADN/ARN", *Rev. Colomb. Quim.*, vol. 52, no. 1, pp. 10-18, 2023. DOI: <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v52n1.110787>

Características principales del biocarbón derivado de restos de *Theobroma cacao L.* para su uso en suelos agrícolas

Resumen

La incorporación de biocarbono para mejorar los suelos agrícolas está ganando popularidad, pero hay poca información sobre las propiedades del biocarbono derivado de los restos de la cosecha de cacao. En la investigación se determinaron varias características del biocarbono obtenido del proceso de pirólisis de la cáscara de las mazorcas de cacao. Los análisis realizados fueron: porcentajes de fibra lignocelulósica, análisis proximal, estructura microscópica y grupos funcionales. También se realizó con el biocarbón un ensayo de adsorción con Cd^{2+} mediante un sistema de recirculación con agua, con el fin de obtener las isotermas de Langmuir y Freundlich (modelos matemáticos de adsorción de moléculas en superficies sólidas). Los contenidos fibrosos abarcaban 56,2% celulosa, 27,07% lignina y 3,15% hemicelulosa. Con 8,15% de humedad y pH 9,86 se obtuvo un promedio de 35,58% de biocarbón. La forma de los poros fue irregular, se confirmó la presencia de los grupos hidroxilo, carboxilo y carbonato. Los modelos de absorción indicaron una capacidad de adsorción máxima de 0,280 mL/g en Langmuir y una intensidad de adsorción de Cd^{2+} de 0,06 en Freundlich. Si bien el biocarbón demostró propiedades adecuadas para suelos ácidos, su capacidad de adsorción resultó limitada en las condiciones evaluadas.

Palabras clave: biomasa; isoterma de adsorción; pirólisis.

Key features of the biochar derived from *Theobroma cacao L.* residues for use on agricultural soils

Abstract

Using biochar to enhance agricultural soils is becoming more popular, but not much is known about the qualities of biochar made from cocoa crop leftovers. The study identified several traits of biochar created from cocoa pod husks through the pyrolysis method. The examination included the following evaluations: levels of lignocellulosic fibre, proximal analysis, microscopic structure, and functional groups. The Langmuir and Freundlich isotherms were evaluated through an aqueous recirculation Cd^{2+} adsorption assay. The fibrous contents consisted of 56.2% cellulose, 27.07% lignin, and 3.15% hemicellulose. At a moisture content of 8.15% and a pH of 9.86, 35.58% biochar was produced. The pores were not uniform in shape and contained hydroxyl, carboxyl and carbonate groups as identified. According to the isotherms, the Cd^{2+} that can be adsorbed is 0.280 mL/g at Langmuir, and the Cd^{2+} adsorption intensity is 0.06 at Freundlich. Even though the biochar had desirable properties for acidic soils, its ability to adsorb was restricted under the tested conditions.

Keywords: biomass; absorption isotherm; pyrolysis.

Principais características do biochar derivado de resíduos de *Theobroma cacao L.* para utilização em solos agrícolas

Resumo

O uso crescente do biocarvão em solos agrícolas justifica uma investigação mais aprofundada de suas propriedades menos conhecidas. Esta pesquisa concentrou-se no biocarvão produzido a partir de resíduos da colheita do cacau e teve como objetivo identificar seus atributos por meio da pirólise da casca da vagem do cacau. As análises realizadas incluíram fibra lignocelulósica, análise proximal, estrutura microscópica e grupos funcionais. As isotermas de Langmuir e Freundlich foram avaliadas por meio de um ensaio de adsorção de Cd^{2+} em recirculação aquosa. O conteúdo fibroso consistia em 56,2% de celulose, 27,07% de lignina e 3,15% de hemicelulose. Com um teor de umidade de 8,15% e um pH de 9,86, foram produzidos 35,58% de biochar. A estrutura porosa era irregular, indicando a presença de grupos hidroxila, carboxila e carbonato. As isotermas mostraram que o modelo de Langmuir tem uma capacidade máxima de adsorção (q_{max}) de 0,280 mL/g e uma intensidade de adsorção de Freundlich de 0,06 para Cd^{2+} . Embora o biochar tenha demonstrado propriedades adequadas para uso agrícola, sua capacidade de adsorção foi limitada nas condições avaliadas.

Palavras-chave: biomassa; isotérmica de absorção; pirólise.

Introducción

Ecuador es el primer productor de cacao (*Theobroma cacao*: Malvaceae) del tipo fino y de aroma del mundo [1]. Pero la constante explotación de los suelos por esta actividad agrícola ocasiona una degradación en sus propiedades físicas, químicas y biológicas, que afecta el rendimiento de los cultivares de cacao [2]. No obstante, los agricultores también enfrentan otros desafíos con respecto a la gestión de los restos de cacao [3]-[6], por la generación de una cantidad considerable de biomasa residual que se obtiene principalmente de la cosecha [7]; por ejemplo, por cada tonelada de cacao en grano se generan diez toneladas de biomasa residual [4]. Esta biomasa es dejada por los agricultores en el suelo, lo cual conlleva un aumento de las plagas que afectan a todas las plantas [8]. Además, el cacao toma el cadmio del suelo en forma de Cd²⁺ y lo acumula en sus tejidos, especialmente en las mazorcas [9]. A largo plazo, esta acumulación de biomasa residual en los suelos puede aumentar los niveles de Cd en la planta, de forma que se produciría una recirculación del Cd²⁺, proceso perjudicial para la comercialización del cacao [10].

La composición de la biomasa residual proviene en gran parte de las cáscaras de las mazorcas y el mucílago [11], [12]. La cáscara representa entre el 30 y el 67% del peso total de la mazorca de cacao y contiene altos niveles de elementos como Ca, P, K y Mg [12], [13]. También la mazorca de cacao tiene altos niveles de celulosa y hemicelulosa que son fibras compuestas de glucosa y de lignina que se conforma de polisacáridos. El conocimiento de la composición y las propiedades de estos materiales residuales es un paso lógico para explorar su posible revalorización, para su uso en enmiendas agrícolas al suelo [7].

Una alternativa para gestionar la biomasa residual, y reintroducirla al suelo como enmienda, es la conversión térmica de esta biomasa en biocarbón, también conocido como carbón vegetal o carbón pirogénico [14]-[16]. El método de conversión más conocido es la pirólisis lenta que se basa en la combustión parcial de la biomasa mediante velocidades de calentamiento uniformes y lentas (~10-15 °C/min), a temperaturas comprendidas entre 400 y 650 °C en ausencia de oxígeno [16]-[19].

Varios estudios han demostrado que el biocarbón vegetal obtenido por pirólisis lenta mejora el intercambio catiónico suelo-planta al aumentar la capacidad de retención y liberación de nutrientes [16], [17]. Su porosidad y su carga negativa atraen cationes esenciales como calcio, potasio y magnesio, lo que mejora su disponibilidad para las plantas y reduce la lixiviación [20], [21]. El valor extremadamente alcalino del biocarbón (pH: 8,8 a 10,5), en mezcla con abonos orgánicos y carbonato de calcio, incrementa el pH en suelos ácidos [22]; además, por su estructura porosa facilita la retención hídrica [18], [21], [23]. También puede actuar como una reserva de carbono a largo plazo en el suelo [24]. Otro beneficio del biocarbón es el incremento de la actividad microbiana en el suelo al proporcionar un sustrato poroso y rico en carbono que actúa como hábitat ideal para microorganismos beneficiosos [22], [25].

Por otra parte, se ha probado su capacidad de adsorción de metales pesados como Pb, Ar y Cd [15], [20]. La adsorción es la eliminación de iones o sustancias de soluciones líquidas o en suspensión en la superficie de un material sólido, en la que estos iones se adhieren a la superficie del material sólido a través de interacciones químicas o físicas [15], [18], [21]. El biocarbón es eficaz en adsorción debido a su alta relación superficie/volumen.

Sin embargo, la calidad y la efectividad del biocarbón dependen en gran medida de cómo se lleve a cabo el proceso de pirólisis [18]. Un biocarbón obtenido a 550 °C podría contener compuestos tóxicos, como los hidrocarburos alifáticos (alcanos y alquenos), que afecten el desarrollo de las plantas [18], [26]. Así también, es importante

conocer las propiedades intrínsecas de la biomasa residual utilizada; una biomasa con alto contenido de ligninas es ideal para obtener una estructura porosa con alta superficie específica y de esta forma lograr una adecuada adsorción de metales pesados [27].

La generación constante de biomasa residual en la cosecha del cacao abre la puerta a la posibilidad de reutilizarla de manera efectiva en la enmienda de suelos agrícolas, en especial de tendencia ácida y con altos niveles de metales pesados, particularmente mediante la producción de biocarbón [5], [16]. Aunque hay escasa información disponible sobre las características del biocarbón a partir de la cáscara, su potencial como enmienda para suelos agrícolas es una perspectiva lógica para abordar. En este contexto, el objetivo de este trabajo es determinar las características de un biocarbón conseguido a partir de la cáscara de la mazorca del cacao, obtenido por pirólisis lenta para su uso en suelos agrícolas. Esto se hace con la finalidad de evaluar el potencial de la cáscara de cacao como enmienda para suelos agrícolas.

Materiales y métodos

Preparación del biocarbón

La ubicación de la plantación se encuentra entre las coordenadas geográficas 79°64' W de longitud, 03°16' S de latitud y a una altitud de cinco metros sobre el nivel del mar. Se recolectaron 20 kg de cáscaras de mazorcas de cacao (CPH-cocoa pod husk;biomasa residual 1) cosechadas de la plantación de cacao en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Machala (Ecuador). Esta biomasa fue cortada en trozos de 5 cm para lograr un secado homogéneo al aire durante el día por un tiempo de 20 días. Una vez seca la muestra, se determinaron los porcentajes de hemicelulosas, celulosa y lignina según la Technical Association of the Pulp and Paper Industry (TAPPI). Para la celulosa se utilizó el método TAPPI T 212 m12, para la lignina el método T222 os74 [28]. Con el fin de disolver las sustancias solubles, el solvente utilizado fue dioxano (C₄H₈O₂). La hemicelulosa total se estima por la diferencia entre el 100% y la suma del porcentaje de celulosa y el porcentaje de lignina. El procedimiento se repitió por triplicado.

La pirólisis se efectuó en un reactor térmico de doble cilindro para la conversión térmica de la biomasa residual I. Las condiciones de calentamiento fueron de 10 °C/min hasta 350 °C: se colocó la biomasa residual previamente pesada en la cámara térmica del reactor durante 2 h [29]. Después se retiró del fueno y se dejó enfriar por 5 h; a continuación, se sacó la biomasa convertida en biocarbón y se pesó para determinar el rendimiento (%) mediante la Ec. 1 [19]. Todas las muestras de biocarbón obtenidas fueron trituradas y tamizadas en un tamiz de 2 mm a fin de homogeneizar y almacenar en fundas plásticas para su análisis [30].

$$\text{Rendimiento (\%)} = \left(\frac{\text{Biocarbón de CPH (kg)}}{\text{Biomasa residual de CPH (kg)}} \right) \times 100 \quad (1)$$

Ánalisis proximal

El contenido de humedad y cenizas del biocarbón se determinó por diferencia de peso [19]. Para obtener la humedad, se dividió la masa del biocarbón después de 24 h en la mufla a 105 °C para la masa del biocarbón almacenado (Ec. 2) [30]. Para obtener la ceniza se dividió el valor de la masa del biocarbón a 750 °C por 30 min en una mufla, para la masa obtenida a 105 °C/24 h (Ec. 3).

$$\text{Humedad (\%)} = \left(\frac{\text{Masa final del biocarbón (g) } 105^{\circ}\text{C}/24\text{h}}{\text{Masa inicial del biocarbón (g)}} \right) \times 100 \quad (2)$$

$$\text{Ceniza} = \left(\frac{\text{Masa de biocarbón (g) a } 750^{\circ}\text{C}/30\text{min}}{\text{Masa de biocarbón (g) a } 105^{\circ}\text{C}/24\text{h}} \right) \times 100 \quad (3)$$

El pH y la conductividad eléctrica (CE) del biocarbón se midieron con potenciómetro para pH (Hanna, modelo IH9829, Rumanía) y un medidor de conductividad (Hanna, modelo IH9829, Rumanía), respectivamente. La proporción de biocarbón y agua bidestilada fue

1:20 (w:v). El procedimiento se repitió por triplicado.

Análisis estructural por microscopía electrónica de barrido (SEM)

Para analizar la estructura microscópica de las muestras de biocarbón se tomaron imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM- scanning electron microscope) (TESCAN MIRA, Alemania) de una fracción de biocarbón a 10 y 80 μm . El proceso comienza con la preparación de una sección delgada del biocarbón que se adhiere a un portaobjetos. El portaobjetos se coloca en un escáner de barrido, que se mueve sobre la superficie del biocarbón y registra información sobre su estructura. La información recogida se convierte en una imagen que muestra la estructura tridimensional de la muestra, lo que permite a los investigadores ver detalles finos como poro, tamaño de partícula, y forma.

Análisis infrarrojo por transformación de Fourier (FTIR)

Con el propósito de determinar los grupos funcionales de las muestras de biocarbón se utilizó un instrumento ATR de punta de diamante para obtener espectros infrarrojos (IR) cercano por transformada de Fourier (FTIR) en un equipo Cary 630 FTIR (Agilent Technologies). Las muestras se analizaron directamente entre las bandas 4500 cm^{-1} a 450 cm^{-1} , con 12 barridos por espectro y una resolución de 4 cm^{-1} . Los datos de los espectros IR se exportaron en formato de texto y se analizaron con el software Origin Pro-versión 6.

Ensayo de adsorción

Las isotermas de adsorción de cadmio se adquirieron mediante experimentos por lotes. Se colocaron muestras de biocarbón de 20 g de peso en una columna de plástico de 150 mL con una solución de iones de cadmio de 20 ppm. El pH inicial de la solución (100 mL) se ajustó a $5,0 \pm 0,1$ con HCl. Se utilizó una bomba peristáltica (BOI-BASEC; Alemania) (Figura 1), que se conectó a la columna de plástico, para crear el sistema de recirculación. La bomba funcionaba a 10 rpm a 25 °C. Se tomaron alícuotas de 5 mL de muestra cada 30 min durante un período de 150 min. Las muestras recogidas se analizaron con un espectrómetro de absorción atómica Perkin (modelo Elmer 300d, EE. UU.) para determinar la concentración del metal Cd^{2+} en equilibrio.

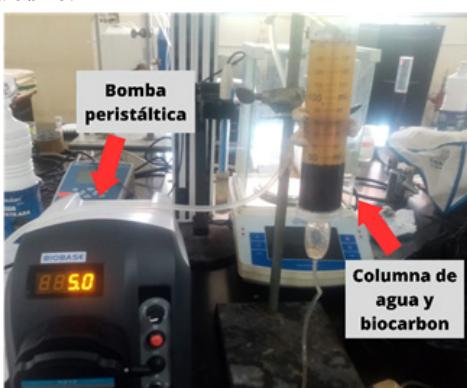


Figura 1. Experimento de adsorción en un sistema de circulación.

Con los valores de concentración de cadmio y el tiempo se calcularon los modelos Freundlich y Langmuir. El modelo de Freundlich es ampliamente utilizado para describir la capacidad de adsorción de diferentes materiales y entender cómo los solutos se adhieren a las superficies sólidas en diferentes condiciones. Mientras que el modelo de Langmuir es útil para comprender cómo la adsorción se satura a medida que los sitios activos en la superficie se llenan y cómo la concentración en la solución afecta la cantidad de sustancia adsorbida. Para obtener la representación gráfica de ambos modelos se utilizó la Ec. (4) tomada de Romero-Bonilla et al. (2022), a fin de calcular la concentración de equilibrio (C_e), la concentración inicial (C_i) y la concentración final (C_f) [31].

$$C_e = C_i - C_f \quad (4)$$

Posteriormente, se calculó la capacidad de adsorción mediante el modelo de Freundlich obtenido con la Ec. (5) tomada de Romero Bonilla et al. (2022):

$$\log q = \frac{1}{n} \times \log C_e + \log k \quad (5)$$

Donde q es la cantidad de soluto que es sorbido por el biocarbón en un tiempo determinado (mg de metal/g de biocarbón), k corresponde a la capacidad de sorción en la fase de solución, n es el parámetro asociado a la adsorción.

La capacidad de adsorción del modelo de Langmuir se calculó con la Ec. (6) tomada de Romero-Bonilla et al. (2022).

$$\frac{1}{q} = \frac{1}{b \times q_{\max}} + \left(\frac{1}{q_{\max}} \times \frac{C_e}{C_i} \right) \quad (6)$$

Donde q es la cantidad de soluto que es adsorbida por el biocarbón en un tiempo dado (mg/g), q_{\max} es la capacidad máxima de adsorción (mg/g), b es el parámetro de la Ec. (6) relacionado con la afinidad del adsorbente del Cd^{2+} .

Análisis estadístico

Los valores obtenidos para la fibra lignocelulósica (celulosa, hemicelulosa y lignina del CPH), el rendimiento del biocarbón, el porcentaje de humedad del biocarbón, los porcentajes de cenizas (CPH y biocarbón), el pH y la CE se tabularon en el software estadístico SPSS versión 22 para su análisis estadístico descriptivo (media, valores mínimo y máximo). Se utilizaron los valores medios de tres réplicas para dibujar las isotermas de adsorción y calcular las constantes de isoterma de adsorción. Las curvas de regresión de las isotermas se trazaron mediante regresión lineal en una hoja de cálculo (Excel).

Resultados y discusión

Características de la biomasa y del biocarbón

Los resultados estadísticos descriptivos de celulosa, lignina, hemicelulosa y ceniza de CPH y el análisis proximal del biocarbón se muestran en la Tabla 1.

Los porcentajes de fibras obtenidos de CPH fueron: celulosa (56,12%), ligninas (27,07%), hemicelulosa (3,15%). El porcentaje de celulosa se encuentra en los rangos obtenidos en otros trabajos que reportan valores entre 35 y 65% [17], [20], [25], [26]. Pero los valores de lignina de CPH tienden a variar entre 0,9 y 45%; esto se debe a factores como la variedad, época de recolección, grado de descomposición y tamaño del fragmento utilizado para el análisis [20], [32], [33]. En la investigación se utilizaron CPH provenientes de cacao Forastero que muestran valores de ligninas >29% [33], [34]. El porcentaje significativo de lignina en la CPH contribuye notablemente a las propiedades físicas del biocarbón para su uso en los suelos agrícolas.

Después del proceso de pirólisis, la CPH se convirtió en biocarbón con un rendimiento de 35,58% y un contenido de humedad de 8,15%. En la investigación el porcentaje de rendimiento obtenido está en un rango adecuado (25-35%) para la temperatura en que se obtuvo (350 °C); varios investigadores indican que el rendimiento de un biocarbón está en relación con su porcentaje de ligninas [19]. A mayor temperatura y tiempo de residencia de la biomasa residual en el reactor térmico, mayor será la estabilidad del biocarbón [35], pero también el rendimiento disminuye [20].

Se registró un incremento de la ceniza obtenida de la CPH de 13,66% a 25,03%. La lignina es el principal precursor en la formación del biocarbón; esto se debe a que la celulosa y la hemicelulosa se incineran a 200-300 °C y la lignina sobre los 300 °C [36]. De esta forma, la cantidad de ceniza obtenida en el proceso está en relación con los

porcentajes de celulosa y hemicelulosa [3], [37], y no con la lignina.

El rango de pH en la investigación fue de 9,10-10,83, que se categoriza como extremadamente alcalino, similar a los obtenidos por otros investigadores [18], [20], [29]. Aunque la extrema alcalinidad afectaría al suelo si se aplica de manera directa, las investigaciones previas recomiendan la mezcla con humus y calcio para mejorar el efecto regulador del pH, pero solo en suelos ácidos [18], [29]. El valor promedio de CE fue de 2,77 dS/m otras investigaciones muestran valores de CE que alcanzan los 40,00 dS/m.

La extrema alcalinidad y la baja CE determinadas en el biocarbón de la cáscara del cacao tienen relación directa con el aumento del porcentaje de cationes alcalinos como Ca^{2+} , Mg^{2+} y K^{+} [38]. Estos cationes se incrementan por acción de la temperatura en que se obtuvo el biocarbón. A temperaturas altas, mayor alcalinidad del biocarbón ($\text{pH} > 9,5$), en especial en biomasa con mayor cantidad de ligninas, como los troncos de los árboles, el raquis del banano, la cáscara del grano de café, etc. [4].

Tabla 1. Descripción de fibras lignocelulosa CPH y proximal del biocarbón de cacao.

Biomasa	Media (\pm)	Mínimo	Máximo
Celulosa (%)	56,12 \pm 1,29	54,83	57,41
Lignina (%)	27,07 \pm 0,28	26,79	27,35
Hemicelulosa (%)	3,15 \pm 0,34	2,81	3,49
Ceniza (%)	13,66 \pm 0,89	12,77	14,42
Biocarbón	Media (\pm)	Mínimo	Máximo
Rendimiento (%)	35,58 \pm 3,34	33,33	36,67
Humedad (%)	8,15 \pm 3,00	5,15	11,15
Ceniza (%)	25,03 \pm 1,80	23,37	26,86
pH	9,86 \pm 0,96	9,10	10,83
EC* (dS/m)	2,77 \pm 0,58	2,29	2,87

*EC: conductividad eléctrica.

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La imagen capturada con microscopía electrónica de barrido a una escala de 80 μm muestra que el biocarbono obtenido a partir de CPH a una temperatura de 350 °C no tiene una forma uniforme, la superficie es porosa, pero el tamaño y forma de los poros es irregular (Figura 2A-B). Las imágenes no muestran una estructura de tipo panal y tampoco láminas de bordes claramente definidos, lo cual es una característica distintiva de otros biocarbones obtenidos a temperatura mayor de 500 °C. Esta heterogeneidad en las texturas es una característica observada en otras muestras de biocarbón que proviene de biomasa con altos porcentaje de celulosa obtenidos entre 250 y 400 °C [9], [17]. Las biomassas con alto contenido de celulosa forman microporos, pero estos desaparecen al incinerarse y surgen macroporos de forma no definida a causa de la lignina [33]. Esta estructura puede que no sea efectiva para adsorción de metales pesados.

La Figura 2C, que fue tomada a una escala de 10 μm revela que los poros presentes en el centro de la imagen son de tamaños variados y sus bordes no tienen una forma circular. Esto se atribuye a una carbonización insuficiente. Otros estudios a temperaturas superiores a 600 °C muestran imágenes con estructura de panal claramente definida [20], [21]. El rango de temperatura es un limitante de la adsorción de metales pesados con relación a los biocarbones obtenidos a temperaturas mayores de 500 °C [17].

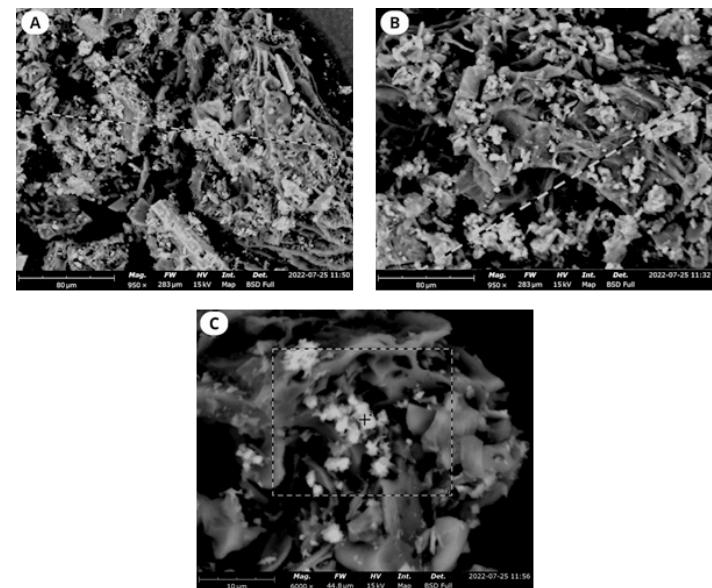
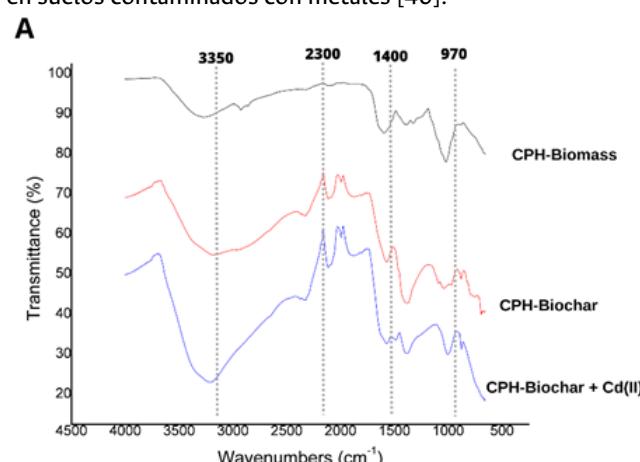


Figura 2. Imágenes obtenidas por microscopía de barrido. A: imagen tomada a 80 μm , B: imagen tomada a 80 μm , C: imagen tomada a 10 μm .

Espectroscopía de infrarrojo

La espectroscopía infrarroja (FTIR) es una de las técnicas más útiles para caracterizar los grupos funcionales de la superficie del biocarbón. La Figura 3 muestra los espectros FTIR para CPH, biocarbón y biocarbón + Cd^{2+} después del ensayo de adsorción. En las tres muestras en las bandas entre 3400 y 3350 cm^{-1} se formó un pico que se atribuye al grupo hidroxilo (-OH). En las bandas entre 2300 y 1900 cm^{-1} se produjeron varios picos en las muestras de biocarbón y biocarbón + Ca^{2+} , espectros característicos de los compuestos aromáticos hidroxilo, carboxilato y fenólico. El pico en las bandas entre 1600 y 1400 cm^{-1} en las muestras de biocarbón y biocarbón + Cd^{2+} son anillo aromático $\text{C}=\text{O}$ y $\text{C}=\text{C}$. El estrechamiento de los espectros en la banda de 970 cm^{-1} indica la presencia de carbonatos. Los espectros obtenidos en las bandas de 3500 a 3200 cm^{-1} se forman debido al contenido de humedad en las muestras [20], [26], [39].

Los espectros de los grupos carboxílicos en las bandas entre 2300 y 1900 cm^{-1} favorecen la absorción de Cd^{2+} , también los carbonatos encontrados en las bandas de 900 a 850 cm^{-1} , picos que se forman en las muestras de biocarbón y biocarbón + Cd^{2+} . Esto se explica porque el biocarbón tiene sitios activos de adsorción en los grupos C-C, OH-, CHO-, -COOH y otros grupos funcionales que contienen oxígeno [21], [34]. Aunque los grupos carboxilos y carbonatos indican la capacidad de interactuar con Cd^{2+} , la eficiencia de adsorción depende de varios factores, como la densidad y accesibilidad de estos grupos en la superficie del adsorbente, la competencia con otra solución y las condiciones del medio [15], [20], [27]. Sin embargo, los grupos alifáticos encontrados en los biocarbones pueden actuar como sitios de unión para la adsorción de metales formando complejos estables. Esto podría mejorar su rendimiento como enmienda en suelos contaminados con metales [40].



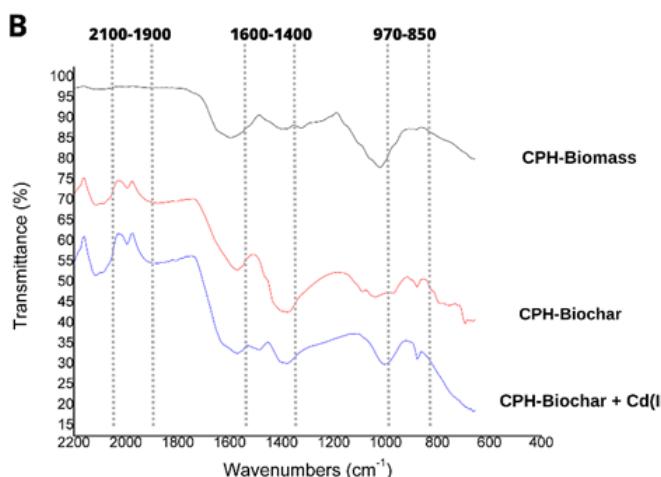


Figura 3. Espectros FTIR de las muestras de biomasa, biocarbón y biocarbón +Cd²⁺, A: bandas de 4500-500 cm⁻¹, B: bandas de 2100-600 cm⁻¹.

Resultado de los ensayos de adsorción

El modelo de Freundlich para la concentración de 20 ppm de Cd²⁺ se presenta en la Figura 4A. El R² obtenido fue de 0,7665, el valor de k de 0,050 mg/g y la intensidad de adsorción (n) de 1,401. La Figura 4B corresponde al modelo de Langmuir para 20 ppm de Cd²⁺, el correspondiente R² fue de 0,763, el valor carga de q_{max} de 0,0556 mg/g y b (afinidad del biosorbente por los iones de Cd²⁺) de 0,2100. Estos valores indican una baja afinidad del absorbente por el Cd²⁺, respecto a otros trabajos [9], [31]. Esto se puede relacionar con una estructura más porosa del biocarbón que se obtiene a temperaturas mayores de 500 °C, lo cual proporciona más accesibilidad de los sitios de adsorción y en la capacidad de retención del cadmio.

El modelo de Freundlich muestra un exponente n mayor a uno lo que indica que la adsorción es favorable. Sin embargo, el valor de k, que representa la cantidad de metal absorbido, es menor en comparación con otros estudios que obtuvieron 2,00 mg/g [12]. Estos investigadores trabajaron con biocarbón obtenido a partir de la cáscara de cacao y alcanzaron valores de q_{max} que oscilan entre 0,22 y 0,61 mg/g. Los R² obtenidos de las ecuaciones lineales difieren de otros trabajos que alcanzaron un ajuste > 0,90; una causa para obtener coeficiente de regresión está asociada a que las muestras utilizadas de biocarbón fueron obtenidas a 600 °C [9]. Por otra parte, la interacción de los ácidos carboxílicos con la superficie del biocarbón puede estar relacionada con la disposición de elementos como el fósforo en el adsorbente (biocarbón); este es un factor que pudo afectar el ajuste de los modelos de Langmuir y de Freundlich [40].

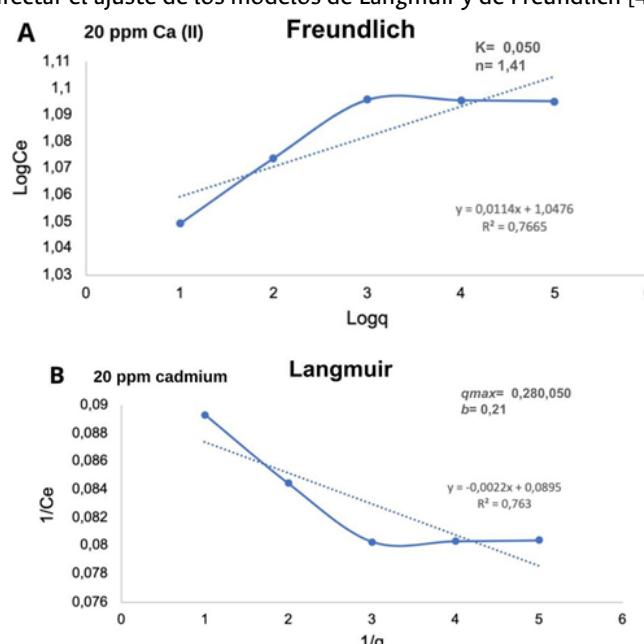


Figura 4. Isotermas de adsorción de Cd²⁺ en sistema de recirculación en agua. A: modelo de Freundlich, B: modelo de Langmuir.

Conclusiones

La elevada concentración de celulosa y lignina en la cáscara de la mazorca de cacao la convierte en un prometedor precursor para biocarbono. Los análisis proximales coincidieron con las expectativas, con rendimientos > 30% y pH alcalino, idóneos para enmiendas en suelos ácidos. Sin embargo, la heterogeneidad microscópica del biocarbono podría afectar la absorción de metales pesados, como reflejan las isotermas de Freundlich y Langmuir, cuyos resultados difirieron de lo anticipado. En comparación con trabajos anteriores, la temperatura emergió como un factor crítico para formar macroporos bien definidos. A 350 °C, se confirmó la presencia de grupos hidroxilos y carboxilos en las muestras, lo que facilita la adsorción superficial de metales. Lo anterior demostró que el biocarbono generado muestra propiedades lignocelulósicas y pH aptos para su uso en agricultura con fines de enmiendas para la mejora de sus propiedades físicas y químicas. No obstante, si se busca adsorber cadmio, la incineración debe superar los 350 °C.

Referencias

- [1] S. Streule, S. Freimüller Leischfeld, M. Galler, and S. Miescher Schwenninger, "Monitoring of cocoa post-harvest process practices on a small-farm level at five locations in Ecuador", *Helijon*, vol. 8, no. 6, p. e09628, Jun. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.helijon.2022.e09628>.
- [2] S. Barrezueta-Unda, "Properties of several soils cultivated with cocoa in the province of El Oro, Ecuador", *CienciaUAT*, vol. 14, no. 1, pp. 155-166, 2019. DOI: <https://doi.org/10.29059/ciencauat.v14i1.1210>.
- [3] A. F. Díaz-Oviedo, B. A. Ramón-Valencia, and G. G. Moreno-Contreras, "Caracterización físico-química de la cáscara de mazorca de cacao como posible uso en la elaboración de tableros aglomerados", *Revista de Investigación, Desarrollo e Innovación*, vol. 12, no. 1, pp. 97-106, Feb. 2022. DOI: <https://doi.org/10.19053/20278306.v12.n1.2022.14211>.
- [4] Z. S. Vásquez et al., "Biotechnological approaches for cocoa waste management: A review", *Waste Management*, vol. 90, pp. 72-83, May 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.04.030>.
- [5] P. Londoño-Larrea, E. Villamarín-Barriga, A. N. García, and A. Marcilla, "Study of Cocoa Pod Husks Thermal Decomposition", *Applied Sciences*, vol. 12, no. 18, p. 9318, Sep. 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/app12189318>.
- [6] S. Barrezueta-Unda and A. Paz-González, "Indicadores de sostenibilidad sociales y económicas: caso productores de cacao en El Oro, Ecuador", *Revista Ciencia UNEMI*, vol. 11, no. 27, pp. 20-29, 2018.
- [7] A. Bahrun, M. Y. Fahimuddin, T. C. Rakian, O. Safuan, L. Ode, and M. Harjoni, "Cocoa Pod Husk Biochar Reduce Watering Frequency and Increase Cocoa Seedlings Growth", *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology (IJEAB)*, vol. 3, no. 5, pp. 1635-1639, 2018.
- [8] S. H. Thube et al., "Xylosandrus crassiusculus (Motschulsky) on Cocoa Pods (*Theobroma cacao* L.): Matter of Bugs and Fungi", *Insects*, vol. 13, no. 9, p. 809, Sep. 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/insects13090809>.
- [9] D. A. Pinzón-Núñez, C. A. Adarme-Durán, L. Y. Vargas-Fiallo, N. Rodríguez-López, and C. A. Ríos-Reyes, "Biochar as a waste management strategy for cadmium contaminated cocoa pod husk residues", *International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture*, vol. 11, no. 1, pp. 101-115, Mar. 2022. DOI: <https://doi.org/10.30486/ijrowa.2021.1920124.1192>.
- [10] F. Barraza et al., "Beyond cadmium accumulation: Distribution of other trace elements in soils and cacao beans in Ecuador", *Environ Res*, vol. 192, p. 110241, Jan. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110241>.
- [11] F. Lu et al., "Valorisation strategies for cocoa pod husk and its fractions", *Curr Opin Green Sustain Chem*, vol. 14, pp. 80-88, Dec.

2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2018.07.007>.
- [12] C. J. Mendoza-Meneses, A. A. Feregrino-Pérez, and C. Gutiérrez-Antonio, "Potential Use of Industrial Cocoa Waste in Biofuel Production", *J Chem*, vol. 2021, pp. 1-11, Dec. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1155/2021/3388067>.
- [13] K. H. N. Figueroa, N. V. M. García, and R. C. Vega, "Cocoa By-products", in *Food Wastes and By-products*, Wiley, 2020, pp. 373-411. DOI: <https://doi.org/10.1002/9781119534167.ch13>.
- [14] L. Liu, T. Yue, R. Liu, H. Lin, D. Wang, and B. Li, "Efficient absorptive removal of Cd(II) in aqueous solution by biochar derived from sewage sludge and calcium sulfate", *Bioresour Technol*, vol. 336, p. 125333, Sep. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125333>.
- [15] Tsai, Hsu, Lin, Tsai, Chen, and Chang, "Enhancing the Pore Properties and Adsorption Performance of Cocoa Pod Husk (CPH)-Derived Biochars via Post-Acid Treatment", *Processes*, vol. 8, no. 2, p. 144, Jan. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/pr8020144>.
- [16] E. H. Novotny, C. M. B. de F. Maia, M. T. de M. Carvalho, and B. E. Madari, "Biochar: pyrogenic carbon for agricultural use - a critical review", *Rev Bras Cienc Solo*, vol. 39, no. 2, pp. 321-344, Apr. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1590/01000683rbcs20140818>.
- [17] H. Kazemi Shariat Panahi et al., "A comprehensive review of engineered biochar: Production, characteristics, and environmental applications", *J Clean Prod*, vol. 270, p. 122462, Oct. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.122462>.
- [18] A. D. Sanchez-Reinoso, E. A. Ávila-Pedraza, and H. Restrepo, "Use of Biochar in agriculture.", *Acta Biolo Colomb*, vol. 25, no. 2, pp. 327-338. May 2020. DOI: <https://doi.org/10.15446/abc.v25n2.79466>.
- [19] L. Milian-Luperón, M. Hernández-Rodríguez, J. Falcón-Hernández, and A. Otero-Calvis, "Obtaining bioproducts by slow pyrolysis of coffee and cocoa husks as suitable candidates for being used as soil amendment and source of energy", *Revista Colombiana de Química*, vol. 49, no. 2, pp. 23-29, May 2020. DOI: <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v49n2.83231>.
- [20] C.-H. Tsai, W.-T. Tsai, S.-C. Liu, and Y.-Q. Lin, "Thermochemical characterization of biochar from cocoa pod husk prepared at low pyrolysis temperature", *Biomass Convers Biorefin*, vol. 8, no. 2, pp. 237-243, Jun. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13399-017-0259-5>.
- [21] Z. Tan, S. Yuan, M. Hong, L. Zhang, and Q. Huang, "Mechanism of negative surface charge formation on biochar and its effect on the fixation of soil Cd", *J Hazard Mater*, vol. 384, p. 121370, Feb. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121370>.
- [22] X. Yang, S. Zhang, M. Ju, and L. Liu, "Preparation and Modification of Biochar Materials and their Application in Soil Remediation", *Applied Sciences*, vol. 9, no. 7, p. 1365, Apr. 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/app9071365>.
- [23] N. Aggangan, A. Cortés, and C. Rea, "Growth response of cacao (*Theobroma cacao* L.) plant as affected by bamboo biochar and arbuscular mycorrhizal fungi in sterilized and unsterilized soil", *Biocatal Agric Biotechnol*, vol. 22, pp. 1-11, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101347>.
- [24] T. A. Sial et al., "Contrasting effects of banana peels waste and its biochar on greenhouse gas emissions and soil biochemical properties", *Process Safety and Environmental Protection*, vol. 122, no. November, pp. 366-377, Feb. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.psep.2018.10.030>.
- [25] A. Tomczyk, Z. Sokołowska, and P. Boguta, "Biochar physico-chemical properties: pyrolysis temperature and feedstock kind effects", *Rev Environ Sci Biotechnol*, vol. 19, no. 1, pp. 191-215, Mar. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11157-020-09523-3>.
- [26] R. Campos-Vega, K. H. Nieto-Figueroa, and B. D. Oomah, "Cocoa (*Theobroma cacao* L.) pod husk: Renewable source of bioactive compounds", *Trends Food Sci Technol*, vol. 81, pp. 172-184, Nov. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.09.022>.
- [27] J. Guo et al., "Effects of various pyrolysis conditions and feedstock compositions on the physicochemical characteristics of cow manure-derived biochar", *J Clean Prod*, vol. 311, p. 127458, Aug. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.127458>.
- [28] TAPPI, "Acid-insoluble lignin in wood and pulp", 2006. <https://www.tappi.org/content/sarg/t222.pdf>.
- [29] S. Barrezueta Unda, A. Condoy-Gorotiza, and S. Sánchez-Pilcorama, "Efecto del biocarbón en el desarrollo de las plantas de banano (*Musa AAA*) en fincas a partir de un manejo orgánico y convencional", *Enfoque UTE*, vol. 13, no. 3, Jul. 2022. DOI: <https://doi.org/10.29019/efoqueute.815>.
- [30] L. Zhang et al., "Preparation of biochar by mango peel and its adsorption characteristics of Cd(II) in solution", *RSC Adv*, vol. 10, no. 59, pp. 35878-35888, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1039/DORA06586B>.
- [31] H. Romero-Bonilla, J. C. Luque Vera, A. Castillo Sánchez, W. Espinoza Ramón, and L. Olivera Montenegro, "Comparación de modelos cinéticos isotérmicos durante la adsorción de plomo mediante *Azolla caroliniana*", *Ingeniería Industrial*, no. 42, pp. 99-114, Jun. 2022. DOI: <https://doi.org/10.26439/ing.ind2022.n42.5792>.
- [32] N. Y. Asiedu, F. A. Neba, and A. Addo, "Modeling the attainable regions for catalytic oxidation of renewable biomass to specialty chemicals: Waste biomass to carboxylic acids", *S Afr J Chem Eng*, vol. 30, pp. 1-14, Oct. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sajce.2019.07.003>.
- [33] G. Cruz, "Production of Activated Carbon from Cocoa (*Theobroma cacao*) Pod Husk", *Journal of Civil & Environmental Engineering*, vol. 02, no. 02, 2012. DOI: <https://doi.org/10.4172/2165-784X.1000109>.
- [34] A. F. Díaz-Oviedo, B. A. Ramón-Valencia, and G. G. Moreno-Contreras, "Caracterización físico-química de la cáscara de mazorca de cacao como posible uso en la elaboración de tableros aglomerados", *Revista de Investigación, Desarrollo e Innovación*, vol. 12, no. 1, pp. 97-106, Feb. 2022. DOI: <https://doi.org/10.19053/20278306.v12.n1.2022.14211>.
- [35] T. de Paula Protásio et al., "Revealing the influence of chemical compounds on the pyrolysis of lignocellulosic wastes from the Amazonian production chains", *International Journal of Environmental Science and Technology*, vol. 19, no. 5, pp. 4491-4508, May 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13762-021-03416-w>.
- [36] J. E. López, C. Arroyave, A. Aristizábal, B. Almeida, S. Builes, and E. Chavez, "Reducing cadmium bioaccumulation in *Theobroma cacao* using biochar: basis for scaling-up to field", *Helijon*, vol. 8, no. 6, p. e09790, Jun. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.helijon.2022.e09790>.
- [37] D. C. Meza-Sepúlveda, A. M. Castro, A. Zamora, J. W. Arboleda, A. M. Gallego, and A. V. Camargo-Rodríguez, "Bio-Based Value Chains Potential in the Management of Cacao Pod Waste in Colombia, a Case Study", *Agronomy*, vol. 11, no. 4, p. 693, Apr. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/agronomy11040693>.
- [38] M. Munongo, G. Nkeng, and J. Njukeng, "Production and Characterization of Compost Manure and Biochar from Cocoa Pod Husks", *International Journal of Advanced Scientific Research and Management*, vol. 2, no. 2, 2017.
- [39] R. R. Domingues et al., "Properties of biochar derived from wood and high-nutrient biomasses with the aim of agronomic and environmental benefits", *PLoS One*, vol. 12, no. 5, p. e0176884, May 2017. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176884>.
- [40] L. López-Reyes et al., "Adsorption of Plant and Bacterial Carboxylic Acids in Agricultural Soil", *Terra Latinoamericana*, pp. 261-270, 2012.

Citación del artículo:

S. Barrezueta-Unda, H. Romero Bonilla, M. Ríos Hidalgo, "Características principales del biocarbón derivado de restos de *Theobroma cacao* L. para su uso en suelos agrícolas", *Rev. Colomb. Quim.*, vol. 52, no. 1, pp. 19-24, 2023. DOI: <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v52n1.110591>



Recibido: 04/05/2023 Última revisión: 30/07/2023 Aceptado: 29/08/2023

Drogas emergentes: detección mediante sensores electroquímicos

Resumen

La cantidad de nuevas sustancias psicoactivas (NSP) aumenta en el mercado global cada año. El uso de tecnologías para la producción y la comercialización de las sustancias sintéticas y una demanda exigente de efectos psicotrópicos más potentes son algunos de los factores que contribuyen al incremento de una oferta más variada, así como a la cantidad de consumidores de algún tipo de droga.

El desarrollo de herramientas analíticas fiables con capacidad de respuesta *in situ* para una evaluación preliminar contribuye, significativamente, con la generación de información para atender casos de intoxicaciones, aplicar correctamente la legislación de los países e, inclusive, aportar datos reales para una reclasificación más objetiva de las drogas basada en criterios científicos.

Los sensores electroquímicos han ganado terreno en áreas de las ciencias forenses como la toxicología. El uso de tecnologías especializadas para crear electrodos miniaturizados con modificaciones, principalmente con materiales nanoestructurados, guía el desarrollo de dispositivos portátiles de fácil manipulación, altamente versátiles y que requieren microcantidades de la muestra. Asimismo, algunos sensores electroquímicos presentan parámetros de desempeño -como límites de detección (LOD) de hasta 0,608 pg/mL, sensibilidad y precisión- que son analíticamente comparables, bajo ciertas condiciones, con las metodologías convencionales acopladas con la espectrometría de masas, las cuales muestran LOD del orden de magnitud entre 10^{-9} g/mL y 10^{-12} g/mL para la determinación de algunas drogas.

Esta revisión se enfoca en la aplicación y comparación analítica de los sensores electroquímicos voltámerométricos para la determinación de bencilpiperazina (BZP), meta-clorofenilpiperazina (mCPP), 25B-NBO-Me, dimetiltriptamina (DMT), mefedrona (4-MMC), 4-metilethcatinona (4-MEC) y fentanilo (FYL) en representación de las drogas emergentes que se pueden conseguir actualmente en el mercado de las sustancias psicoactivas.

Palabras clave: nuevas sustancias psicoactivas; drogas; sensores; electroquímica.

Emerging drugs: detection by electrochemical sensors

Abstract

The number of new psychoactive substances (NPS) is increasing on the drug global market every year. New technologies for the production and marketing of synthetic substances, along with a rigorous demand for more powerful psychotropic effects, are some of the factors that contribute to the increase in a more varied supply, as well as the number of drug users.

The development of reliable analytical tools with an on-site response capacity for a preliminary determination contributes significantly to the generation of data for the proper care of situations such as poisoning, the correct application of the country's legislation, and even the provision of objective criteria for the reclassification of the substances.

Electrochemical sensors have gained ground in areas of forensic science. The use of specialized technologies to manufacture miniaturized electrodes based on modifications, mainly with nanostructured materials, guides the development of versatile easy-to-handle portable devices that require microquantities of the sample. Likewise, some electrochemical sensors have performance parameters such as detection limits (LOD) up to 0.608 pg/mL, sensitivity and precision that are analytically comparable, under certain conditions, with conventional methodologies coupled with mass detection, which show LOD of the order of magnitude between 10^{-9} g/mL and 10^{-12} g/mL for drug determination. This review focuses on the application and comparison of voltammetric electrochemical sensors for the determination of benzylpiperazine (BZP), meta-chlorophenylpiperazine (mCPP), 25B-NBO-Me, dimethyltryptamine (DMT), mephedrone (4-MMC), 4-methylethcatinone (4-MEC) and fentanyl (FYL) representing the emerging drugs available to date on the psychoactive substances market.

Keywords: new psychoactive substances; drugs; sensors; electrochemistry.

Drogas emergentes: detecção usando sensores eletroquímicos

Resumo

A quantidade de novas substâncias psicoativas (NSP) sintéticas aumenta a cada ano no mercado global. A utilização de novas tecnologias de produção e comercialização de substâncias, combinado com uma demanda exigente de efeitos psicotrópicos mais potentes, são alguns dos fatores que contribuem para o aumento de uma oferta mais ampla, assim como a quantidade dos números de consumidores de algum tipo de droga.

O desenvolvimento de ferramentas analíticas confiáveis e com uma capacidade de resposta *in situ* para uma avaliação preliminar, contribuem significativamente para a geração de informações científicas para cuidar casos de envenenamento, aplicar corretamente a lei, e até fornecer dados reais para uma reclassificação mais objetiva de drogas com base em critérios científicos.

Sensores eletroquímicos ganharam espaço em áreas da ciência forense. A utilização de tecnologias especializadas para criação de eletródos miniaturizados com modificações, principalmente com materiais nanoestruturados, norteiam o desenvolvimento de dispositivos portáteis altamente versáteis, de fácil manuseio e que necessitam de microquantidades da amostra. Da mesma forma, alguns sensores eletroquímicos apresentam parâmetros de desempenho -como limites de detecção (LOD) até 0,608 pg/mL, sensibilidade e precisão- que são analiticamente comparáveis, sob certas condições, com metodologias convencionais com detecção de massa -mostram LOD de a ordem de grandeza entre 10^{-9} g/mL e 10^{-12} g/mL para a determinação de medicamentos-. Esta revisão tem como foco a aplicação e comparação analítica de sensores eletroquímicos voltamétricos para determinação de benzilpiperazina (BZP), meta-clorofenilpiperazina (mCPP), 25B-NBO-Me, dimetiltriptamina (DMT), mefedrona (4-MMC), 4-metilethcatinona (4-MEC) e fentanilo (FYL), que representam os drogas emergentes disponíveis até o momento no mercado de substâncias psicoativas.

Palavras-chave: novas substâncias psicoativas; drogas; sensores; eletroquímica.



Introducción

La definición de drogas emergentes hace referencia a un grupo muy diverso de sustancias psicoactivas de cualquier origen que emergen en determinados momentos en las sociedades de consumo e implican enormes retos para las autoridades y para los sistemas de salud pública [1]. Muchas de estas drogas se clasifican como nuevas sustancias psicoactivas (NSP) porque son sustancias no fiscalizadas internacionalmente, las cuales se caracterizan por ser mayoritariamente sintéticas, lo que ha ocasionado que se conozcan también con el nombre de drogas de diseño.

Según datos de entidades como la Organización de las Naciones Unidas (ONU) y el Observatorio Europeo de las Drogas y la Toxicomanía (OEDT), la cantidad de NSP disponibles en el mercado global de drogas aumenta con cada año. Es común para los distintos países detectar nuevas sustancias mucho más potentes que las drogas convencionales, entre ellas los opioides, los cannabinoides y las catinonas sintéticas; situación que plantea grandes retos para la gestión de la salud pública y para la sociedad [2], [3].

Este incremento dinámico de NSP es favorecido, principalmente, por factores como: las nuevas tecnologías, el traslape entre mercados legales e ilegales y componentes socioeconómicos que permean las distintas formas de vida humana [4], [5]. El estudio de la oferta y la demanda de psicotrópicos en un mercado complejo y cambiante deja entrever una predisposición de consumo por las sustancias no controladas, cuyo estatus de no legalidad es ambiguo en muchos países. Estas drogas emergentes se comercializan como una alternativa para las drogas ilegales y se distribuyen a través de nuevos mecanismos que involucran, usualmente, plataformas digitales como las redes sociales [6], [7].

Según los últimos informes anuales de la Oficina de las Naciones Unidas contra la Drogas y el Delito (ONUDD), algunos de los países más ricos del mundo –mayor producto interno bruto (PIB)– han logrado contener la rápida propagación de las NSP por medio de diferentes acciones que involucran una severa legislación antidrogas. Empero, varias entidades y organizaciones no gubernamentales señalan en la aplicación de estas leyes constantes violaciones a los derechos humanos por parte de las autoridades gubernamentales, una consecuencia lamentable de la actual clasificación de las drogas hecha sin basarse en criterios científicos [8]. Desde otra perspectiva, se observa que los países más pobres con sistemas de control laxos presentan un crecimiento importante en el mercado de las NSP. La falta de recursos financieros, la capacidad limitada de los expertos en salud y una deficiente aplicación de la ley para identificar las NSP con el fin de prevenir un uso inadecuado, aunado a los problemas socioeconómicos que enfrentan estas regiones del planeta, dificultan un abordaje integral y sistematizado de la situación y de la amenaza que esto representa para la vida, la salud y la seguridad [2], [9].

Las medidas sanitarias y las restricciones generales relacionadas con la aparición de la enfermedad del coronavirus (Covid-19) han tenido un impacto negativo en la economía global y en la vida social. Estos factores se relacionan con el aumento del consumo de sustancias psicoactivas y, consecuentemente, con el incremento de casos de sobredosis por el uso inadecuado de estupefacientes y psicotrópicos, hechos que han sido muy notorios en los países europeos y de América del Norte [2], [9]–[12]. Los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC por sus siglas en inglés de Centers for Disease Control and Prevention) estiman que, en el período de 12 meses que finalizó en septiembre del 2022, más de 100.000 personas murieron por sobredosis de drogas, entre las que resaltan los opioides sintéticos como el fentanilo y sus análogos [13].

A pesar del escaso conocimiento sobre la farmacología y la toxicología de algunas NSP que se consumen, ya sea de forma directa

o mediante otros productos de venta –hierbas para aromatizar o sustancias comestibles–, se han identificado unas NSP que generan una mayor adicción que las drogas ya conocidas de uso recreativo como el cannabis. Estos resultados se deben a la rapidez con la que se genera tolerancia a sus efectos en el cuerpo humano, por lo que podría ocasionar una elevada toxicidad inmediata o crónica [14].

En respuesta a los nuevos desafíos que plantea el mercado de NSP, es fundamental desarrollar nuevas herramientas tecnológicas para la identificación y la cuantificación de drogas emergentes de manera expedita sin reducir la calidad analítica. Con el fin de agilizar la entrega de resultados se ha propuesto la implementación de varias técnicas alternativas para el análisis químico de drogas; e. g., los métodos electroquímicos como la potenciometría, la voltamperometría y la amperometría [15], [16]. Estas técnicas electroquímicas se adaptan bien a las condiciones del laboratorio y a las condiciones de campo, en cuyo caso los resultados *in situ* son indispensables para la toma de decisiones por parte de las autoridades correspondientes [17].

Los sensores electroquímicos están diseñados a partir de electrodos de trabajo que pueden modificarse con una amplia variedad de materiales para mejorar la sensibilidad y, en algunos casos, la selectividad [18]. El uso de electrodos desechables en la configuración de los sensores permite superar algunas limitaciones que surgen en los experimentos electroquímicos, tales como la pasivación del electrodo o la deposición de contaminantes insolubles en la superficie activa del electrodo cuando ocurren las reacciones químicas redox [19].

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

En este artículo de revisión se describen la problemática general con el uso de las drogas, los sensores químicos y los parámetros analíticos y diseños de los sensores electroquímicos utilizados en la determinación de psicotrópicos, específicamente las piperazinas BZP y mCPP, la fenetilamina sustituida 25B-NBOMe, la triptamina DMT, las catinonas 4-MMC y su derivado 4-MEC, así como el opioide sintético fentanilo (FYL).

La selección de estas drogas emergentes se fundamenta en la persistencia que han tenido en el mercado por varios años. A pesar de que la mayoría de estas sustancias han pasado a formar parte de las listas de fiscalización internacional de psicotrópicos [20], los últimos informes de la ONUDD y de la OEDT [21]–[23] señalan una demanda constante de estas sustancias en algunas regiones del planeta; situación que ha motivado el desarrollo de sensores electroquímicos con aplicaciones en el corto y en el mediano plazo.

Sustancias psicoactivas

La Organización Panamericana de la Salud (OPS) define las sustancias psicoactivas como diversos compuestos naturales o sintéticos que actúan sobre el sistema nervioso central y que generan alteraciones en las funciones que regulan los pensamientos, las emociones y el comportamiento [24]. Una serie de características de estas sustancias, tanto intrínsecas como extrínsecas, les endosan una considerable atención en el marco sociocultural. Los usos de estos compuestos químicos pueden ser de carácter farmacológico, recreativo o general como sustancias con valor para la industria.

La OPS, además, advierte sobre el riesgo latente del uso de sustancias psicoactivas independientemente de la motivación o de la necesidad por la que se utilizan estos productos. Las consecuencias adversas podrían presentarse en el corto plazo, ya sean problemas de salud inmediatos provocados por una intoxicación o por propi-

ciar situaciones que ponen en riesgo la integridad de la misma persona o de otros individuos, tales como accidentes, conductas violentas, acciones ilegales, prácticas sexuales inseguras, transmisión de enfermedades, entre otros. El uso prolongado de estas sustancias podría implicar problemas más severos que conlleven el desarrollo de trastornos por dependencia en detrimento de la salud y de las relaciones interpersonales [25].

Ciertamente, un impacto negativo en el consumo de psicotrópicos, a corto o a largo plazo, depende de una interacción multifactorial que abarca aspectos propios del individuo, del tipo de consumo, del contexto social y de las sustancias químicas [24]. La combinación de algunos de los factores anteriores puede generar en una determinada población una situación problemática muy compleja de salud pública, la cual hasta la fecha ha sido combatida, principalmente, por leyes nacionales e internacionales de control y fiscalización de estupefacientes, psicotrópicos, precursores y NSP. En esencia, los tratados de fiscalización internacional de drogas tienen como objetivo garantizar la disponibilidad adecuada de sustancias psicoactivas para fines médicos y científicos, asegurándose de que estas sustancias no sean desviadas para propósitos "ilícitos" [26].

Concretamente, estas acciones de control internacional han derivado en la prohibición absoluta del cultivo, producción, fabricación, exportación, importación, venta, posesión y consumo de sustancias psicoactivas, excepto cuando la finalidad es farmacológica o científica, como se mencionó en el párrafo anterior. Esto ha dejado un registro de 302 sustancias fiscalizadas hasta diciembre de 2021 según el Informe Mundial de las Drogas 2022 de la ONUDD [27]. No obstante, entidades como la Comisión Global de Políticas de Drogas consideran que las políticas mundiales que exigen estas prohibiciones son represivas y causantes de los daños colaterales de la "guerra contra las drogas" [28].

Como repercusiones de estas decisiones poco flexibles, estos organismos mencionados señalan: los problemas en la salud, el deterioro de la seguridad pública, el hacinamiento carcelario, la discriminación, el crecimiento del poder de las organizaciones delictivas, la violencia, la corrupción y la falta de acceso a medicamentos esenciales. Este panorama deja entrever la necesidad de aplicar políticas sustentadas en evidencias científicas para la clasificación y el manejo de las sustancias psicoactivas de forma adecuada, ya que prácticas arbitrarias dotaron con el privilegio de legalidad a drogas como el alcohol y el tabaco a pesar de su innegable impacto negativo en la salud pública, los individuos, las familias y las sociedades [29]–[34].

Clasificación de las sustancias psicoactivas

Existen varias formas de clasificar las drogas de acuerdo con el interés de quien hace la clasificación. Por ejemplo, se pueden agrupar por sus efectos farmacológicos en depresoras, estimulantes o alucinógenos; es posible clasificarlas por el origen en naturales, semisintéticas o sintéticas; se pueden separar por su condición de legalidad en legales, ilegales y no controladas; incluso se pueden diferenciar por sus propiedades fisicoquímicas o por su estructura molecular [35], [36]. La forma más común de clasificación de las sustancias psicoactivas es por medio de los tratados del sistema internacional de fiscalización de drogas impulsados por la ONU a través de la Junta Internacional de Fiscalización de Estupefacientes (JIFE), tal como se desglosa en la Figura 1 [37]–[39].

La JIFE tiene el mandato de velar por el cumplimiento de los objetivos de los tratados internacionales. Sin embargo, esta misma entidad ha expresado en varias ocasiones su inquietud ante la desigualdad en diferentes partes del mundo para acceder a sustancias controladas con valor y uso terapéutico [26]. Otros organismos –como ciertas ONG– han denunciado un cumplimiento estricto y violento de las distintas leyes derivadas del régimen internacional de fiscalización de drogas, lo que genera masivas violaciones a los derechos humanos; e. g., las políticas de cero tolerancia, implementadas en algunos países, han ocasionado la ejecución y la detención de miles de civiles en cortos períodos [40].

Asimismo, la ONUDD en su Informe Mundial sobre Drogas 2022 estima que en el 2020 unos 384 millones de personas con edades entre 15 y 64 años consumieron alguna droga no legal en los últimos 12 meses –una de cada 18 personas en ese rango de edad–, para un aumento del 26% con respecto a la década anterior [22]. Ese mismo informe señala el impacto ambiental que genera la producción de las drogas ilícitas, el aumento en el consumo de drogas entre las mujeres y las personas jóvenes, así como el crecimiento continuo de la producción y el tráfico de drogas.

Lo expuesto anteriormente junto con el complejo dinamismo del mercado global de sustancias psicoactivas –novedosas tecnologías facilitan decenas de nuevas drogas sintéticas cada año– evidencian la incoherencia del obsoleto sistema actual de clasificación de drogas [41]. En consecuencia, la categoría de nuevas sustancias psicoactivas que se muestra en la Figura 1 supera por casi cuatro veces la cantidad total de sustancias controladas a nivel internacional, i.e., la mayoría de las NSP no son fiscalizadas en ningún sentido [42].

Clasificación de las sustancias psicoactivas

Junta Internacional de Fiscalización de Estupefacientes

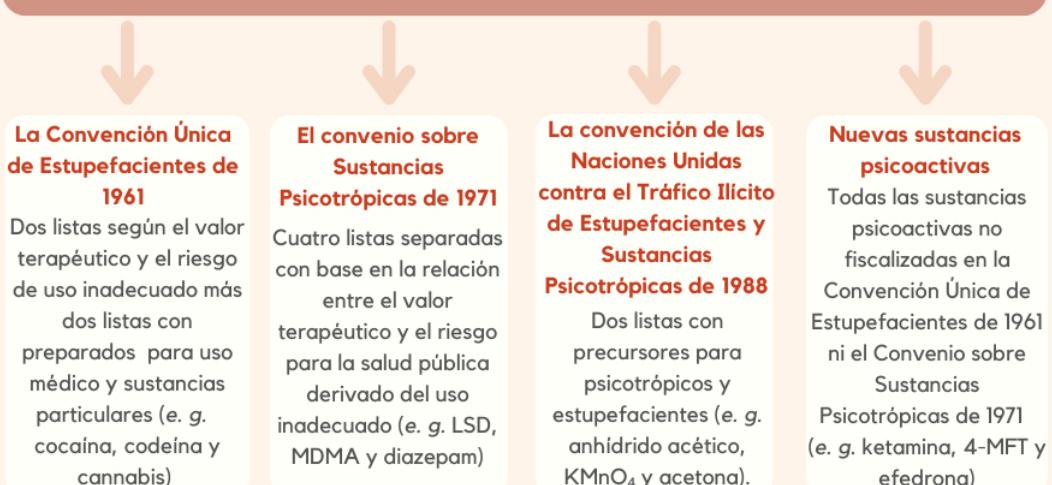


Figura 1. Clasificación general de las sustancias psicoactivas de acuerdo con el sistema internacional de fiscalización de drogas vigente.

Nuevas sustancias psicoactivas (NSP)

El OEDT y la ONUDD han señalado por varios años la disponibilidad y la amplia diversidad en las pautas de consumo de los psicotrópicos. Es evidente el aumento en la circulación sin precedentes de una serie de drogas distintas a los productos tradicionales controlados en los convenios de fiscalización internacional [23]. La forma típica de referirse a estas drogas es como nuevas sustancias psicoactivas (NSP), término que la ONUDD define como sustancias de abuso, ya sea en forma pura o en preparados, que no están controladas por la Convención Única sobre Estupefacientes de 1961 o por la Convención sobre Sustancias Psicotrópicas de 1971, pero que pueden representar una amenaza para la salud pública [43].

Los nombres con los que se conocen las NSP en el mercado varían considerablemente, tanto que puede resultar confuso, para quienes las venden, las compran y las consumen, acertar con la identidad de la sustancia o la composición para el caso de mezclas y preparados [44]. Algunos de los términos más difundidos para los grupos de NSP son: *synthetic drugs* (drogas sintéticas), *legal highs* (euforizantes legales), *bath salts* (catinonas sintéticas), *emerging drugs* (drogas

emergentes), *herbal incense* (cannabinoides sintéticos), *designer drugs* (drogas de diseño), *club drugs* (drogas recreativas), *research chemicals* (drogas de varios grupos, e. g., análogos de la fenciclidina y cannabinoides sintéticos) y *chemsex drugs* (drogas sexuales). Si bien muchas de estas sustancias no ilegales son conocidas desde hace varias décadas, lo que resulta novedoso –como lo indica su nombre NSP– es el uso, la difusión a través de mercados virtuales y de redes sociales, así como la velocidad con la que se reformulan y rediseñan estas drogas [44]–[46].

Existen varios criterios para clasificar las NSP, tal como sucede con la clasificación general de las sustancias psicoactivas; por lo tanto, no hay una forma universal convenida para categorizar estas drogas. Así, es usual encontrar diferencias en las listas que brindan entidades como la ONUDD, el OEDT o la DEA (siglas en inglés de U.S. Drug Enforcement Administration) por mencionar algunas [23], [43], [48]. En la Figura 2 se muestra la clasificación más reciente hecha por la ONUDD, en la que se incluyen once clases basadas en el grupo de sustancia y siete categorías basadas en los efectos farmacológicos.

Clasificación de las nuevas sustancias psicoactivas (NSP)

Oficina de las Naciones Unidas contra la Drogas y el Delito

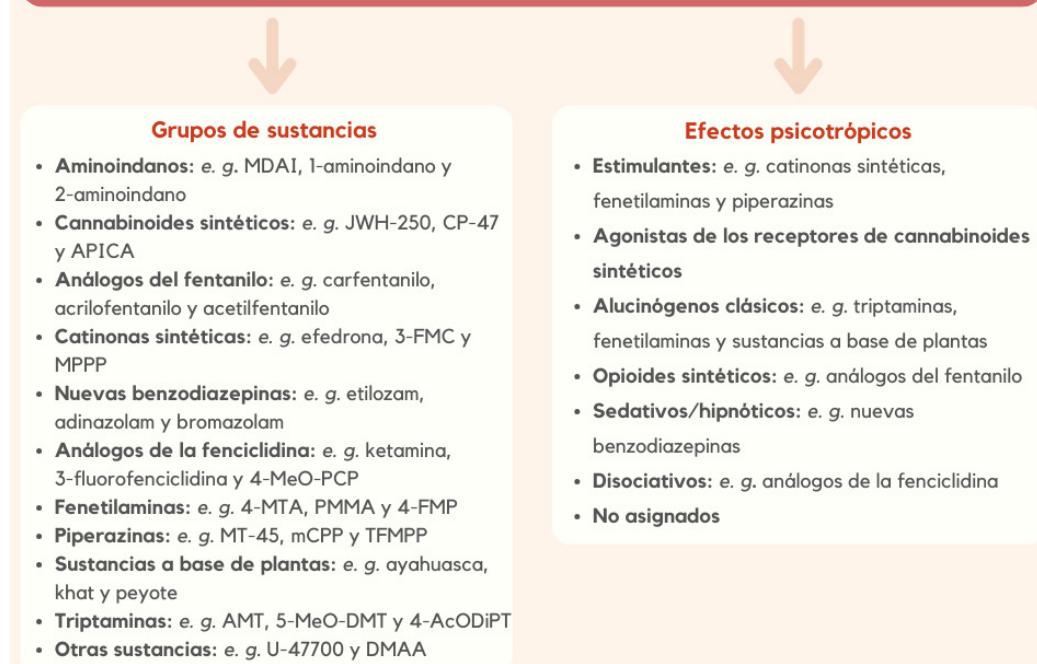


Figura 2. Clasificación de las nuevas sustancias psicoactivas realizada por ONUDD con base en grupos de sustancias y en los efectos farmacológicos. Datos obtenidos del Sistema de Alerta Temprana sobre Nuevas Sustancias Psicoactivas de la ONUDD [42], [43].

Entre 2009 y 2021 se ha contabilizado un total de 1127 tipos de NSP en el mercado global de drogas (ver Figura 3), mientras que la cantidad reportada cada año parece estable alrededor de los 550 tipos de NSP, después de la expansión que sufrió entre el 2009 y el 2018. Solo en el 2020, los estados miembros de la ONU identificaron 77 sustancias completamente nuevas de un total de 548 NSP, lo cual deja en evidencia que, así como hay nuevas sustancias que se integran al mercado mundial, otras NSP no se vuelven a ver en la oferta por motivos como baja rentabilidad o porque ofrecen efectos psicotrópicos similares a los de otras drogas contra las que no pueden adquirir una cuota del mercado de consumidores que les permite afianzarse [42].

En el periodo del 2016 al 2022 la mayoría de las NSP identificadas a nivel mundial fueron estimulantes del tipo catinonas sintéticas y fenetilaminas, seguidas de los cannabinoides sintéticos, a pesar de la disminución observada en la cantidad de incautaciones de estas sustancias desde el 2015 [42].

Los últimos informes sobre drogas emitidos por la ONUDD y la OEDT posicionan al cannabis como la droga de mayor consumo mundial; empero, son enfáticos en la creciente producción de drogas sintéticas –principalmente opioides como los análogos del fentanilo– y el aumento en el consumo experimental y recreativo en todas las latitudes del planeta. De igual forma, estos organismos advierten de la gran cantidad de NSP en la categoría de otras sustancias aún no clasificadas, consecuente con la constante innovación en la producción de drogas, de las cuales la mayoría son NSP con efectos hipnóticos y sedantes, como las nuevas benzodiazepinas [23], [27].

Sensores químicos

Los sensores modernos se emplean para detectar múltiples parámetros de la vida cotidiana. La clasificación general de los sensores se establece con base en el principio fundamental de las mediciones contemplado en su diseño. Los tres grupos principales son: químicos, físicos y biológicos. La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC del inglés International Union of Pure and

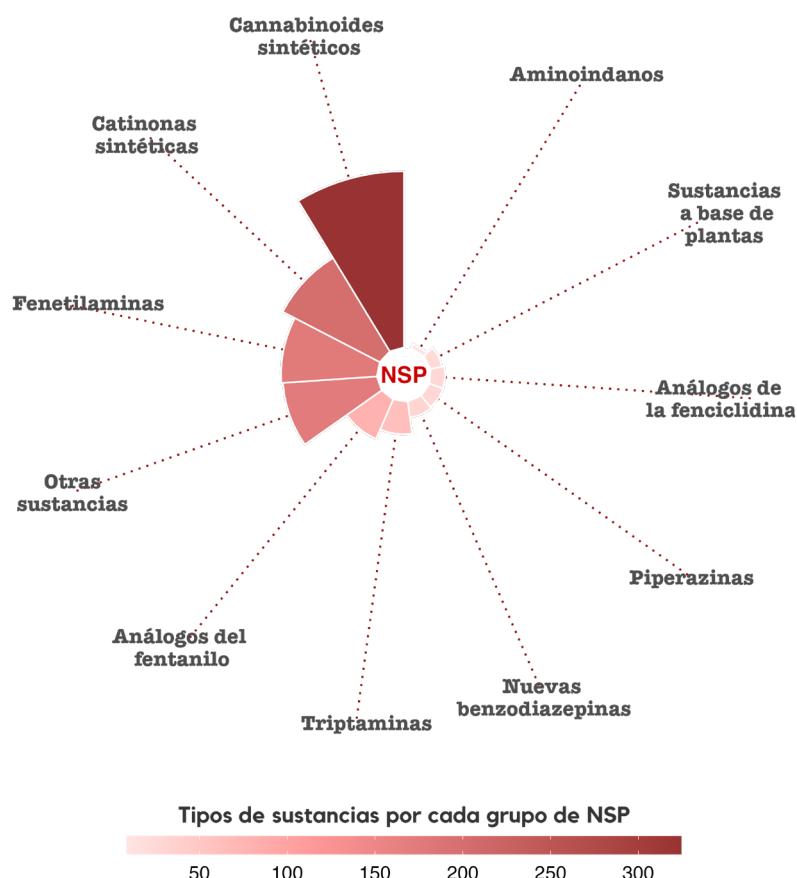


Figura 3. Cantidad de sustancias identificadas por cada grupo de NSP en el mercado global de las drogas entre 2009 y 2021 (R package 'ggplot'). Datos obtenidos del Informe Mundial sobre las Drogas 2022 de la ONUDD [42].

Applied Chemistry) definió un sensor químico como un dispositivo que transforma la información química, desde la concentración de un componente específico de la muestra hasta el análisis de la composición total, en una señal analíticamente útil. La información química puede provenir de una reacción química del analito o de una propiedad física del sistema investigado [49].

Al menos dos componentes básicos componen todo sensor químico: un sistema de reconocimiento o receptor que transforma la

información química en una forma de energía y un transductor que convierte la energía en una señal de interés analítico. La forma más común de clasificar los sensores químicos se fundamenta en estos dos elementos, tal como se resumen en la Figura 4.

Un sensor electroquímico, según la misma IUPAC, es un sistema de medición que permite convertir la información de una reacción química en una señal eléctrica cuantificable por medio de un transductor apropiado [50]. Los componentes transductores en este tipo de

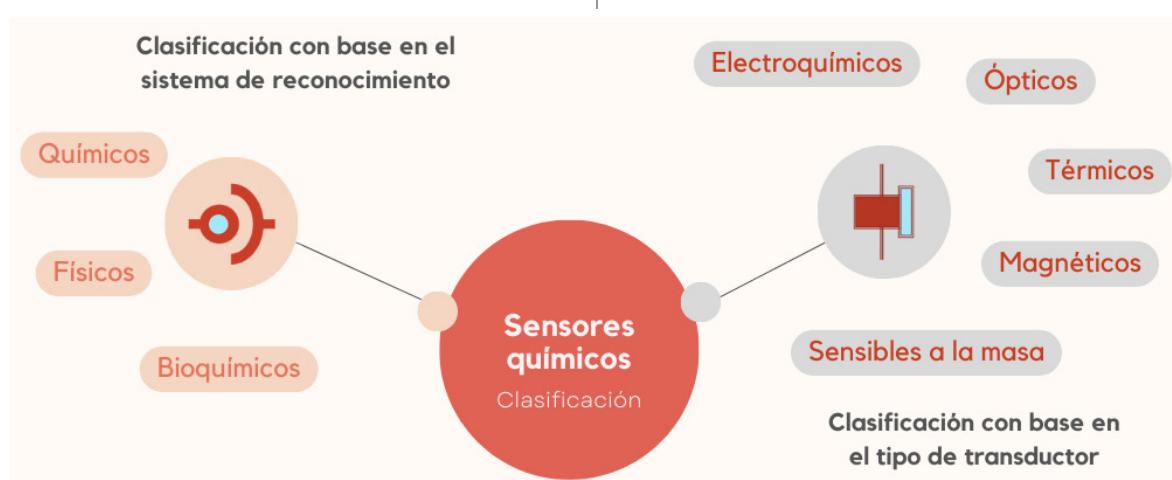


Figura 4. Clasificación de los sensores químicos con base en el tipo de receptor y transductor.

dispositivos son conjuntos electródicos seleccionados con base en la función del sensor y empleados bajo condiciones de operación controladas. Los electrodos sólidos de trabajo, como los que están hechos a base de carbono vítreo o de diamante dopado con boro, han sido extensamente estudiados como transductores porque presentan una amplia ventana de potenciales eléctricos y una baja corriente residual, características muy deseables para la construcción de los sensores [51], [52].

Las mejoras sustanciales en el desarrollo de ciertos electrodos los hacen cada vez más versátiles y han solucionado algunos de los in-

convenientes en el uso de los electrodos convencionales, tales como la baja reproducibilidad, los procedimientos tediosos de limpieza y la cantidad de muestra requerida para el análisis. Los principales cambios han surgido de la miniaturización y del carácter desechable de los nuevos electrodos. Por ejemplo, como ha sucedido con los dispositivos elaborados con la tecnología serigráfica, los cuales han impulsado el desarrollo general de los sensores químicos [52]–[54].

El uso de los electrodos serigrafiados como una herramienta de análisis químico ha revitalizado algunas de las aplicaciones básicas de la electroquímica. Su diseño clásico de los tres electrodos in-

tegrados en un sustrato ha llegado, incluso, a sustituir las celdas electroquímicas comunes como consecuencia de la reducción del volumen de trabajo a una sola gota. Para serigrafiar este tipo de electrodos se emplean tintas de diversas composiciones, entre las que destacan la tinta de carbono, de plata, de oro y de platino; ya sea sobre un sustrato rígido como la cerámica o sobre un sustrato flexible como el plástico o los textiles. El proceso de fabricación de estos dispositivos incluye, además, una etapa de secado y de curado a una determinada temperatura de acuerdo con las propiedades que se requieran en el diseño del sensor [55]–[57].

La simplicidad de fabricación y el bajo costo que conllevan los sensores electroquímicos los han posicionado en el mercado como una herramienta analítica significativa para detectar y cuantificar una amplia variedad de analitos en diversas áreas, como la biomedicina, las ciencias ambientales y las ciencias forenses [59]. Es importante resaltar que este tipo de sensor es el más utilizado principalmente por su buen desempeño analítico que se hace notorio en los bajos límites de detección (LOD), en un amplio rango lineal y en una buena precisión; todo lo anterior combinado con cortos intervalos de tiempo de análisis y con la posibilidad de realizar mediciones veraces en tiempo real sobre la composición química de su entorno, ya sea en el laboratorio o en condiciones de campo [60].

Clasificación de los sensores electroquímicos

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

Sensores conductimétricos: el principio de funcionamiento de los sensores de este grupo es la medición de los cambios de la conductividad eléctrica o de alguna otra propiedad relacionada con la conductividad, ya sea de una porción de un material o del seno propio del material cuya conductividad se ve afectada por la presencia de un analito. Las mediciones con estos dispositivos determinan la habilidad de una sustancia para restringir el paso de una corriente entre dos electrodos –resistencia eléctrica o en su lugar impedancia si emplea una corriente alterna– [61].

Los métodos que se utilizan con los sensores conductimétricos son principalmente no selectivos debido a que la gran mayoría de electrodos son fabricados de metales inertes como el oro o el platino. No obstante, el desarrollo de nuevos materiales aplicados en la modificación de superficies electródicas, junto con una instrumentación muy mejorada, han permitido formular procedimientos más viables para diseñar sensores selectivos para ciertos iones [62].

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

Los sensores potenciométricos han sido el grupo de sensores electroquímicos más estudiados y desarrollados durante varias décadas. La mayor aplicación de estos dispositivos provino de la creación de los electrodos selectivos de iones, como sucedió con el electrodo de membrana selectiva de vidrio, tan ampliamente utilizado hoy en día para las mediciones de pH. Los electrodos indicadores metálicos redox y los electrodos de óxido metálico mixto son los otros dos tipos de electrodos que se emplean para el diseño y elaboración de los sensores pertenecientes a esta categoría [63], [64].

Sensores voltamperométricos: los sensores de este tipo registran la información del sistema de medición a través de la intensidad de corriente obtenida (directa o alterna) al imponer un potencial eléctrico sobre el electrodo de trabajo. La aplicación de esta técnica en el desarrollo de sensores conlleva la medición de la corriente en función de un barrido temporal de potencial en la celda electroquímica. Sin embargo, esta forma de imposición de potencial no es la única manera de aplicar un voltaje en el electrodo de trabajo. Si el potencial se mantiene constante durante todo el ensayo, se puede medir la corriente en función del tiempo; a este subgrupo de sensores se les conoce como sensores amperométricos. Otro subgrupo de sensores en esta categoría, aunque menos comunes, son los dispositivos que no requieren de una fuente externa de corriente, conocidos como sensores galvánicos [49], [65].

Según la IUPAC, los sensores voltamperométricos se fundamentan en el uso de electrodos inertes, electrodos químicamente activos y electrodos modificados [49]. La investigación en el uso de materiales novedosos para este último grupo de electrodos ha mejorado algunas de las limitaciones que presentan los sensores electroquímicos en general, por ejemplo, la baja selectividad y, en algunas ocasiones, la poca sensibilidad. Los sistemas modernos de detección se han beneficiado de los avances de la microelectrónica y la microingeniería, principalmente en el desarrollo de electrodos miniaturizados y más baratos cuya respuesta analítica suele tener una mejor relación de la señal con respecto al ruido [66].

La innovación en el desarrollo de sensores voltamperométricos se ha llevado a cabo gracias a la nanotecnología y la nanociencia por medio de la síntesis y de la aplicación de los nanomateriales compuestos. Las propiedades de estos materiales a escala nanométrica repercuten, particularmente, en los sistemas de medición, en los cuales el área superficial desempeña un papel importante, tal como sucede en las mediciones electródicas interfaciales [67], [68].

Entre los materiales más utilizados para la modificación de superficies de los electrodos están los metales, las cerámicas, los semiconductores, los polímeros, los compuestos organometálicos y las biomoléculas. Las estructuras nanométricas comunes en las que se emplean estos materiales tienen formas de nanopartículas, nanotubos, nanoestrellas, nanofibras, nanoesferas y nanoláminas [69], [70].

Algunos de los materiales nanocompuestos ampliamente utilizados son las nanopartículas de oro, los nanotubos de carbono, el grafito y las enzimas. Entre las principales ventajas que aportan las modificaciones de los electrodos, aparte del ya mencionado aumento del área superficial, destacan el aumento de la reactividad, una mayor biocompatibilidad, el incremento en la adsorción, la catálisis de reacciones electroquímicas y el soporte estructural para la inmovilización de moléculas. Algunas de estas características influyen positivamente en la eficiencia de la transferencia de carga, lo que se traduce en un mejor desempeño analítico del sensor [60].

Biosensores electroquímicos

La modificación de los transductores electroquímicos (electrodos) con biomoléculas ha sido una práctica muy estudiada para el desarrollo de dispositivos más sensibles y puntualmente más selectivos. Los biosensores se pueden diferenciar de acuerdo con el elemento biológico utilizado como receptor. Algunos de estos pueden ser: organismos, anticuerpos, membranas, organelas, células, tejidos, ácidos nucleicos y enzimas [71]. Las modificaciones electródicas dan origen a biosensores conductimétricos, potenciométricos y voltamperométricos; la elección de la técnica de electroanálisis depende de la reacción biológica que media a través del sistema de reconocimiento. El receptor molecular podría involucrar una conversión del analito en sus respectivos productos por medio de un proceso biocatalítico, o bien, medir las interacciones del analito mediante el

reconocimiento específico sin una reacción química basada exclusivamente en la bioafinidad. De estos dos subgrupos de biosensores, es claro que los biocatalíticos requieren de una mayor atención en esta sección, puesto que los sensores voltamperométricos miden la corriente que se produce en una reacción de transferencia de electrones [61], [72].

Los biosensores surgieron en la década de los años 1960. La primera publicación científica sobre un biosensor se refiere a un dispositivo propuesto para la determinación de la glucosa en la sangre. Su principio de medición se fundamentó en la reacción catalítica de oxidación del monosacárido en ácido glucónico por acción de la enzima glucosa oxidasa inmovilizada en un electrodo selectivo de oxígeno [73]. Desde entonces, los avances en el desarrollo de este tipo de sensor electroquímico han sido muy significativos y lo han convertido en uno de los sensores con mayores aplicaciones gracias a los enfoques innovadores que involucran múltiples disciplinas [74].

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



La velocidad de formación del producto en la expresión anterior, $d[P]/dt$, se representa por medio de un reacomodo matemático de la ecuación de Michaelis-Menten y se muestra a continuación (Ec. 1):

$$\frac{d[P]}{dt} = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]} \quad (1)$$

en la cual V_{max} es la velocidad máxima de la reacción y K_m corresponde a la constante de Michaelis-Menten definida como la concentración del sustrato cuando la velocidad de reacción es la mitad de V_{max} . Esta constante es afectada por varios factores, entre ellos, la temperatura, el pH y ciertas propiedades del sustrato mismo [75].

Unas de las enzimas más empleadas en el diseño y construcción de los biosensores catalíticos son las oxidoreductasas, un tipo de biomoléculas que catalizan la transferencia de electrones en las reacciones tipo redox; cualidad que resulta muy útil para el desempeño analítico del sensor electroquímico. Si bien dicha transferencia electrónica entre el centro redox de la proteína y la superficie electródica puede suceder de forma directa, la transferencia no siempre ocurre con facilidad, debido al aislamiento que generan las mismas cadenas polipépticas. En estos casos es recomendable modificar estructuralmente la superficie del electrodo o utilizar moléculas mediadoras para mejorar el flujo de transferencia de electrones como se representa en la Figura 5 [76].

La elaboración de este tipo de sensor electroquímico requiere la adherencia al transductor, tanto de la enzima como de cualquier otro elemento que forme parte del diseño estructural. Los métodos de inmovilización se pueden agrupar en dos categorías: a) los físicos, como el atrapamiento y los procedimientos con inclusión en membranas, y b) los químicos, entre los que se pueden mencionar la adsorción, el entrecruzamiento y la fijación por medio de enlaces covalentes. La principal ventaja de la fijación de los componentes es brindar una mayor estabilidad de la enzima y del sistema de medición completo; aunque esto puede disminuir la actividad catalítica ocasionalmente [77].

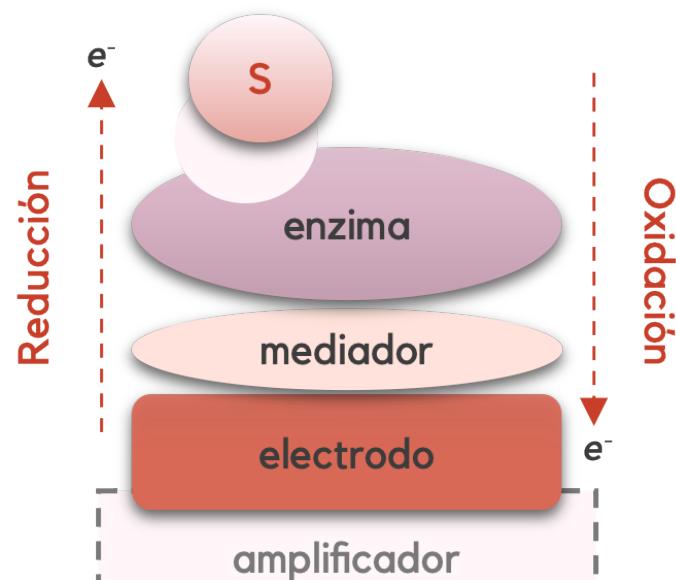


Figura 5. Diseño básico de un biosensor con mediador para el flujo electrónico. Las flechas indican la dirección del flujo de electrones en la catálisis enzimática. *S* corresponde al sustrato.

Una de las técnicas más extendidas para la inmovilización de agregados proteicos es la reacción de entrecruzamiento a través del glutaraldehído ($C_5H_8O_2$). Este compuesto orgánico se distribuye comercialmente en disoluciones acuosas que presentan distintas estructuras químicas –forma monomérica, cadenas lineales hidratadas, hemiacetales cílicos y oligómeros– de acuerdo con el pH, la concentración y la temperatura. El glutaraldehído suele reaccionar con las aminas primarias presentes en las estructuras básicas de las proteínas para formar enlaces covalentes entrecruzados que se extienden por polimerización fijando las macromoléculas a la superficie electródica [77]–[79]. Algunos procedimientos alternativos que mejoran la fijación polimérica de las proteínas son el depósito previo de nanomateriales como los nanotubos que sirven para un mayor soporte y los pretratamientos electroquímicos de las superficies de los electrodos.

Sensores espectroelectroquímicos

El diseño de dispositivos de alta especificidad –*e. g.*, los sensores selectivos de iones o los biosensores– contribuye a mejorar la selectividad en los sistemas de medición electroquímicos. Para que esto suceda, deben cumplirse condiciones muy específicas que no siempre se pueden garantizar si se toman en cuenta las propiedades fisicoquímicas del analito y las características de la matriz de análisis. Otra solución para aumentar la capacidad de resolución analítica suele ser la combinación de técnicas instrumentales para recolectar información de los fenómenos que ocurren en un proceso electroquímico desde dos aristas distintas. Esta tecnología híbrida integrada en un sensor voltamperométrico combina las ventajas de cada técnica analítica en un solo ensayo para obtener una mejor descripción del sistema químico [81].

La espectroelectroquímica (SEC por las siglas en inglés de spectroelectrochemistry) se compone de un grupo de métodos de análisis que combinan las mediciones de espectrometría y de electroquímica para adquirir datos de forma simultánea e *in situ* en una celda electroquímica [82]. El aporte espectroscópico depende de la región del espectro analizada, del tipo de interacción que tenga con el analito y de la forma en la que se mida. Los resultados de la espectroscopía molecular, luminiscente o vibracional, por mencionar algunas metodologías ópticas, contribuyen no solo a recopilar información estructural y conformacional para identificar las especies electroactivas e intermedios de la reacción, sino a elucidar los mecanismos de transferencia electrónica y a entender mejor los sistemas estudiados [83], [84].

La cuantificación en los análisis SEC generalmente se realiza por medio del transductor electroquímico empleado en el sensor, algunos de los cuales se consiguen comercialmente en múltiples presentaciones que van desde electrodos ópticamente transparentes hasta sustratos de superficie mejorada para espectroscopía Raman [85].

No obstante, cada vez resulta más común la elección de técnicas espectroscópicas con una utilidad más allá de la descripción e identificación molecular. Por tal motivo, las combinaciones de técnicas más usadas para el desarrollo de este tipo de sensor son: SEC de absorción UV-Vis, SEC de fluorescencia y SEC de dispersión Raman. Independientemente del objetivo con el que se configure el sistema híbrido SEC, su mayor potencial proviene del carácter dinámico de la correlación bidimensional de metodologías y de la capacidad de alta resolución temporal [86].

SEC de UV-Vis: los sensores de esta categoría combinan la técnica de absorción molecular en la región del espectro ultravioleta o visible con alguna de las técnicas electroquímicas. Ha sido por muchas décadas la herramienta espectroelectroquímica más explorada, principalmente por su versatilidad, su bajo costo y porque es un procedimiento relativamente sencillo [87].

La configuración de la celda de medición se establece de acuerdo con el ángulo de incidencia del haz de luz, que puede ser perpendicular al electrodo (configuración normal) o de forma paralela (es decir, el camino óptico más largo). El principio de medición espectroscópico varía tanto por la configuración de la celda como por lo que se desea investigar del sistema electroquímico; así podría emplearse, e. g., espectroscopía UV-Vis en modo de transmitancia o reflectancia [86], [88].

SEC de fluorescencia: los sensores espectroelectroquímicos de este tipo adicionan al desempeño electroquímico la alta sensibilidad y la selectividad de la espectroscopía fluorescente; propiedades que permiten ampliar el rango de aplicaciones en distintos campos, principalmente en aquellos en los que se requiere un análisis cuantitativo. Uno de los mayores aportes de esta metodología es el monitoreo del tiempo de vida de especies luminiscentes bajo la transformación electroquímica *in situ* del analito [89].

Por el contrario, la poca versatilidad de las celdas de medición para cumplir con el requisito de detección luminiscente a 90°, sumado a que se limita a un grupo reducido de moléculas electroactivas que presentan una buena intensidad fluorescente, contribuyen a desestimular su investigación y su uso. Esto ha impedido el desarrollo exhaustivo de sensores como el que sí ha tenido la SEC de absorción UV-Vis [90], [91].

SEC de Raman: la espectroscopía Raman es una técnica basada en el efecto de la dispersión inelástica –dispersión Raman– de una fuente de luz láser monocromática, usualmente en la región entre el ultravioleta cercano y el infrarrojo cercano. En los últimos años la SEC de espectroscopía Raman se ha convertido en una herramienta valiosa para estudiar diversos procesos electroquímicos. Algunas de las aplicaciones más importantes son: estudios de transferencia iónica y electrónica, análisis cualitativos y cuantitativos, caracterización de materiales y estudios sobre la transformación y el almacenamiento de la energía [92], [93].

A pesar de que la espectroscopía Raman es una de las mejores técnicas para la identificación molecular mediante la huella espectroscópica de frecuencias vibracionales, su uso en SEC ha estado subordinado a la sensibilidad analítica que determina la señal de la dispersión Raman, la cual es bastante baja en relación con la dispersión elástica de Rayleigh, ya que aproximadamente solo una molécula en el intervalo entre 10^8 moléculas y 10^{11} moléculas experimenta una dispersión inelástica [88]. El posicionamiento como una herramienta versátil y con potencia analítica para mediciones de

SEC, proviene de la integración de técnicas que amplifican significativamente las señales de las frecuencias de dispersión, por ejemplo, la espectroscopía Raman de superficie mejorada (SERS por las siglas en inglés de *surface enhanced raman spectroscopy*) [94], [95].

El fenómeno SERS ocurre por la combinación de dos mecanismos principales; el primero es el mecanismo electromagnético, cuyo efecto se debe a la resonancia de los plasmones cuando inciden los fotones sobre la superficie rugosa del sustrato metálico, que ocasiona un aumento del campo eléctrico y así un incremento de la señal. El segundo es el aumento químico, el cual es un tanto más difícil de predecir y significativamente más débil que el efecto electromagnético. De forma muy general, este efecto químico se puede atribuir a la transferencia de carga que se da en un pseudocomplejo entre las moléculas del analito y la superficie nanoestructurada del sustrato [92], [96].

La ganancia en la amplificación de la señal por medio de la técnica SERS es de varios órdenes de magnitud, aproximadamente entre 10^{10} y 10^{14} veces mayor que la señal convencional [97], [98], que, según reportes de la literatura científica, es suficiente para detectar una molécula individual [99], [100].

Hoy en día existen muchas configuraciones de celdas para las mediciones de SEC de Raman, múltiples materiales empleados como sustratos y diversas formas de dirigir los ensayos electroquímicos y los espectroscópicos. Por ejemplo, es posible emplear el procedimiento electroquímico para cuantificar el analito, para electroactivar la superficie del sustrato con el propósito de favorecer el mecanismo SERS o para absorber el analito sobre la superficie plasmónica del metal [86], [101].

El incremento que proporciona la técnica SERS a la sensibilidad analítica, sumado a la alta selectividad de la espectroscopía Raman, convierten la SEC de espectroscopía Raman en una de las técnicas más promisorias para el desarrollo de sensores espectroelectroquímicos. Los esfuerzos de investigación actuales van dirigidos hacia la búsqueda y creación de nuevos y mejores materiales que funcionen como superficie electródica y a la vez como sustrato para SERS [102].

Sensores electroquímicos para el análisis de drogas emergentes sintéticas

El análisis químico de las sustancias psicoactivas abarca una serie de elementos que incluyen procedimientos muy específicos para la recolección de las muestras y técnicas de análisis muy especializadas para la determinación de los analitos [17]. En el campo de las pruebas de drogas se distinguen, generalmente, dos tipos de análisis: las pruebas preliminares y las pruebas confirmatorias. Las metodologías analíticas por excelencia para la confirmación cualitativa y cuantitativa de drogas se basan en técnicas estandarizadas de separación acopladas con la espectrometría de masas, e. g., la cromatografía de gases (GC-MS del inglés *gas chromatography-mass spectrometry*) y la cromatografía líquida (LC-MS del inglés *liquid chromatography-mass spectrometry*) [103], [104].

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

Es bien conocido el buen desempeño analítico que presentan las técnicas de separación con espectrometría de masas. Las altas sensibilidad y selectividad hacen posible la determinación, básicamente, de cualquier psicótropo y de sus derivados con un elevado porcentaje de confiabilidad, incluso a niveles de concentración muy

bajos y en diferentes matrices [105]. Por ejemplo, Nan Quin *et al.* reportaron límites de detección para la determinación simultánea de 37 compuestos análogos del fentanilo y otros nuevos opioides sintéticos entre 0,5 y 2,5 pg/mg en muestras de cabello por cromatografía líquida de ultra alta resolución con espectrometría de masas en tandem (UHPLC-MS/MS) [106]. Thomas Berg *et al.* encontraron, con esa misma técnica, un LOD de 44 pg/mL para la determinación de fentanilo en muestras de sangre entera [107].

No obstante, estas potentes plataformas analíticas están restringidas a un entorno de laboratorio debido a la falta de características de portabilidad instrumental. Así mismo, los tiempos de respuesta analítica no son inmediatos a causa de la manipulación y de la preparación de muestras en varias etapas [108]. Estas características –sumadas a los altos costos de mantenimiento– han motivado la búsqueda de herramientas más versátiles y con menores costos operativos que permitan solventar las necesidades de una primera

Tabla 1. Sensores electroquímicos reportados en la literatura para la cuantificación de un grupo de NSP sintéticas.

NSP	Método	Electrodo de trabajo	Medio	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	Fecha de publicación	Referencia
25B-NBOMe	DPV	SP-C	PBS pH 7,0	11	12-2016	[113]
	SWV	BDD	BA pH 4,0	0,04	08-2017	[114]
	SWV	BDD	BA pH 9,5	0,04	04-2018	[115]
	DPV	BDD	$\text{CH}_3\text{CN}/\text{TEAP}$	0,24	01-2021	[116]
	DPV	SP-C	BBR pH 8,0	0,44	01-2021	[116]
	DPV	SP-Pt	$\text{CH}_3\text{CN}/\text{TEAP}$	0,76	01-2021	[116]
BZP	SWV	CP	BBR pH 9,5	1,0	12-2016	[117]
	DPV	BDD	$\text{CH}_3\text{CN}/\text{TEAP}$	0,77	01-2021	[116]
	DPV	SP-C	BBR pH 9,0	0,61	01-2021	[116]
	DPV	SP-Pt	$\text{CH}_3\text{CN}/\text{TEAP}$	1,3	01-2021	[116]
	DPV	SP-C	BBR pH 5,0	0,05	04-2021	[118]
mCPP	POT	PMBS	Tris-HCl pH 7,0	0,10	09-2019	[119]
	DPV	BDD	BBR pH 10	0,22	02-2020	[120]
	DPV	BDD	$\text{CH}_3\text{CN}/\text{TEAP}$	0,27	01-2021	[116]
	DPV	SP-C	BBR pH 8,0	0,15	01-2021	[116]
	DPV	SP-Pt	$\text{CH}_3\text{CN}/\text{TEAP}$	1,1	01-2021	[116]
	SWV	SP-C	BBR pH 7,0	0,02	10-2021	[121]
DMT	DPV	GC/BMIMNTF ₂ /ZnTRP	NaClO ₄ pH 6,0	0,33	03-2020	[122]
	DPV	BDD	$\text{CH}_3\text{CN}/\text{TEAP}$	0,38	01-2021	[116]
	DPV	SP-C	BBR pH 8,0	0,33	01-2021	[116]
	DPV	SP-Pt	$\text{CH}_3\text{CN}/\text{TEAP}$	1,8	01-2021	[116]
4-MMC	CV	SP-G	PBS pH 12,0	13,2	11-2013	[123]
	CV	SP-G	BA pH 4,3	11,8	08-2014	[124]
	CV	Moneda de un penique	BA pH 8,5	0,56	07-2015	[125]
	SWV	MIP/polytyramine/f-MWCNT@AuNPsnanocomposite/GC	pH 6,0	$1,42 \times 10^{-4}$	08-2018	[126]
	CV-SERS	SP-Au	H ₂ SO ₄ pH 1,8	6,6	12-2021	[101]
	AdSSWV	CP/AgNPs@Sa	Tris-HCl pH 9,0	$6,08 \times 10^{-7}$	02-2022	[127]
	DPV	GC/GO/DHP	BF pH 6,0	0,21	04-2022	[128]
	POT	Selectivo de iones	--	0,18	01-2023	[129]
4-MEC	CV	SP-G	PBS pH 12,0	36,3	11-2013	[123]
	CV	SP-G	BA pH 4,3	11,6	08-2014	[124]
	CV	Moneda de un penique	BA pH 8,5	0,50	07-2015	[125]
	CV-SERS	SP-Au	H ₂ SO ₄ pH 1,8	2,4	12-2021	[101]
FYL	CSWV	SP-C/ [C ₄ C ₁ pyrr][NTf ₂]	PB pH 7,4	1,68	02-2019	[130]
	SWV	SP-C/MWCNT-PEI-IL (electrodo flexible sobre un guante)	PBS pH 7,4	3,36	04-2019	[131]
	DPV	GC/CNOs	PB pH 7,0	0,101	01-2020	[132]
	DPV	Reticulado de SWCNT	PBS pH 7,4	0,004	01-2020	[133]
	DPV	Zn(II)-MOF/SP-C	PB pH 7,0	0,101	04-2020	[134]
	AdSSWV	SP-C	Tris-HCl pH 8,5	0,233 0,037	07-2020	[135]
	AdSDPV	MWCNT-GC	PB pH 7,4	0,034	09-2020	[136]
	DPV	NiO@CNTs/GC	PBS pH 7,0	0,003	10-2021	[137]
	SWV	LCE	PBS pH 7,4	0,336	04-2022	[138]
	DPV	GC/MWCNT-HA/Cu-H ₃ BTC	PBS pH 7,0	0,001	07-2022	[112]
	SWV	Au sobre sustrato de MPSi/FEN-Ab	PB pH 7,4	0,006	08-2022	[139]
	SWV	ERGO-GC	PBS pH 7,4	0,002	09-2022	[140]
	AdSCV	Cytic/MWCNT/SP-C	PB pH 7,5	0,086	11-2022	[141]

DPV: differential pulse voltammetry, SWV: square wave voltammetry, POT: potenciómetria, CV: cyclic voltammetry, AdSSWV: adsorptive stripping SWV, CSWV: cyclic SWV, AdSDPV: adsorptive stripping DPV, SP-C: screen-printed carbon, BDD: boron-doped diamond, SP-Pt: screen-printed platinum, CP: carbon paste, PMBS: polymeric membrane-based sensor, GC: glassy carbon, BMIMNTF₂: líquido iónico, ZnTRP: complejo supramolecular, SP-G: screen-printed graphite, MWCNT: multi-walled carbon nanotubes, MIP: molecular imprinted polymer, f-MWCNT@AuNPs: functionalized MWCNT@ gold nanoparticles, SP-Au: screen-printed gold, AgNPs@Sa: silver nanoparticles capped with saffron, GO: graphene oxide, DHP: dihexadecyl hydrogen phosphate, [C₄C₁pyrr][NTf₂]: líquido iónico, PEI: polietilamina, IL: ionic liquid, CNOs: carbon nanoionions, SWCNT: single-walled carbon nanotubes, MOF: metal-organic framework, NiO@CNTs: nanocompuesto a base de NiO y nanotubos de carbono, LCE: laser carbonized electrode, HA: hidroxipatita, Cu-H₃BTC: copper-based metal-organic framework, MPSi: silicio meso-macro-poroso, FEN-Ab: anticuerpos para fentanilo, ERGO: electrochemically reduced graphene oxide, Cytic: citocromo c, PBS: phosphate-buffered saline, BA: buffer de acetato, TEAP: tetraethyl ammonium perchlorate, BBR: Buffer Britton Robinson, BF: buffer de fosfatos.

respuesta en ensayos preliminares.

Los nuevos dispositivos de detección miniaturizados han provisto a la comunidad científica de aplicaciones modernas para el monitoreo analítico en tiempo real en las pruebas de drogas. Ciertas características de los sensores electroquímicos –como la fácil manipulación, una mínima huella residual relacionada con la capacidad de analizar microcantidades de muestra, así como un bajo costo para el diseño y el desarrollo del dispositivo– destacan la idoneidad para los análisis *in situ* [109]. Hazhir Teymourian *et al.* realizaron un estudio de revisión sobre sensores portátiles no invasivos para el análisis de drogas terapéuticas y de abuso en fluidos corporales [110]. Aquí se destacan tecnologías empleadas en dispositivos sensibles que pueden ser usados como prendas o accesorios, tales como guantes o anillos, lo cual evidencia la versatilidad y el potencial que tienen los sensores en aplicaciones *in situ*.

Los procedimientos electroquímicos de los distintos sensores se adaptan bien a las condiciones requeridas de campo. Ofrecen, además, métodos de cuantificación precisos y con bajos límites de detección, cuyos resultados permiten tomar decisiones en el sitio junto con las autoridades correspondientes, previo al envío de las muestras al laboratorio para su procesamiento y análisis confirmatorio [16], [111].

En un estudio de investigación realizado por Maryam Akbari *et al.* se presentó un nanosensor electroquímico (GCE/MWCNT-HA/Cu-H₃BTC) para el análisis de fentanilo en disoluciones acuosas con un LOD de 3 nM (1 ng/mL) [112]. Este valor (10⁻⁹) es apenas tres órdenes de magnitud superior a los límites de detección que hemos visto en párrafos anteriores para las técnicas con detección de masas (10⁻¹²); sin embargo, es notorio que el sensor muestra parámetros de desempeño muy buenos; además, la brecha en la sensibilidad entre los dispositivos electroquímicos y las técnicas de separación es cada vez más pequeña gracias a la implementación de nuevas tecnologías y de nuevos materiales.

En la Tabla 1 se muestran los sensores electroquímicos reportados para la determinación cuantitativa de las siguientes sustancias psicoactivas sintéticas: las piperazinas BZP y mCPP, la fenetilamina sustituida 25B-NBOMe, la triptamina DMT, las catinonas 4-MMC y su derivado 4-MEC, así como el opioide FYL.

En la última década se han reportado alrededor de 50 sensores electroquímicos basados en distintas metodologías y modificaciones electródicas para las siete sustancias psicoactivas en estudio. Los dispositivos referidos en la Tabla 1 para el análisis de la fenetilamina 25N-BOMe emplean las técnicas de DPV y de SWV en medios orgánicos y acuosos a distintos valores de pH. Clayton A. Souza *et al.* desarrollaron un método con un LOD de 0,04 µg/mL a partir de un electrodo de diamante dopado con boro (BDD) adaptado en una celda de 10 mL [114]. Otros autores propusieron un sensor de este mismo material con un LOD ligeramente superior (0,24 µg/mL), pero acoplado a una celda de 100 µL diseñada para trabajar con cantidades muy pequeñas de muestra, como se aprecia en la Figura 6 [116]. Asimismo, se hallan sensores elaborados a partir de electrodos seriografiados desechables de carbono y de platino que requieren únicamente 50 µL de muestra [113].

Para la detección de BZP se encuentran dispositivos construidos a partir de electrodos comerciales y electrodos hechos en el mismo laboratorio. S. A. Waddell *et al.* investigaron los posibles electrodos indicadores hechos de una pasta de alótropos de carbono mezclados con nujol en distintas proporciones. El material que dio mejores resultados fue el carbono vítreo al 80% para un LOD de 1,0 µg/mL en celdas de 10 mL [117], los cuales son valores similares a los reportados en muestras de saliva para los microsensores de BDD y SP-Pt [116]. Raquel G. Rocha *et al.* presentan en su artículo un sensor de

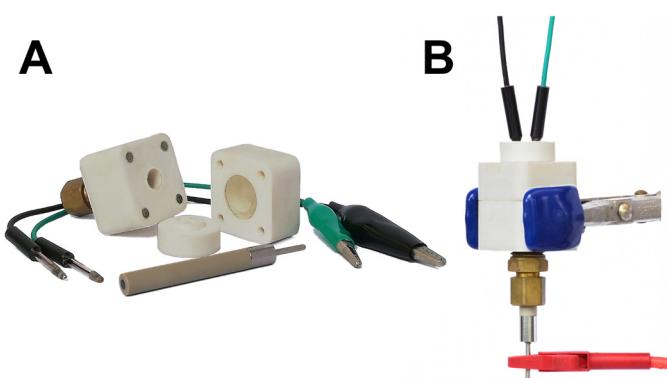


Figura 6. Microcelda de 100 µL impresa en el laboratorio. (A) electrodo de BDD, electrodo de referencia de Ag/AgCl y electrodo auxiliar de platino. (B) Microcelda ensamblada para mediciones con un electrodo BDD. Figura tomada de la referencia [116].

SP-C cuyo LOD se diferencia en poco más de un orden de magnitud con respecto a los otros dispositivos (0,015 µg/mL); en este caso, las mediciones se optimizaron para cuantificar BZP en muestras de bebidas con contenido alcohólico [118].

La piperazina mCPP se ha estudiado en condiciones electroquímicas muy similares a las empleadas para la BZP. Se diferencia la propuesta de Eman H. El-Naby [119] con un sensor potenciométrico de membrana con arquitectura supramolecular para el reconocimiento selectivo de la molécula, cuyo LOD se encuentra en el mismo orden de magnitud que los valores de los sensores voltamperométricos de BDD (celdas de 10 mL y 100 µL) y SP-Pt [115], [119]. Weiberson P. Silva *et al.* utilizaron un electrodo de SP-C para la microdetección simple y rápida de mCPP en muestras de incautación que obtuvo el LOD más bajo para este tipo de determinación analítica (0,02 µg/mL) [121].

Los sensores encontrados en la literatura para DMT presentan parámetros de desempeño muy similares entre sí. Algunos un poco más complejos en su preparación, como el electrodo de carbono vítreo modificado con BMIMNTF₂/ZnTRP (un líquido iónico y un compuesto supramolecular) [122], y otros más simples como el sensor desechable de SP-C para microcantidades de muestra [116].

Con respecto al análisis electroquímico de la mefedrona (4-MMC), se observa una mayor cantidad de sensores reportados. Las técnicas electroquímicas en las que se fundamentan son CV, DPV, AdS-DPV, SWV, AdSSWV, CV-SERS y potociometría. Hasta ahora, para el análisis de las drogas seleccionadas, solo se han visto sensores del tipo electroquímico; sin embargo, Jerson González-Hernández *et al.* elaboraron un sensor espectroelectroquímico de oro, en el cual una corrida de CV brinda una señal de oxidación cuantificable y, simultáneamente, activa la superficie del electrodo para generar el efecto SERS requerido para identificar inequívocamente la sustancia psicoactiva por espectroscopía Raman (con un aumento de la selectividad) [101]. Por su parte, Iman Razavipanah *et al.* crearon un novedoso sensor electroquímico a partir de un polímero molecular impreso sol-gel, politiramina y nanocomuestos de nanotubos de carbono de pared múltiple modificados con nanopartículas de oro [126]. Si bien es cierto que la preparación de los materiales y la construcción del sensor son procesos complejos, los resultados son exitosos desde el punto de vista de los parámetros analíticos (LOD 142 pg/mL) para cuantificar la mefedrona a muy bajas concentraciones en muestras biológicas.

Los procedimientos de preconcentración electródica por adsorción suelen tener los límites de detección y cuantificación muy bajos [75], [142], tal como lo demostraron Georgios Christos Papaioannou, Sophia Karastogianni y Stella Girousi al diseñar un dispositivo configurado con un electrodo de pasta de carbono modificado con nanopartículas de plata recubiertas con azafrán [127]. Este sensor, además de contar con muy buena reproducibilidad y un amplio rango lineal, tiene un límite de detección de 0,608 µg/mL, un valor va-

rios órdenes de magnitud más bajo que los LOD de otros estudios por GC-MS [143] y HPLC-MS-MS [144] con los que compararon sus resultados en muestras de orina.

Las mediciones del 4-MEC con sensores se caracterizan, hasta la fecha, por emplear la técnica electroquímica CV. En la lista de la Tabla 1 se aprecia un sensor spectroelectroquímico CV-SERS con muy buena selectividad [101], un par de dispositivos a base de elec-

trodos serigrafiados de grafito [123], [124] y un sensor particular diseñado con una moneda de un penique [125]. En este último estudio, Fang Tan *et al.* emplearon una moneda británica de acero recubierto de cobre como electrodo indicador en una celda de polietrafluoroetileno (ver Figura 7). El prototipo de muy bajo costo, utilizado además para determinaciones de mefedrona, reportó el mejor LOD (0,5 µg/mL) para la catinona sintética 4-MEC.

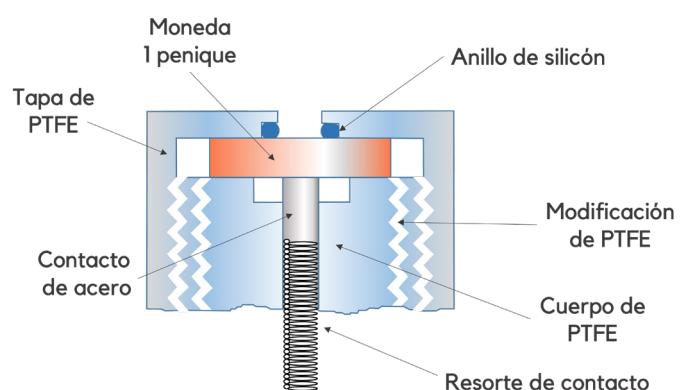


Figura 7. Diagrama de la sección transversal de la celda ensamblada de PTFE con un electrodo de un penique. Imagen adaptada de la referencia [125].

Al comparar las publicaciones de las siete moléculas psicoactivas estudiadas se observa que para la determinación electroquímica del opioide sintético fentanilo se reporta la mayor cantidad de sensores. Los límites de detección para los distintos dispositivos van desde 3,36 hasta 0,001 µg/mL y la mayoría están elaborados a partir de electrodos de carbono vítreo y electrodos serigrafiados de carbono, ambos con modificaciones de la superficie a partir de materiales como líquidos iónicos [130], anticuerpos [139], óxido de grafito [140], nanotubos de carbono [137], enzimas [141], estructuras organometálicas [134], entre otros.

Algunos autores proponen elementos muy versátiles para el análisis *in situ* del opioide sintético. Abbas Barfidokht *et al.* desarrollaron un sensor en forma de guante a partir de un electrodo SP-C flexible modificado con MWCNT y polietilamina (ver Figura 8) [131]. Con el guante puesto, la tecnología *lab-on-a-glove*, denominada así por los investigadores, permite recolectar la muestra con el dedo pulgar y analizar con el índice al juntar ambos dedos; asimismo, transmite los datos de forma inalámbrica a un teléfono inteligente para el

análisis de la información. El guante selectivo para el fentanilo es aplicable tanto en muestras en disolución como en muestras sólidas y su respuesta analítica es satisfactoriamente reproducible. No obstante, el novedoso dispositivo presenta un LOD relativamente alto (3,36 µg/mL) en comparación con estudios homólogos.

Otro de los electrodos innovadores para la determinación de fentanilo se produjo con inducción de energía láser sobre hojas de poliimida para crear estructuras nanoporosas de carbono [138]. Los autores afirman que, con base en los resultados, la rugosidad de la superficie no solo aumenta la sensibilidad, sino también la selectividad al llevar a cabo el análisis en presencia de algunos agentes cortantes como la cafeína y el ácido ascórbico. El LOD obtenido por este sensor es de 0,336 µg/mL y se midió en muestras de suero humano enriquecidas con el opioide con la técnica SWV (Figura 9). Un dato interesante que aportan los investigadores es que un bloque de diez electrodos, como el que se muestran en la Figura 9, tiene un costo de tan solo 1 USD.

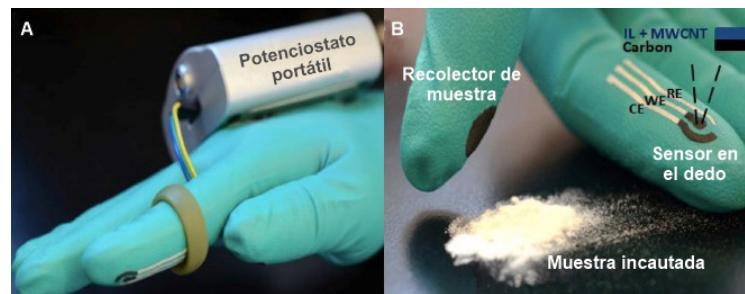


Figura 8. Descripción general del concepto *lab-on-a-glove*. (A) Vista del sensor impreso en el guante con un electroanalizador portátil. (B) Recolección de la muestra de fentanilo en estado sólido. Figura adaptada de la referencia [131].

Entre los sensores con los mejores límites de detección para el fentanilo (0,006 µg/mL usado en una disolución tampón de fosfatos) se encuentra el dispositivo propuesto por Natalia Tokranova *et al.* [139]. El inmunosensor consta de un electrodo indicador de oro depositado sobre un sustrato de silicio poroso (MPSi) y anticuerpos policlonales inmovilizados sobre la superficie del oro y sobre algunas partes del MPSi, tal como se aprecia en la Figura 10. Este prototipo combina el uso de materiales metálicos, de materiales

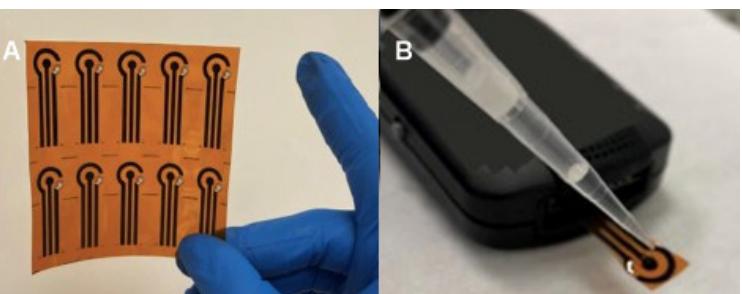


Figura 9. Sensores fabricados a partir de electrodos carbonizados con láser. (A) Fotografía de un conjunto de sensores sobre el sustrato de poliimida. (B) Prueba de fentanilo con el sensor. Imagen adaptada de la referencia [138].

con grandes áreas superficiales y de moléculas de origen biológico, con el propósito de aumentar su sensibilidad. Para demostrar la efectividad de los anticuerpos, los investigadores realizaron curvas de SWV con el dispositivo construido sobre los siguientes sustratos: silicio, silicio poroso (MPsi) y MPSi funcionalizado con anticuerpos. El objetivo a posteriori es desarrollar un sensor accesorio para medir fentanilo en el sudor humano, cuyo LOD resultó ser de 11 ng/mL en esta matriz.

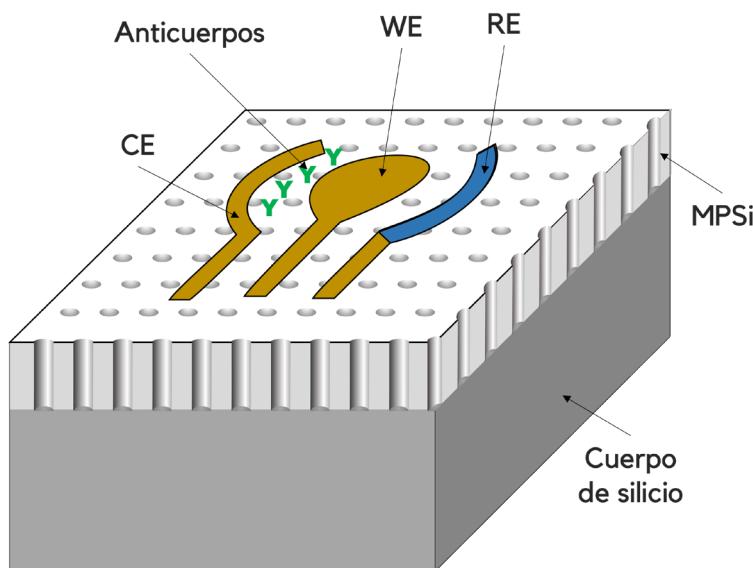


Figura 10. Representación esquemática del inmunosensor elaborado sobre un sustrato poroso de silicio. Los anticuerpos se inmovilizaron sobre el electrodo de trabajo de oro y en la zona entre el electrodo indicador y el contraelectrodo. Imagen adaptada de la referencia [139].

La revisión previa de los sensores electroquímicos muestra un campo de investigación aplicada muy versátil que combina una gran cantidad de sustratos, nanomateriales, compuestos químicos y biomoléculas que dan origen a dispositivos con parámetros de desempeño analítico muy favorables para analizar sustancias psicoactivas, principalmente, en muestras de origen biológico. El aumento reciente de propuestas analíticas con nuevos sensores electroquímicos evidencia la relevancia de las metodologías electroquímicas, tanto así que se ha incrementado la oferta comercial de instrumentos, electrodos y distintos accesorios electroquímicos para el desarrollo de sensores diseñados para analizar no solo drogas, sino una enorme variedad de analitos en muchos tipos de matrices.

Conclusiones

Ciertas características operacionales observadas en el desarrollo de los sensores estudiados, tales como la capacidad de resolución temporal, la portabilidad de la instrumentación, así como los cortos tiempos de respuesta de las técnicas electroquímicas, les conceden ventajas sustanciales a estos dispositivos frente a otras metodologías para el análisis preliminar de sustancias psicoactivas.

La mayoría de las modificaciones electródicas implementadas en el desarrollo de los sensores están relacionadas con el uso de nanomateriales, macromoléculas, líquidos iónicos, biomoléculas y compuestos organometálicos. Con estos cambios se logra: modificar el área superficial, aumentar la capacidad de adsorción y mejorar la conducción eléctrica. Los beneficios son medidos en términos del incremento de la sensibilidad analítica y, algunas veces, de la selectividad, condiciones necesarias para la determinación de drogas en matrices complejas.

Así, la brecha entre los LOD que presentan los nuevos sensores y las técnicas convencionales con detección de masas es cada vez más pequeña. En algunos estudios se reportan dispositivos electroquímicos cuyos límites de detección y cuantificación están en el mismo orden de magnitud, o incluso más bajos, que los obtenidos por métodos como GC-MS o HPLC-MS con valores de hasta 10^{-9} g/mL. Aunado al hallazgo anterior, los mismos autores indican que el costo económico de producción de los sensores es muy bajo; este costo puede reducirse más si estos sensores se produjeron en masa, tal como sucede con muchos de ellos.

En los distintos grupos de investigación se observa una marcada tendencia a miniaturizar los sensores, a utilizar técnicas de serigrafía o impresión y a usar sustratos poco rígidos. El objetivo de estos prototipos es, primordialmente, emplear los dispositivos para

el análisis *in situ* como un accesorio de medición de psicótropicos en fluidos corporales en tiempo real. Este hecho implica requerir cantidades de muestra cada vez más pequeñas, lo cual repercute positivamente en la huella ecológica de los productos fabricados.

La factibilidad y la aplicabilidad demostradas de los métodos electroquímicos por medio del desarrollo de diferentes sensores, así como el aumento significativo de modelos sugeridos como sensores en la última década, revelan una potencial aplicación en ciencias forenses para la determinación de una gran variedad de drogas emergentes, principalmente en muestras de origen biológico como la orina, el sudor, el plasma o el fluido oral. Es previsible que el interés por el desarrollo de los sensores se prolongue en las siguientes décadas, no solo por sus buenos resultados, sino porque ciertas limitaciones analíticas podrían superarse con éxito en el mediano plazo y potenciar aún más el uso de estos dispositivos electroquímicos en el futuro cercano.

Agradecimientos

Expreso mi profundo agradecimiento a la Dra. Ana Lorena Alvarado Gámez, a la Dra. Miriam Barquero Quirós y al Dr. Roberto Urcuyo Solórzano por la revisión crítica del manuscrito.

Le agradezco al M. Sc. Jairo García Céspedes por la edición de las imágenes y la revisión exhaustiva del formato y del contenido.

Referencias

- [1] E. Álvarez Martín et al., *Drogas Emergentes. Informes de la Comisión Clínica*. 2011.
- [2] United Nations office on Drugs and Crime (UNODC), “*World Drug Report 2021*,” 2021.
- [3] EMCDDA, “*European Drug Report 2019: Trends and Developments*,” 2019. DOI: <https://doi.org/10.1097/JSM.0b013e-31802b4fd>.
- [4] R. Gittins, A. Guirguis, F. Schifano, and I. Maidment, “Exploration of the use of new psychoactive substances by individuals in treatment for substance misuse in the UK,” *Brain Sci*, vol. 8, no. 4, pp. 1–20, 2018, DOI: <https://doi.org/10.3390/brainsci8040058>.
- [5] O. Cottencin, B. Rolland, and L. Karila, “*New Designer Drugs (Synthetic Cannabinoids and Synthetic Cathinones): Review of Literature*,” *Curr Pharm Des*, vol. 20, no. 25, pp. 4106–4111, 2014, DOI: <https://doi.org/10.2174/1381612811319999062>.
- [6] O. Carmichael and S. Lockhart, “*The Growing Problem of New Psychoactive Substances (NPS)*,” *Brain Imaging in Behavioral Neuros*

- cence, pp. 289–320, 2017, DOI: <https://doi.org/10.1007/7854>.
- [7] M. Mignone, O. Ingrascì, A. Colombo, and A. Robins, “Recognizing and identifying NPS for enforcement and forensic purposes,” *Torri di Quartesolo*, 2016.
- [8] CGPD, “Hora de poner fin a la prohibición,” 2021.
- [9] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA), “European Drug Report 2021: Trends and Developments,” 2021.
- [10] E. L. Friesen et al., “The Impact of the COVID-19 Pandemic on Opioid-Related Harm in Ontario,” Sep. 2021.
- [11] B. Pardo and P. Reuter, “Enforcement strategies for fentanyl and other synthetic opioids,” *Foreign Policy and Global Economy & Development programs at Brookings*, no. June, 2020.
- [12] European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA), “Impact of COVID-19 on patterns of drug use and drug-related harms in Europe,” no. June, pp. 1–27, 2020.
- [13] CDC, “Centers for Disease Control and Prevention.” Accessed: Mar. 05, 2023. [Online]. Available: <https://www.cdc.gov/nchs/nvss/vsrr/drug-overdose-data.htm>
- [14] United Nations Office on Drugs and Crime, “Métodos recomendados para la identificación y el análisis de los agonistas de los receptores de cannabinoides sintéticos en los materiales incautados,” p. 72, 2014.
- [15] L. Shaw and L. Dennany, “Applications of electrochemical sensors: Forensic drug analysis,” *Curr Opin Electrochem*, vol. 3, no. 1, pp. 23–28, 2017, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colelec.2017.05.001>.
- [16] N. Anzar, S. Suleman, S. Parvez, and J. Narang, “A review on Illicit drugs and biosensing advances for its rapid detection,” *Process Biochemistry*, vol. 113, no. December 2021, pp. 113–124, 2022, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2021.12.021>.
- [17] L. Harper, J. Powell, and E. M. Pijl, “An overview of forensic drug testing methods and their suitability for harm reduction point-of-care services,” *Harm Reduct J*, vol. 14, no. 1, 2017, DOI: <https://doi.org/10.1186/s12954-017-0179-5>.
- [18] I. H. Cho, D. H. Kim, and S. Park, “Electrochemical biosensors: Perspective on functional nanomaterials for on-site analysis,” *Biomater Res*, vol. 24, no. 1, pp. 1–12, 2020, DOI: <https://doi.org/10.1186/s40824-019-0181-y>.
- [19] E. M. Richter, A. L. Squissato, R. A. A. Munoz, and C. E. Banks, “An overview of recent electroanalytical applications of utilizing screen-printed electrodes within flow systems,” *ChemElectroChem*, 2020, DOI: <https://doi.org/10.1002/celc.202000175>.
- [20] “Junta Internacional de Fiscalización de Estupefacientes.” Accessed: Aug. 25, 2023. [Online]. Available: <https://www.incb.org/incb/es/precursors/index.html>
- [21] United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC), *World Drug Report 2022 Booklet 4: Drug Market Trends*. 2022.
- [22] United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC), *World Drug Report 2022 Booklet 2: Global Overview Drug Demand*. 2022.
- [23] Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías, “Informe Europeo sobre Drogas 2022: Tendencias y novedades,” 2022.
- [24] PAHO, “Pan American Health Organization.” Accessed: Feb. 17, 2023. [Online]. Available: <https://www.paho.org/en>
- [25] V. Lukić, R. Micić, B. Arsić, B. Nedović, and Ž. Radosavljević, “Overview of the major classes of new psychoactive substances, psychoactive effects, analytical determination and conformational analysis of selected illegal drugs,” *Open Chem*, vol. 19, no. 1, pp. 60–106, 2021, DOI: <https://doi.org/10.1515/chem-2021-0196>.
- [26] N. Unidas, J. Internacional, and D. E. F. D. E. Estupefacientes, *Informe de la Junta Internacional de Fiscalización de Estupefacientes relativo a la Disponibilidad de sustancias sometidas a fiscalización internacional: Garantizar suficiente acceso a esas sustancias para fines médicos y científicos*. 2016.
- [27] UNODC, “World Drug Report 2022.” Accessed: Feb. 25, 2023. [Online]. Available: www.unodc.org/unodc/en/data-and-analysis/world-drug-report-2022.html
- [28] L. Arbour et al., “Classification of psychoactive substances: when science was left behind,” *Global Comission on Drug Policy*, p. 55, 2019.
- [29] H. Services, “Alcohol and tobacco as preventable risk factors,” *U.S Department of Health and Human Services*, no. 6, p. 6, 2010.
- [30] M. Madden and J. McCambridge, “Alcohol marketing versus public health: David and Goliath?,” *Global Health*, vol. 17, no. 1, pp. 1–6, 2021, DOI: <https://doi.org/10.1186/s12992-021-00696-2>.
- [31] N. R. Sircar and S. A. Bialous, “Assessing the links between human rights and global tobacco control through statements made on global fora,” *BMC Public Health*, vol. 21, no. 1, p. 439, 2021, DOI: <https://doi.org/10.1186/s12889-021-10451-2>.
- [32] P. H. Service, “A Discussion Paper on Preventing Alcohol, Tobacco, and Other Drug Problems,” no. September, 1993.
- [33] U. Gneiting and H. P. Schmitz, “Comparing global alcohol and tobacco control efforts: Network formation and evolution in international health governance,” *Health Policy Plan*, vol. 31, no. January, pp. i98–i109, 2016, DOI: <https://doi.org/10.1093/heapol/czv125>.
- [34] E. R. Weitzman, Y. Y. Chen, and S. V. Subramanian, “Youth smoking risk and community patterns of alcohol availability and control: A national multilevel study,” *J Epidemiol Community Health* (1978), vol. 59, no. 12, pp. 1065–1071, 2005, DOI: <https://doi.org/10.1136/jech.2005.033183>.
- [35] F. Zapata, J. M. Matey, G. Montalvo, and C. García-Ruiz, “Chemical classification of new psychoactive substances (NPS),” *Microchemical Journal*, vol. 163, no. October 2020, 2021, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105877>.
- [36] United Nations office on Drugs and Crime (UNODC), “Terminología e Información sobre Drogas,” *Terminología e Información sobre Drogas*, 2020, DOI: <https://doi.org/10.18356/ea02b5b2-es>.
- [37] United Nations Office on Drug and Crime, “Single Convetion on Narcotic Drugs, 1961,” 1972.
- [38] United Nations, “Convention on Psychotropic Substances 1971,” 1971.
- [39] United Nations, “United Nations convention against illicit traffic in narcotics drugs and psychotropics substances, 1988,” 1988.
- [40] B. Pérez Salazar, A. Vizcaíno Solano, and Tirado Acero Misael, *Las drogas: políticas nacionales e internacionales de control*. Editorial Universidad Católica de Colombia, 1999.
- [41] Comisión Global de Políticas de Drogas, “Regulación: El Control Responsable de las Drogas,” pp. 1–60, 2018.
- [42] United Nations Office on Drugs and Crime (UNODC), *World Drug Report 2022 Booklet 4: Drug Market Trends*. 2022.
- [43] UNODC (United Nations Office on Drugs and Crime), “Early Warning Advisory on New Psychoactive Substances.” Accessed: Feb. 21, 2023. [Online]. Available: <https://www.unodc.org/LSS/Page/NPS>
- [44] H. Dolengovich-Segal, B. Rodríguez-Salgado, J. Gómez-Arnau, and D. Sánchez-Mateos, “An approach to the new psychoactive drugs phenomenon,” *Salud Mental*, vol. 40, no. 2, pp. 71–82, 2017, DOI: <https://doi.org/10.17711/SM.0185-3325.2017.010>.
- [45] J. González Alonso and N. Llorens Aleixandre, *Las Nuevas Sustancias Psicoactivas: un reto para la Salud Pública*. 2014.
- [46] D. K. Tracy, D. M. Wood, and D. Baumeister, “Novel psychoactive substances: Types, mechanisms of action, and effects,” *BMJ (Online)*, vol. 356, pp. 1–7, 2017, DOI: <https://doi.org/10.1136/bmj.i6848>.
- [47] S. L. Kacinko and D. M. Papsun, “The evolving landscape of designer drugs,” *Methods in Molecular Biology*, vol. 1872, pp. 129–135, 2019, DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8823-5_13.
- [48] DEA, “United States Drug Enforcement Administration.” Accessed: Feb. 21, 2023. [Online]. Available: <https://www.dea.gov>

- drug-information/drug-scheduling
- [49] A. Hulanicki, S. Glab, and F. Ingman, "Chemical sensors definitions and classification," *Pure and Applied Chemistry*, vol. 63, no. 9, pp. 1247–1250, 1991, DOI: <https://doi.org/10.1351/pac199163091247>.
- [50] J. M. Pingarrón *et al.*, "Terminology of electrochemical methods of analysis (IUPAC Recommendations 2019)," *Pure and Applied Chemistry*, vol. 92, no. 4, pp. 641–694, 2020, DOI: <https://doi.org/10.1515/pac-2018-0109>.
- [51] J. M. Freitas, T. da C. Oliveira, R. A. A. Munoz, and E. M. Richter, "Boron doped diamond electrodes in flow-based systems," *Front Chem*, vol. 7, no. APR, 2019, DOI: <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00190>.
- [52] H. E. Zittel and F. J. Miller, "A Glassy-Carbon Electrode for Voltammetry," *Anal Chem*, vol. 37, no. 2, pp. 200–203, 1965, DOI: <https://doi.org/10.1021/ac60221a006>.
- [53] T. C. Canevari, "3 - Application of hybrid nanomaterials for development of electrochemical sensors," in *Functionalized Nanomaterial-Based Electrochemical Sensors*, C. M. Hussain and J. G. Manjunatha, Eds., in *Woodhead Publishing Series in Electronic and Optical Materials.*, Woodhead Publishing, 2022, pp. 41–53. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823788-5.00002-8>.
- [54] Z. Hugh Fan, "Chemical Sensors and Microfluidics," *J Biosens Bioelectron*, vol. 04, no. 01, pp. 1–2, 2013, DOI: <https://doi.org/10.4172/2155-6210.1000e117>.
- [55] S. Singh, J. Wang, and S. Cinti, "Review—An Overview on Recent Progress in Screen-Printed Electroanalytical (Bio)Sensors," *ECS Sensors Plus*, vol. 1, no. 2, p. 023401, 2022, DOI: <https://doi.org/10.1149/2754-2726/ac70e2>.
- [56] M. Li, Y. T. Li, D. W. Li, and Y. T. Long, "Recent developments and applications of screen-printed electrodes in environmental assays-A review," *Anal Chim Acta*, vol. 734, pp. 31–44, 2012, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.05.018>.
- [57] Z. Taleat, A. Khoshroo, and M. Mazloum-Ardakani, "Screen-printed electrodes for biosensing: A review (2008–2013)," *Microchimica Acta*, vol. 181, no. 9–10, pp. 865–891, 2014, DOI: <https://doi.org/10.1007/s00604-014-1181-1>.
- [58] H. Beitollahi, S. Z. Mohammadi, M. Safaei, and S. Tajik, "Applications of electrochemical sensors and biosensors based on modified screen-printed electrodes: A review," *Analytical Methods*, vol. 12, no. 12, pp. 1547–1560, 2020, DOI: <https://doi.org/10.1039/c9ay02598g>.
- [59] A. García-Miranda Ferrari, S. J. Rowley-Neale, and C. E. Banks, "Screen-printed electrodes: Transitioning the laboratory in-to-the field," *Talanta Open*, vol. 3, no. January, p. 100032, 2021, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talo.2021.100032>.
- [60] J. Baranwal, B. Barse, G. Gatto, G. Broncová, and A. Kumar, "Electrochemical Sensors and Their Applications: A Review," *Chemosensors*, vol. 10, no. 9, 2022, DOI: <https://doi.org/10.3390/chemosensors10090363>.
- [61] N. R. Stradiotto, H. Yamanaka, and M. V. B. Zanoni, "Electrochemical sensors: A powerful tool in analytical chemistry," *J Braz Chem Soc*, vol. 14, no. 2, pp. 159–173, 2003, DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-50532003000200003>.
- [62] C. M. Hussain and R. Keçili, "Electrochemical techniques for environmental analysis," *Modern Environmental Analysis Techniques for Pollutants*, pp. 199–222, 2020, DOI: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-816934-6.00008-4>.
- [63] H. Bi and X. Han, *Chemical sensors for environmental pollutant determination*. Elsevier Inc., 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815409-0.00010-3>.
- [64] C. C. Liu, "Electrochemical sensors," *Medical Devices and Systems*, vol. 07, no. 07, pp. 48-1-48-6, 2006, DOI: <https://doi.org/10.5796/kogyobutsurikagaku.58.1087>.
- [65] F. R. Simões and M. G. Xavier, "6 - Electrochemical Sensors," in *Nanoscience and its Applications*, Elsevier Inc., 2017, p. 0. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-49780-0/00006-5>.
- [66] C. Kokkinos and A. Economou, "Recent advances in voltammetric, amperometric and ion-selective (bio)sensors fabricated by microengineering manufacturing approaches," *Curr Opin Electrochem*, 2020, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colec.2020.02.020>.
- [67] J. Brugger, "Editorial: Nanotechnology impact on sensors," *Nanotechnology*, vol. 20, no. 43, pp. 19–21, 2009, DOI: <https://doi.org/10.1088/0957-4484/20/43/430206>.
- [68] J. R. Stetter, W. R. Penrose, and S. Yao, "Sensors, Chemical Sensors, Electrochemical Sensors, and ECS," *J Electrochem Soc*, vol. 150, no. 2, p. S11, 2003, DOI: <https://doi.org/10.1149/1.1539051>.
- [69] S. Rajendrachari and D. Ramakrishna, "1 - Functionalized nanomaterial-based electrochemical sensors: A sensitive sensor platform," in *Functionalized Nanomaterial-Based Electrochemical Sensors*, C. M. Hussain and J. G. Manjunatha, Eds., in *Woodhead Publishing Series in Electronic and Optical Materials.*, Woodhead Publishing, 2022, pp. 3–25. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823788-5.00010-7>.
- [70] A. Walcarius, S. D. Minteer, J. Wang, Y. Lin, and A. Merkoçi, "Nanomaterials for bio-functionalized electrodes: Recent trends," *J Mater Chem B*, vol. 1, no. 38, pp. 4878–4908, 2013, DOI: <https://doi.org/10.1039/c3tb20881h>.
- [71] S. Vigneshvar, C. C. Sudhakumari, B. Senthilkumaran, and H. Prakash, "Recent advances in biosensor technology for potential applications - an overview," *Front Bioeng Biotechnol*, vol. 4, no. FEB, pp. 1–9, 2016, DOI: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2016.00011>.
- [72] C. C. Jiménez and D. E. P. León, "Biosensors: Implementation and outlook in the control and process quality and foodstuffs," *Vitae*, vol. 16, no. 1, pp. 144–154, 2009.
- [73] L. C. Clark and C. Lyons, "Electrode Systems for Continuous Monitoring in Cardiovascular Surgery," *Ann N Y Acad Sci*, vol. 102, no. 1, pp. 29–45, 1962, DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x>.
- [74] N. Bhalla, P. Jolly, N. Formisano, and P. Estrela, "Introduction to biosensors," *Essays Biochem*, vol. 60, no. 1, pp. 1–8, 2016, DOI: <https://doi.org/10.1042/EBC2015001>.
- [75] D. Harvey, *Analytical Chemistry 2.1, 2.1. in Open textbook library*. DePauw University, 2016.
- [76] C. M. Silveira and M. G. Almeida, "Small electron-transfer proteins as mediators in enzymatic electrochemical biosensors," *Anal Bioanal Chem*, vol. 405, no. 11, pp. 3619–3635, 2013, DOI: <https://doi.org/10.1007/s00216-013-6786-4>.
- [77] A. A. Homaei, R. Sariri, F. Vianello, and R. Stevanato, "Enzyme immobilization: An update," *J Chem Biol*, vol. 6, no. 4, pp. 185–205, 2013, DOI: <https://doi.org/10.1007/s12154-013-0102-9>.
- [78] D. R. Walt and V. I. Agayn, "The chemistry of enzyme and protein immobilization with glutaraldehyde," *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, vol. 13, no. 10, pp. 425–430, 1994, DOI: [https://doi.org/10.1016/0165-9936\(94\)85023-2](https://doi.org/10.1016/0165-9936(94)85023-2).
- [79] F. López-Gallego, J. M. Guisán, and L. Betancor, "Glutaraldehyde-mediated protein immobilization," *Methods Mol Biol*, vol. 1051, pp. 33–41, 2013, DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-62703-550-7_3.
- [80] F. López-Gallego *et al.*, "Enzyme stabilization by glutaraldehyde crosslinking of adsorbed proteins on aminated supports," *J Biotechnol*, vol. 119, no. 1, pp. 70–75, 2005, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biote.2005.05.021>.
- [81] W. Kaim and J. Fiedler, "Spectroelectrochemistry: The best of two worlds," *Chem Soc Rev*, vol. 38, no. 12, pp. 3373–3382, 2009, DOI: <https://doi.org/10.1039/b504286k>.
- [82] R. J. Mortimer, *Spectroelectrochemistry: Applications*, 3rd ed. Elsevier Ltd., 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803224-4.00288-0>.
- [83] R. Bersohn and B. J. Berne, "Chemical Physics," R. A. B. T.-E. of P. S. and T. (Third E. Meyers, Ed., New York: Academic Press, 2003, pp. 739–749. DOI: <https://doi.org/10.1016/B0-12-227410-5/00099-5>.

- [84] Y. Ozaki, "Recent advances in molecular spectroscopy of electronic and vibrational transitions in condensed phase and its application to chemistry," *Bull Chem Soc Jpn*, vol. 92, no. 3, pp. 629–654, 2019, DOI: <https://doi.org/10.1246/bcsj.20180319>.
- [85] C. E. Ott, A. Burns, E. Sisco, and L. E. Arroyo, "Targeted fentanyl screening utilizing electrochemical surface-enhanced Raman spectroscopy (EC-SERS) applied to authentic seized drug casework samples," *Forensic Chemistry*, vol. 34, p. 100492, 2023, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.forc.2023.100492>.
- [86] J. Garoz-Ruiz, J. V. Perales-Rondon, A. Heras, and A. Colina, "Spectroelectrochemical Sensing: Current Trends and Challenges," *Electroanalysis*, vol. 31, no. 7, pp. 1254–1278, 2019, DOI: <https://doi.org/10.1002/elan.201900075>.
- [87] A.-H. A. Shah, "UV-Vis Spectroelectrochemistry BT", *Encyclopedia of Applied Electrochemistry*, G. Kreysa, K. Ota, and R. F. Savinell, Eds., New York, NY: Springer New York, 2014, pp. 2099–2102. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6996-5_242.
- [88] T. E. Keyes and R. J. Forster, "Spectroelectrochemistry," *Handbook of Electrochemistry*, no. 2, pp. 591–635, 2007.
- [89] F. Miomandre and P. Audebert, *Luminescence in Electrochemistry*. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-49137-0>.
- [90] J. Kirchhoff, "Luminescence Spectroelectrochemistry," *Curr Sep*, vol. 1, pp. 11–14, 1997.
- [91] W. J. Paschoalino et al., "Electrochemiluminescence," *ChemElectroChem*, vol. 6, no. 1, pp. 10–30, 2019.
- [92] J. J. A. Lozman, P. Führer, W. Olthuis, and M. Odijk, "Spectroelectrochemistry the future of visualizing electrode processes by hyphenating electrochemistry with spectroscopic techniques," *Analyst*, vol. 145, no. 7, pp. 2482–2509, 2020, DOI: <https://doi.org/10.1039/c9an02105a>.
- [93] L. León and J. D. Mozo, "Designing spectroelectrochemical cells: A review," *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, vol. 102, pp. 147–169, 2018, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.02.002>.
- [94] S. Hernandez, J. V. Perales-Rondon, A. Heras, and A. Colina, "Electrochemical SERS and SOERS in a single experiment: A new methodology for quantitative analysis," *Electrochim Acta*, vol. 334, p. 135561, 2020, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2019.135561>.
- [95] A. Roguska, A. Kudelski, M. Pisarek, M. Lewandowska, K. J. Kurzydłowski, and M. Janik-Czachor, "In situ spectroelectrochemical surface-enhanced Raman scattering (SERS) investigations on composite Ag/TiO₂-nanotubes/Ti substrates," *Surf Sci*, vol. 603, no. 17, pp. 2820–2824, 2009, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.susc.2009.07.028>.
- [96] R. Moldovan et al., "Review on combining surface-enhanced Raman spectroscopy and electrochemistry for analytical applications," *Anal Chim Acta*, 2021, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.339250>.
- [97] H. Xu, J. Aizpurua, M. Käll, and P. Apell, "Electromagnetic contributions to single-molecule sensitivity in surface-enhanced Raman scattering," *Phys Rev E Stat Phys Plasmas Fluids Relat Interdiscip Topics*, vol. 62, no. 3 B, pp. 4318–4324, 2000, DOI: <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.62.4318>.
- [98] E. C. Le Ru and P. G. Etchegoin, "Single-molecule surface-enhanced raman spectroscopy," *Annu Rev Phys Chem*, vol. 63, pp. 65–87, 2012, DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-phys-chem-032511-143757>.
- [99] H. M. Lee, S. M. Jin, H. M. Kim, and Y. D. Suh, "Single-molecule surface-enhanced Raman spectroscopy: A perspective on the current status," *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 15, no. 15, pp. 5276–5287, 2013, DOI: <https://doi.org/10.1039/c3cp44463e>.
- [100] D. Martín-Yerga, A. Pérez-Junquera, M. B. González-García, D. Hernández-Santos, and P. Fanjul-Bolado, "Towards single-molecule: In situ electrochemical SERS detection with disposable substrates," *Chemical Communications*, vol. 54, no. 45, pp. 5748–5751, 2018, DOI: <https://doi.org/10.1039/c8cc02069h>.
- [101] J. González-Hernández et al., "Rapid Determination of the 'Legal Highs' 4-MMC and 4-MEC by Spectroelectrochemistry: Simultaneous Cyclic Voltammetry and In Situ Surface-Enhanced Raman Spectroscopy," *Sensors*, vol. 22, no. 1. 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/s22010295>.
- [102] A. J. Wain and M. A. O'Connell, "Advances in surface-enhanced vibrational spectroscopy at electrochemical interfaces," *Adv Phys X*, vol. 2, no. 1, pp. 188–209, 2017, DOI: <https://doi.org/10.1080/23746149.2016.1268931>.
- [103] United Nations office on Drugs and Crime (UNODC), "Recommended Methods for The Identification and Analysis of Fentanyl and Its Analogues in Biological Specimens," 2018, DOI: <https://doi.org/10.18356/aca7aca5-en>.
- [104] J. S.-C. Tsai and G. L. Lin, "Drug-Testing Technologies and Applications BT - Drugs of Abuse: Body Fluid Testing," R. C. Wong and H. Y. Tse, Eds., Totowa, NJ: Humana Press, 2005, pp. 29–69. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-59259-951-6_3.
- [105] M. Akutsu, K. ichi Sugie, and K. Saito, "Analysis of 62 synthetic cannabinoids by gas chromatography-mass spectrometry with photoionization," *Forensic Toxicol*, vol. 35, no. 1, pp. 1–10, 2016, DOI: <https://doi.org/10.1007/s11419-016-0342-9>.
- [106] N. Qin et al., "Determination of 37 fentanyl analogues and novel synthetic opioids in hair by UHPLC-MS/MS and its application to authentic cases," *Sci Rep*, vol. 10, no. 1, pp. 1–13, 2020, DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68348-w>.
- [107] T. Berg, B. Jørgenrud, and D. H. Strand, "Determination of buprenorphine, fentanyl and LSD in whole blood by UPLC-MS-MS," *J Anal Toxicol*, vol. 37, no. 3, pp. 159–165, 2013, DOI: <https://doi.org/10.1093/jat/bkt005>.
- [108] N. Jornet-Martínez, Y. Moliner-Martínez, C. Molins-Legua, and P. Campíns-Falcó, "Trends for the Development of In Situ Analysis Devices," *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, pp. 1–23, 2017, DOI: <https://doi.org/10.1002/9780470027318.a9593>.
- [109] R. A. S. Couto, J. L. F. C. Lima, and M. B. Quinaz, "Recent developments, characteristics and potential applications of screen-printed electrodes in pharmaceutical and biological analysis," *Talanta*, vol. 146, pp. 801–814, 2016, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.06.011>.
- [110] H. Teymourian et al., "Wearable Electrochemical Sensors for the Monitoring and Screening of Drugs," *ACS Sens*, vol. 5, no. 9, pp. 2679–2700, 2020, DOI: <https://doi.org/10.1021/acssensors.0c01318>.
- [111] D. Love and N. S. Jones, "Interpol Review of Drug Analysis 2019-2022," *Forensic Sci Int*, vol. 6, no. January, p. 100299, 2023, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fsisyn.2022.100299>.
- [112] M. Akbari et al., "Development of an electrochemical fentanyl nanosensor based on MWCNT-HA/Cu-H3BTC nanocomposite," *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, vol. 114, pp. 418–426, 2022, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2022.07.032>.
- [113] A. F. B. Andrade, S. K. Mamo, and J. Gonzalez-Rodriguez, "Rapid screening method for new psychoactive substances of forensic interest: Electrochemistry and analytical determination of phenethylamines derivatives (NBOMe) via cyclic and differential pulse voltammetry," *Anal Chem*, vol. 89, no. 3, pp. 1445–1452, 2016, DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b02426>.
- [114] G. A. Souza et al., "Voltammetric signatures of 2,5-dimethoxy-N-(2-methoxybenzyl) phenethylamines on boron-doped diamond electrodes: Detection in blotting paper samples," *Electrochim commun*, vol. 82, no. August, pp. 121–124, 2017, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2017.08.001>.
- [115] G. A. Souza et al., "Electrochemical sensing of NBOMes and other new psychoactive substances in blotting paper by square-wave voltammetry on a boron-doped diamond electrode," *Analytical Methods*, vol. 10, no. 20, pp. 2411–2418, 2018, DOI: <https://doi.org/10.1039/c8ay00385h>.
- [116] J. González-Hernández, A. L. Alvarado-Gámez, L. E. Arroyo-Mora, and M. Barquero-Quirós, "Electrochemical determination of novel psychoactive substances by differential pulse voltammetry using a microcell for boron-doped diamond elec-

- trode and screen-printed electrodes based on carbon and platinum," *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 882, p. 114994, 2021, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2021.114994>.
- [117] S. A. Waddell, C. Fernandez, C. C. Inverarity, and R. Prabhu, "Extending the capability of forensic electrochemistry to the novel psychoactive substance benzylpiperazine," *Sens Biosensing Res*, vol. 13, pp. 28–39, 2017, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2016.12.001>.
- [118] R. G. Rocha et al., "Simple and rapid electrochemical detection of 1-benzylpiperazine on carbon screen-printed electrode," *Microchemical Journal*, vol. 167, no. April, pp. 1–7, 2021, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106282>.
- [119] E. El-Naby, "Potentiometric Signal Transduction for Selective Determination of 1-(3-Chlorophenyl)piperazine 'Legal Ecstasy' Through Biomimetic Interaction Mechanism," *Chemosensors*, vol. 7, no. 3, p. 46, 2019, DOI: <https://doi.org/10.3390/chemosensors7030046>.
- [120] L. R. Rocha, J. de Cássica Mendonça, T. Boareto Capelari, R. Antigo Medeiros, and C. R. Teixeira Tarley, "Development of a reliable and selective voltammetric method for determination of designer drug 1-(3-chlorophenyl)piperazine (mCPP) using boron-doped diamond electrode and exploiting surfactant-mediated measurements," *Sens Actuators B Chem*, vol. 310, 2020, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.127812>.
- [121] W. P. Silva et al., "Development of a simple and rapid screening method for the detection of 1-(3-chlorophenyl)piperazine in forensic samples," *Talanta*, vol. 233, no. April, p. 122597, 2021, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122597>.
- [122] G. Plaza, B. Piña, H. Herrera, and K. Calfuman, "Electrochemical determination of N,N-dimethyltryptamine in water based on tetraruthenated porphyrins and ionic liquid modified electrodes," *Journal of the Chilean Chemical Society*, vol. 65, no. 1, pp. 4668–4671, 2020, DOI: <https://doi.org/10.4067/S0717-97072020000104668>.
- [123] J. P. Smith, J. P. Metters, C. Irving, O. B. Sutcliffe, and C. E. Banks, "Forensic electrochemistry: the electroanalytical sensing of synthetic cathinone-derivatives and their accompanying adulterants in 'legal high' products," *Analyst*, vol. 139, no. 2, pp. 389–400, 2013, DOI: <https://doi.org/10.1039/c3an01985c>.
- [124] J. P. Smith, J. P. Metters, O. I. G. Khreit, O. B. Sutcliffe, and C. E. Banks, "Forensic electrochemistry applied to the sensing of new psychoactive substances: Electroanalytical sensing of synthetic cathinones and analytical validation in the quantification of seized street samples," *Anal Chem*, vol. 86, no. 19, pp. 9985–9992, 2014, DOI: <https://doi.org/10.1021/ac502991g>.
- [125] F. Tan, J. P. Smith, O. B. Sutcliffe, and C. E. Banks, "Regal electrochemistry: Sensing of the synthetic cathinone class of new psychoactive substances (NPSs)," *Analytical Methods*, vol. 7, no. 16, pp. 6470–6474, 2015, DOI: <https://doi.org/10.1039/c5ay01820j>.
- [126] I. Razavipanah, E. Alipour, B. Deiminiat, and G. H. Rounaghi, "A novel electrochemical imprinted sensor for ultrasensitive detection of the new psychoactive substance 'Mephedrone,'" *Biosens Bioelectron*, vol. 119, no. August, pp. 163–169, 2018, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2018.08.016>.
- [127] G. C. Papaioannou, S. Karastogianni, and S. Girousi, "Development of an Electrochemical Sensor Using a Modified Carbon Paste Electrode with Silver Nanoparticles Capped with Saffron for Monitoring Mephedrone," *Sensors*, vol. 22, no. 4, 2022, DOI: <https://doi.org/10.3390/s22041625>.
- [128] M. C. Prete, L. R. Rocha, and C. R. T. Tarley, "Chapter 4 - Development of new electroanalytical method based on graphene oxide-modified glassy carbon electrode for mephedrone illicit drug determination," J. G. Manjunatha and C. M. B. T.-C. N.-B. S. Hussain, Eds., Elsevier, 2022, pp. 43–56. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91174-0.00022-6>.
- [129] E. Pospíšilová, N. Paškanová, M. Kuchař, and T. V. Shishkanova, "Potentiometric Determination of Mephedrone in Oral Fluids with Ion-Selective Membranes," *Electroanalysis*, no. January, pp. 1–9, 2023, DOI: <https://doi.org/10.1002/elan.202200468>.
- [130] S. A. Goodchild et al., "Ionic Liquid-Modified Disposable Electrochemical Sensor Strip for Analysis of Fentanyl," *Anal Chem*, vol. 91, no. 5, pp. 3747–3753, 2019, DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b00176>.
- [131] A. Barfidokht et al., "Wearable electrochemical glove-based sensor for rapid and on-site detection of fentanyl," *Sens Actuators B Chem*, vol. 296, no. April, p. 126422, 2019, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.04.053>.
- [132] E. Sohouli et al., "A glassy carbon electrode modified with carbon nanoions for electrochemical determination of fentanyl," *Materials Science and Engineering C*, vol. 110, no. December 2019, p. 110684, 2020, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110684>.
- [133] N. Wester et al., "Single-Walled Carbon Nanotube Network Electrodes for the Detection of Fentanyl Citrate," *ACS Appl Nano Mater*, vol. 3, no. 2, pp. 1203–1212, 2020, DOI: <https://doi.org/10.1021/acsnano.9b01951>.
- [134] E. Naghian, E. Marzi Khosrowshahi, E. Sohouli, F. Ahmadi, M. Rahimi-Nasrabadi, and V. Safarifard, "A new electrochemical sensor for the detection of fentanyl lethal drug by a screen-printed carbon electrode modified with the open-ended channels of Zn(ii)-MOF," *New Journal of Chemistry*, vol. 44, no. 22, pp. 9271–9277, 2020, DOI: <https://doi.org/10.1039/don-j01322f>.
- [135] C. E. Ott, H. Cunha-Silva, S. L. Kuberski, J. A. Cox, M. J. Arcos-Martínez, and L. E. Arroyo-Mora, "Electrochemical detection of fentanyl with screen-printed carbon electrodes using square-wave adsorptive stripping voltammetry for forensic applications," *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 873, p. 114425, 2020, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2020.114425>.
- [136] Mostafa Najafi, E. Sohouli, and F. Mousavi, "An Electrochemical Sensor for Fentanyl Detection Based on Multi-Walled Carbon Nanotubes as Electrocatalyst and the Electrooxidation Mechanism," *Journal of Analytical Chemistry*, vol. 75, no. 9, pp. 1209–1217, 2020, DOI: <https://doi.org/10.1134/S1061934820090130>.
- [137] H. Ding and W. Tao, "Synthesis of NiO-CNTs nanocomposite for modification of glassy carbon electrode and Application for Electrochemical determination of fentanyl as an opioid analgesic drug," *Int J Electrochem Sci*, vol. 16, pp. 1–12, 2021, DOI: <https://doi.org/10.20964/2021.11.33>.
- [138] R. K. Mishra, A. Krishnakumar, A. Zareei, U. Heredia-Rivera, and R. Rahimi, "Electrochemical sensor for rapid detection of fentanyl using laser-induced porous carbon-electrodes," *Microchimica Acta*, vol. 189, no. 5, 2022, DOI: <https://doi.org/10.1007/s00604-022-05299-1>.
- [139] N. Tokranova, N. Cady, A. Lampher, and I. A. Levitsky, "Highly Sensitive Fentanyl Detection Based on Nanoporous Electrochemical Immunosensors," *IEEE Sens J*, vol. 22, no. 21, pp. 20165–20170, Nov. 2022, DOI: <https://doi.org/10.1109/jsen.2022.3200591>.
- [140] D. Jun, G. Sammis, P. Rezazadeh-Azar, E. Ginoux, and D. Bizzotto, "Development of a Graphene-Oxide-Deposited Carbon Electrode for the Rapid and Low-Level Detection of Fentanyl and Derivatives," *Anal Chem*, vol. 94, no. 37, pp. 12706–12714, 2022, DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.2c02057>.
- [141] J. González-Hernández, G. Alvarado-Moya, A. L. Alvarado-Gámez, R. Urcuyo, and M. J. Arcos-Martínez, "Electrochemical biosensor for quantitative determination of fentanyl based on immobilized cytochrome c on multi walled carbon nanotubes modified screen printed carbon electrodes," *Microchimica Acta*, vol. 189, no. 12, pp. 1–12, 2022, DOI: <https://doi.org/10.1007/s00604-022-05578-x>.
- [142] D. A. Skoog and D. M. West, *Análisis instrumental*, 2nd ed. McGraw-Hill, 1989.

[143] R. D. Johnson and S. R. Botch-Jones, "The Stability of Four Designer Drugs: MDPV, Mephedrone, BZP and TFMPP in Three Biological Matrices under Various Storage Conditions," *J Anal Toxicol*, vol. 37, no. 2, pp. 51–55, 2013, DOI: <https://doi.org/10.1093/jat/bks138>.

[144] L. Mercolini, M. Protti, M. C. Catapano, J. Rudge, and A. E. Sberna, "LC-MS/MS and volumetric absorptive microsampling for quantitative bioanalysis of cathinone analogues in dried urine, plasma and oral fluid samples," *J Pharm Biomed Anal*, vol. 123, pp. 186–194, 2016, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.02.015>.

Citación del artículo:

J. González-Hernández, "Drogas emergentes: detección mediante sensores electroquímicos", *Rev. Colomb. Quim.*, vol. 52, no. 1, pp. 25-41, 2023. DOI: <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v52n1.108752>.



Estudio computacional de las interacciones moleculares entre el timol y los residuos HIS41 y CYS145 presentes en el sitio activo de la proteasa 3CLpro

Resumen

La proteína proteasa 3CLpro del SARS-CoV-2 es una enzima crucial para la replicación viral, razón por la cual se convierte en un blanco terapéutico de gran importancia. El timol (2-isopropil-5-metilfenol), un compuesto natural que se encuentra en el tomillo (*Thymus vulgaris*), exhibe potencial actividad antiviral contra la proteasa 3CLpro. En este estudio, usando acoplamiento molecular con AutoDockTools-1.5.6, se evaluaron las energías de interacción molecular entre el timol y los residuos de aminoácidos en el sitio activo de la proteína proteasa 3CLpro. Luego, con la teoría cuántica de Átomos en Moléculas (QTAIM) y la de Interacciones no covalentes (NCI) se analizaron los tipos de interacciones moleculares entre los residuos de aminoácidos identificados y el timol. Los cálculos cuánticos se llevaron con el software Orca-5.0.3, utilizando el método DFT con el funcional M06-2X y el conjunto base aug-cc-pVQZ en fase gaseosa. Los resultados de acoplamiento molecular indican que el timol se une a la proteína 3CL con una energía de interacción igual a -3.784 kcal/mol. El análisis QTAIM indica la presencia de puntos críticos de enlace entre el timol y los residuos HIS41 y CYS145. Además, se observa la formación de un enlace de hidrógeno entre el grupo OH del timol y el residuo CYS145, lo cual es corroborado por los análisis ELF (Electron Localization Function) y NCI (Non Covalent Interactions). Finalmente, el método NCI confirma la presencia de interacciones de Van der Waals con el residuo HIS41. Los resultados sugieren que el mecanismo de inhibición de la actividad de la proteína 3CLpro es controlado por interacciones moleculares tipo puente de hidrógeno y interacciones débiles.

Palabras clave: Acoplamiento molecular; enlace de hidrógeno; proteasa 3CL; residuos de aminoácidos; timol.

Computational study of the molecular interactions between thymol and the HIS41 and CYS145 residues present in the active site of the 3CLpro protease

Abstract

The protease 3CLpro of the SARS-CoV-2 is a crucial enzyme for viral replication, becoming a highly important therapeutic target. Thymol (2-isopropyl-5-methylphenol), a naturally occurring compound found in thyme, exhibits potential antiviral activity against the 3CLpro protease. In this study, using molecular docking with AutoDockTools-1.5.6, the molecular interaction energies between thymol and amino acid residues in the active site of the protein protease 3CLpro were evaluated. Then, with the Atoms in Molecules (QTAIM) and Non-covalent Interactions (NCI) theories, the types of molecular interactions between identified amino acid residues and thymol were analyzed. Quantum calculations were carried out with the Orca-5.0.3 software using the DFT method with the M06-2X functional and the aug-cc-pVQZ basis set in the gas phase. The molecular docking results indicate that thymol is linked to the 3CL protein with an interaction energy equal to -3.784 kcal/mol. QTAIM analysis indicates the presence of critical binding sites between thymol and residues HIS41 and CYS145. In addition, the formation of a hydrogen bond between the OH group of thymol and the CYS145 residue is observed, which is corroborated by the ELF and NCI analyses. Finally, the NCI method confirms the presence of Van der Waals interactions with the HIS41 residue. The results suggest that the mechanism of inhibition of the activity of the 3CLpro protein is controlled by molecular interactions such as hydrogen bonding and weak interactions.

Keywords: Molecular docking; hydrogen bonding; protease 3CL; residues; thymol.

Estudo computacional das interações moleculares entre o timol e os resíduos HIS41 e CYS145 presentes no sítio ativo da protease 3CLpro

Resumo

A protease 3CLpro do SARS-CoV-2 é uma enzima crucial para a replicação viral, tornando-se um alvo terapêutico de grande importância. O timol (2-isopropil-5-metilfenol), um composto natural encontrado no tomilho, exibe potencial atividade antiviral contra a protease 3CLpro. Neste estudo, utilizando o docking molecular com o AutoDockTools-1.5.6, foram avaliadas as energias de interação molecular entre o timol e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo da proteína protease 3CLpro. Em seguida, com a teoria quântica de átomos em moléculas (QTAIM) e da interações não-covalentes (NCI), foram analisados os tipos de interações moleculares entre os resíduos de aminoácidos identificados e o timol. Os cálculos quânticos foram realizados com o software Orca-5.0.3 usando o método DFT com o funcional M06-2X e a base aug-cc-pVQZ definida na fase gasosa. Os resultados do docking molecular indicam que o timol está ligado à proteína 3CL com uma energia de interação igual a -3.784 kcal/mol. A análise QTAIM indica a presença de sítios de ligação críticos entre o timol e os resíduos HIS41 e CYS145. Além disso, observa-se a formação de uma ponte de hidrogênio entre o grupo OH do timol e o resíduo CYS145, o que é corroborado pelas análises ELF e NCI. Finalmente, o método NCI confirma a presença das interações de Van der Waals com o resíduo HIS41. Os resultados sugerem que o mecanismo de inibição da atividade da proteína 3CLpro é controlado por interações moleculares como ligações de hidrogênio e interações fracas.

Palavras-chave: Docking molecular; ligação de hidrogênio; protease; resíduos; timol.

Introducción

El virus SARS-CoV-2 sorprendió a la humanidad por su facilidad de transmisión, cuyo mecanismo involucraba la difusión en el aire de pequeñas gotas expulsadas por las personas infectadas al respirar o toser. Este virus altamente infeccioso fue la causa principal de la enfermedad respiratoria denominada COVID-19 y en enero de 2020 fue declarada emergencia de salud pública por la Organización Mundial de la Salud (OMS) [1], [2]. La estructura macromolecular del SARS-CoV-2 es compleja debido a sus diferentes componentes, que incluyen una envoltura lipídica, ARN y ciertas proteínas [3], [4]. Estas proteínas son las responsables de unirse al receptor ACE2 de las células humanas, lo cual provoca que el virus entre e infecte al huésped. La enzima que desempeña un papel crucial en la replicación del virus SARS-CoV-2 es la proteasa 3CL [5]. Esta proteasa facilita la hidrólisis de los enlaces peptídicos en más de 11 sitios de la poliproteína viral; se destacan los residuos HIS41 y CYS145 localizados en el sitio activo de la proteasa 3CL [5], [6]. Ambos residuos son críticos para la actividad catalítica de la proteasa, por lo que pueden ser utilizados como la diana catalítica en el tratamiento del SARS-CoV-2 [7].

El acoplamiento molecular (*molecular docking* en inglés) es una técnica de simulación molecular que ha permitido realizar estudios de la interacción molecular de compuestos químicos con sitios activos de proteínas específicas para determinar sus propiedades farmacéuticas [8], [9]. La interacción molecular efectiva entre un fármaco y un sitio activo tiene un impacto directo en la disminución, la replicación y proliferación de virus como el SARS-CoV-2. En el desarrollo de la pandemia, el tratamiento médico con productos naturales fue utilizado ampliamente como mecanismo preventivo del SARS-CoV-2. Sin embargo, en muchos casos, la identificación de los compuestos activos que producían la inhibición de la actividad de la proteína proteasa 3CL no fue realizada. En Latinoamérica, la planta de tomillo común (*Thymus vulgaris*) fue utilizada para el tratamiento del COVID-19. Esta planta contiene un aceite esencial formado por compuestos orgánicos mezclados con propiedades antibacterianas, antifúngicas y antivíricas [10]. Para este aceite esencial obtenido del tomillo, el timol (2-isopropil-5-metilfenol) corresponde a una de las especies más importantes presentes en este aceite, con el cual se logró una recuperación favorable de pacientes con el padecimiento del COVID-19 (ver Figura 1). En otros estudios, la actividad de este compuesto fue evaluada y comparada con otros productos naturales como el carvacrol y la bis-demetoxy-curcumina [11]-[13]. En estos estudios, el timol mostró una buena actividad inhibidora, la cual estuvo asociada a su efectivo enlazamiento con la transmembrana proteasa serina 2 [12].

En el contexto planteado, para este trabajo se determinaron las energías de interacción molecular entre el timol y los residuos de aminoácidos presentes en el sitio activo de la proteasa 3CL mediante acoplamiento molecular. A la vez, usando la teoría de átomos en moléculas (QTAIM por sus siglas en inglés) en combinación con la teoría de interacciones no covalentes (NCI por sus siglas en inglés), se analizaron los tipos de interacciones moleculares presentes entre los residuos de aminoácidos identificados y el compuesto orgánico 2-isopropil-5-metilfenol. Así mismo, otros estudios de acoplamiento molecular han sugerido que este compuesto químico puede interactuar con el sitio activo de la proteasa 3CL, especialmente con los residuos HIS41 y CYS145 [14]-[16]. Por lo tanto, la evaluación de los tipos de interacciones moleculares presentes entre estos residuos de aminoácidos y el timol es de gran importancia farmacéutica para comprender a nivel molecular el mecanismo de inhibición de este sitio activo presente en la proteína proteasa 3CL.

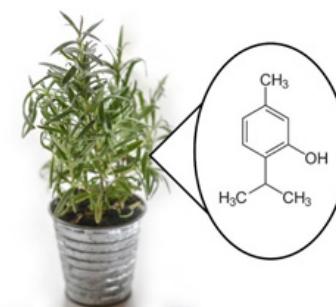


Figura 1. Planta de tomillo común (*Thymus vulgaris*).

Materiales y métodos

Preparación de la proteína proteasa 3CL y el compuesto timol (2-isopropil-5-metilfenol)

La estructura molecular de la proteasa 3CL fue obtenida de la base de datos RSCB (Research Collaboratory for Structural Bioinformatics, PDB ID: 6LU7) en formato Protein Data Bank (PDB) [4]. Para preparar la proteasa 3CL para el acoplamiento molecular, se eliminaron las moléculas de agua y el inhibidor N3 utilizando el programa Chimera-1.16 [17]. La estructura resultante se guardó en formato PDB y se utilizó para realizar el acoplamiento molecular con el programa AutoDock Tools-1.5.6 [18]. Por otro lado, la estructura molecular del timol se obtuvo de la base de datos PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) [19]-[21] en formato SDF. Para optimizar la estructura molecular del timol, se utilizó el programa Avogadro-1.2 [22] empleando el campo de fuerza MMFF94 [23]. Finalmente, las geometrías optimizadas se guardaron en formato *.mol2 para su uso en el acoplamiento molecular.

Acoplamiento molecular

Para el acoplamiento molecular se utilizaron los programas AutoDock-4.2.6 y AutoDock Tools-1.5.6 [18]. Se agregaron los hidrógenos esenciales y las cargas de Kollman a la proteína, y las cargas de Gasteiger al ligando utilizando AutoDock Tools-1.5.6 [18]. El sitio utilizado como objetivo para el acoplamiento molecular fue el que contiene los residuos HIS41 y CYS145 de la proteasa 3CL. Se colocó una celda de 40 Å de longitud usando las coordenadas XYZ: -10,977; 16,402; 67,709. Además, se utilizaron los parámetros del algoritmo genético [24] para realizar el acoplamiento molecular, utilizando 50 conformaciones y repitiendo el acoplamiento por triplicado. La energía de interacción molecular y la constante de inhibición se determinaron a partir de la conformación con la menor energía del complejo proteína-ligando.

Cálculos cuánticos

Todos los cálculos cuánticos fueron realizados utilizando el programa Orca-5.0.3 [25], [26]. Los cálculos de energía se hicieron con el funcional M06-2X//aug-cc-pVDZ en fase gaseosa para la molécula de timol con los residuos de la proteasa 3CLpro (HIS41 y CYS145). Además, se evaluaron las interacciones moleculares entre el compuesto y los residuos utilizando la Teoría Cuántica de Átomos en Moléculas (QTAIM) [27], [28], la función de localización de electrones (ELF) [29], el método de gradiente reducido de la densidad (RDG por sus siglas en inglés) [30], [31] y el modelo de gradiente independiente basado en la partición de Hirshfeld (IGMH) [32]. Por último, los cálculos de QTAIM, ELF, RDG e IGMH se realizaron con el programa Multiwfns-3.8 [33] empleando los archivos *.wfn generados con el módulo orca_2aim.

Resultados y discusión

Acoplamiento molecular

El acoplamiento molecular se ha convertido en una herramienta valiosa para investigar la interacción entre una proteína y un compuesto denominado ligando, lo que la hace útil en el descubrimien-

to y diseño de fármacos [8], [9]. En este estudio se utilizó el método de acoplamiento molecular para evaluar la interacción entre la proteasa 3CL del SARS-CoV-2 y el timol, con el objetivo de determinar la energía de unión del complejo proteína-ligando y su constante de inhibición. Los resultados del estudio muestran que el timol se une con la región activa de la proteasa con una energía de unión de -15,833 (0,017) kJ/mol y una constante de inhibición de 1,29 (0,06) mM. Además, se observa la interacción molecular del timol con seis residuos de aminoácidos de la proteína: HIS41, LEU141, GLY143, SER144, CYS145 y HIS163 (ver Figura 3) mediante interacciones tipo enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas.

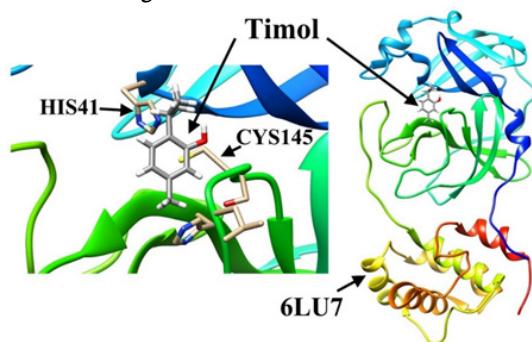


Figura 2. Acoplamiento molecular del timol con los residuos HIS41 y CYS145 de la proteasa 3CL del SARS-CoV-2.



Figura 3. Interacción proteína-ligando de la proteasa 3CL con timol generado con el programa Ligplot+ v2.2.8.

Desde el punto de vista energético, la interacción molecular del timol en el sitio activo es más favorable comparado con compuestos sintéticos como el Paritaprevir y el Simeprevir que mostraron valor de energía de interacción de -8,80 kJ/mol y 8,78 kJ/mol, respectivamente [16]. Del mismo modo, el timol muestra un valor de constante de inhibición mayor a los reportados para estos compuestos (0,36 μ M para el Paritaprevir y 0,37 μ M). Sin embargo, estos valores sugieren una mayor concentración de timol para inhibir el sitio activo.

Los residuos HIS41, LEU141, GLY143, SER144, CYS145 y HIS163 corresponden a los aminoácidos que conforman uno de los sitios activos de la proteasa 3CL del SARS-CoV-2. La presencia de los residuos HIS41, GLY143 y HIS163 es esencial para la actividad enzimática de la proteasa, mientras que el residuo LEU141 contribuye a la especificidad de los sustratos y la eficacia de los inhibidores [2], [34], [35]. Por su parte, el residuo SER144 actúa como nucleófilo en la reacción de hidrólisis de los sustratos. Por último, el resi-

duo CYS145 forma un enlace disulfuro con otro residuo de cisteína para estabilizar la estructura de la proteasa [36]. En general, estos residuos desempeñan un papel fundamental en la replicación del virus y son importantes para el desarrollo de terapias antivirales. Al observar la figura 3 podemos ver la formación de un enlace de hidrógeno entre el oxígeno del timol y el residuo CYS145 (distancia igual a 1,913 Å), lo que sugiere que este ligando es específico para la inhibición de la proteasa 3CLpro del SARS-CoV-2.

Análisis QTAIM

La Teoría Cuántica de Átomos en Moléculas (QTAIM) desarrollada por Bader [27], [28] es una herramienta muy útil para comprender la estructura química y la reactividad a partir de la densidad electrónica ($\rho(r)$), y también es utilizada para el análisis de interacciones no covalentes. La existencia de puntos críticos de enlace (BCP) entre los residuos HIS41 y CYS145 de la proteasa 3CLpro con el timol sugiere la presencia de varias interacciones moleculares (ver Figura 4). Entre estas interacciones, las más destacadas son los enlaces de hidrógenos y las interacciones dispersivas tipo Van der Waals. La Tabla 1 muestra los parámetros topológicos evaluados. El signo del valor del Laplaciano de la densidad electrónica ($\nabla^2\rho(r)$) permite evaluar el comportamiento de la densidad electrónica en el punto crítico de enlace, y la densidad de energía total ($H(r)$) permite evaluar la estabilidad de la interacción molecular [37], [38]. Estos valores son reportados en unidades atómicas (u.a.).

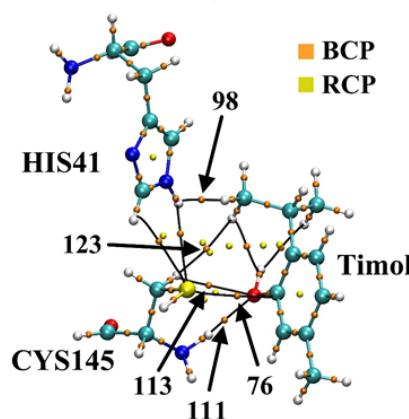


Figura 4. Grafos moleculares de los residuos HIS41 y CYS145 de la proteasa 3CL con el timol.

El análisis de los puntos críticos de enlace (BCP) permite identificar la naturaleza de la interacción molecular. Inicialmente, entre el timol y el residuo HIS41 se observa la formación de un punto crítico de enlace (BCP: 98) con un valor del Laplaciano electrónico de 0,0601 u.a. y una densidad de energía total igual a -0,0004 u.a. El Laplaciano electrónico al ser positivo indica una acumulación de densidad electrónica en el punto crítico, la cual es típica de enlaces covalentes. A su vez, este valor de $H(r)$ indica una interacción molecular débil con una densidad electrónica a lo largo de la ruta de enlace baja (ver Figura 5) [28], [39], [40]. Esto sugiere que la interacción molecular, aunque presenta características covalentes, se asemeja más a una interacción molecular hidrógeno-hidrógeno muy débil entre estas moléculas [41].

Tabla 1. Parámetros topológicos obtenidos para la interacción entre el timol y la proteasa 3CL en unidades atómicas (u.a.).

Residuos	Átomos involucrados	Punto crítico	$\rho(r)$ (u.a.)	$\nabla^2\rho(r)$ (u.a.)	$G(r)$ (u.a.)	$V(r)$ (u.a.)	$H(r)$ (u.a.)
HIS41	R(N11-H12), L(H54-C30)	98	0,0212	0,0601	0,0155	-0,0159	-0,0004
CYS145	R(S19), L(C24)	76	0,0101	0,0308	0,0063	-0,0050	0,0014
	R(N13-H14)--L(O27)	111	0,0259	0,1036	0,0232	-0,0204	0,0027
	R(C18-H43), L(O27)	113	0,0096	0,0319	0,0074	-0,0068	0,0006
	R(C18-H43), L(H52-C30)	123	0,0041	0,0142	0,0028	-0,0020	0,0008

R: residuo, L: ligando.

u.a: Unidades atómicas.

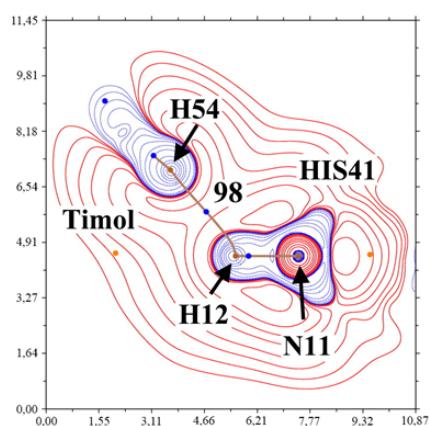


Figura 5. Mapa de contorno del Laplaciano de la densidad electrónica en el punto crítico 98 (isovalor = 0,05).

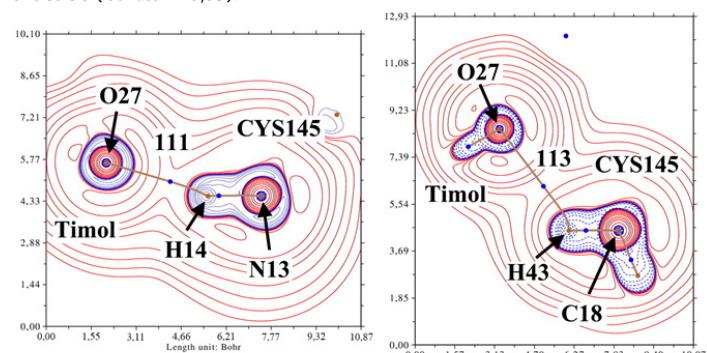


Figura 6. Mapas de contorno del Laplaciano de la densidad electrónica en el punto crítico de enlace 111 y 113 (isovalor = 0,05).

Por su parte, en la interacción molecular entre el timol y el residuo CYS145 se observan cuatro puntos críticos de enlace (BCP: 76, 111, 113 y 123). Todos estos puntos críticos presentan valores positivos de Laplaciano ($\nabla^2\rho(r) > 0$), lo cual es indicativo de una dispersión de la densidad electrónica a lo largo de la ruta de enlace. Adicionalmente, los valores de energía total ($H(r) > 0$) positivos son característicos de interacciones de capa cerrada (closed-shell en inglés), es decir, interacciones tipo enlaces iónicos, enlaces de hidrógenos y Van der Waals. Los valores del Laplaciano electrónico y la energía total en el punto crítico de enlace 111 confirman una interacción molecular efectiva entre el timol y el residuo CYS145 del tipo de enlace de hidrógeno. Como se puede observar en la Figura 6, la densidad electrónica del oxígeno asociada a los pares libres de electrones se orienta hacia el átomo de hidrógeno. Además, se observa la formación de un punto crítico de enlace entre el oxígeno del timol y el grupo -CH de la CYS145 (ver representación en la Figura 6). La magnitud de la energía total sugiere una interacción débil, del tipo Van der Waals. En este caso, el átomo de hidrógeno del grupo -CH actúa como un aceptor de electrones provenientes del átomo de oxígeno. Sin embargo, la naturaleza débil de este enlace se debe a la falta de un enlace covalente directo entre el hidrógeno y el oxígeno [42], [43].

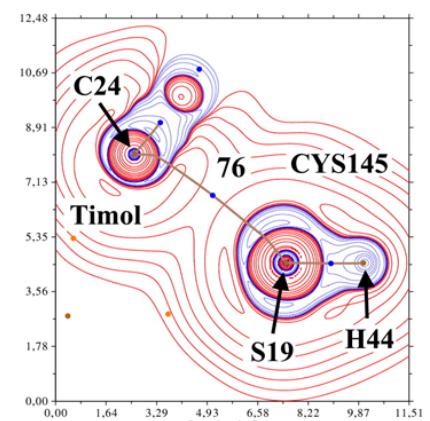


Figura 7. Mapas de contorno del Laplaciano de la densidad electrónica en el punto crítico de enlace 76 (isovalor = 0,05).

Adicionalmente, se observa la formación de un punto crítico de enlace entre el átomo de azufre del residuo CYS145 y un carbono del anillo aromático del timol (ver representación en la Figura 7). Los valores del Laplaciano electrónico y de la energía total sugieren una interacción covalente o parcialmente covalente de capa cerrada, debido a que los anillos aromáticos tienen densidades electrónicas altas como consecuencia de la deslocalización electrónica. Este hecho puede afectar la naturaleza y la fuerza de la interacción entre el átomo de azufre S19 y el átomo de carbono C24. Por otra parte, se observa la formación de un punto crítico de enlace entre un grupo -CH del timol y otro -CH del residuo CYS145 (ver Figura 8); este tipo de interacción es conocida como enlace de dihidrógeno y es muy similar al enlace de hidrógeno convencional, pero existe una fuerte interacción electrostática entre los átomos de hidrógenos con cargas parciales opuestas. Además, existe una contribución de fuerza de atracción de Van der Waals [44], [45]. El valor del Laplaciano electrónico obtenido de 0,0142 u.a. se encuentra dentro del rango reportado para este tipo de interacciones intermoleculares (0,014-0,139 u.a.) [46].

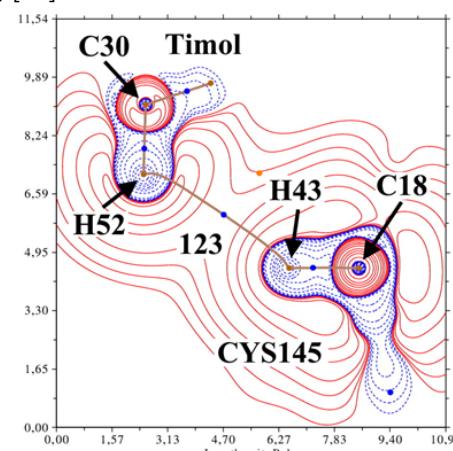


Figura 8. Mapas de contorno del Laplaciano de la densidad electrónica CYS145 en el punto crítico de enlace 123 (isovalor = 0,05).

Función de localización de electrones

La función de localización de electrones (ELF) es una herramienta útil para determinar la probabilidad de localizar pares de electrones. Además, ayuda a comprender el comportamiento de los electrones en un sistema molecular. En esta parte, el método ELF fue utilizado para el estudio de las interacciones entre el timol y los residuos HIS41 y CYS145 de la proteasa 3CL del virus SARS-CoV-2.

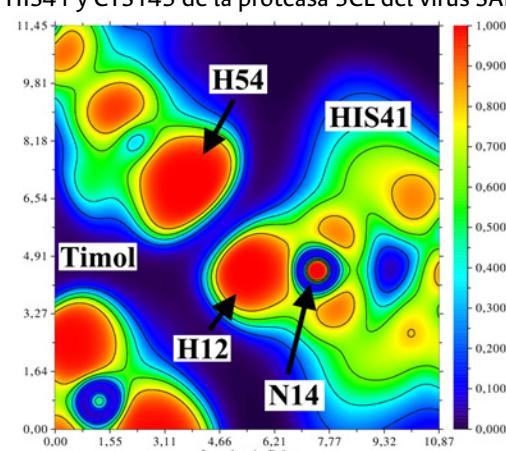


Figura 9. Mapa de contorno de la función de localización de electrones (isovalor = 0,85) para el H54 del timol con los átomos N14 y H12 del residuo HIS41.

En la Figura 9 se muestra el mapa ELF para la interacción molecular entre el timol y el residuo HIS41 en el plano para los átomos H54, H12 y N14. Este mapa revela zonas de color rojo asociadas a un carácter covalente, lo cual indica una alta localización de electrones, característica de un enlace covalente, lo que se correlaciona con lo obtenido por el análisis QTAIM.

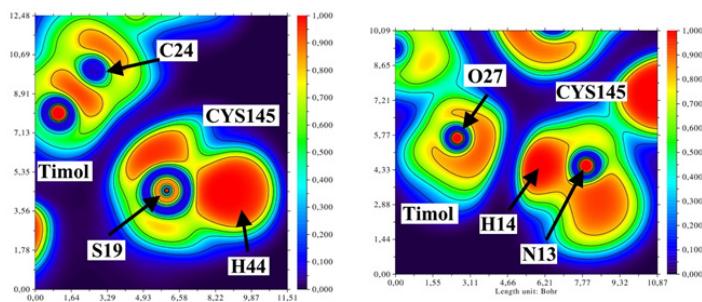


Figura 10. Mapa de contorno de la función de localización de electrones (isovalor = 0,85) para el timol con los átomos S19 y H14 de la CYS145.

Por su parte, en la Figura 10 se presentan los mapas ELF para la interacción entre el timol (átomos C24 y O27) y el residuo CYS145 (átomos S19 y H14). En ambos casos se puede observar que los pares libres de electrones participan en la interacción molecular, tanto para el átomo de azufre (S19) como para el átomo de oxígeno (O27). Los pares de electrones libres del oxígeno están orientados hacia el átomo de hidrógeno del grupo amino de la CYS145. Este comportamiento es característico para la formación de un enlace de hidrógeno. Finalmente, para el átomo de carbono se observa que la distribución electrónica está influenciada por la naturaleza del anillo aromático.

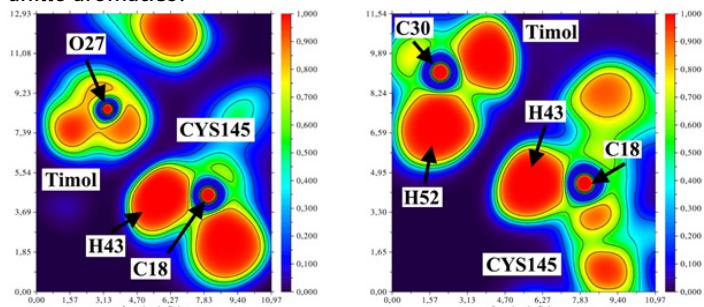


Figura 11. Mapa de contorno de la función de localización de electrones (isovalor = 0,85) para el timol con el átomo H43 de la CYS145.

En la Figura 11 se observan los mapas ELF para el timol (átomos O27 y H52) con el residuo CYS145 (átomo H43). En ambos casos se muestra que el átomo de hidrógeno del residuo CYS145 interviene en ambas interacciones moleculares. Adicionalmente, se observan zonas de alta concentración electrónica (color rojo) entre el hidrógeno H52 del timol y el H43 del residuo CYS145 característico de una interacción estérica no covalente hidrógeno-hidrógeno, lo cual corrobora lo observado para el Laplaciano electrónico en la Figura 8 con la presencia de un punto crítico de enlace entre el H52 del timol y el H43 del residuo CYS145 [41].

Método de gradiente reducido de la densidad (RDG)

En el análisis de interacción no covalente, uno de los métodos más utilizados es el gradiente reducido de la densidad (RDG por sus siglas en inglés); este método fue desarrollado por Johnson *et al.* [30], [31] y permite obtener la representación de las interacciones de enlaces de hidrógenos (H-B), Van der Waals (VdW) y efectos estéricos (E.E.). Adicionalmente, este método distingue las interacciones débiles como áreas de baja densidad electrónica y bajos gradientes de densidad reducida, por lo cual a partir de la isosuperficie RDG podemos identificar las diferentes regiones de interacción intermolecular simplemente examinando sus colores [47]. En el gráfico 2D de la Figura 12, la zona azul indica la presencia de interacciones no covalentes fuertes y atractivas como los enlaces de hidrógenos, la zona roja señala la presencia de interacciones repulsivas como efectos estéricos y la zona verde muestra la presencia de interacciones débiles como interacciones de Van der Waals.

En la Figura 12 se observa una isosuperficie de color azul ubicada entre el átomo de oxígeno del timol y el grupo N-H del residuo CYS145, lo cual indica la presencia de un enlace de hidrógeno. Por su parte, los valores de signo (λ_2) ρ permiten determinar la natura-

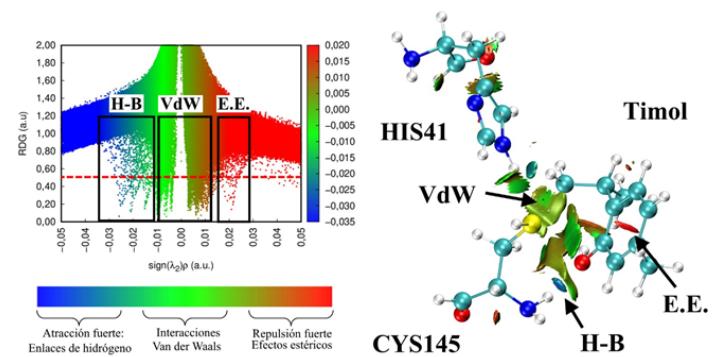


Figura 12. Gráfico 2D e isosuperficie de gradiente reducido de la densidad (isovalor = 0,85) para la interacción del timol con los residuos HIS41 y CYS145 de la proteasa 3CL del SARS-CoV-2.

leza de las interacciones moleculares. Aquí se observó que el enlace de hidrógeno (H-B) está comprendido entre -0,030 u.a. < signo(λ_2) ρ < -0,020 u.a., mientras que las interacciones moleculares de Van der Waals (isosuperficie de color verde), en un rango entre -0,010 u.a. < signo(λ_2) ρ < 0,010 u.a. Además, las isosuperficies de color rojo indican el efecto estérico que se encuentra en el anillo aromático del timol, lo que resulta en una fuerte repulsión. Estas interacciones repulsivas se observaron dentro de 0,020 u.a. < signo(λ_2) ρ < 0,030 u.a.

Modelo de gradiente independiente basado en la partición de Hirshfeld (IGMH)

El modelo de gradiente independiente basado en la partición de Hirshfeld (IGMH) permite calcular la densidad electrónica y el gradiente de la densidad electrónica de una molécula, basado en la partición de Hirshfeld, el cual consiste en dividir la densidad electrónica de la molécula en fragmentos atómicos [32], [47]. Adicionalmente, con este modelo se pueden visualizar y cuantificar las interacciones intermoleculares e intramoleculares. De allí, la importancia para el estudio de las interacciones entre el timol y los residuos HIS41 y CYS145. Uno de los parámetros por obtener a través de este modelo es el índice intrínseco de la fuerza de enlace para interacciones débiles (IBSIW) que permite cuantificar las fuerzas de las interacciones formadas [48].

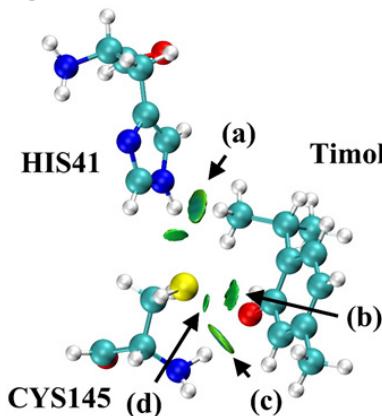


Figura 13. Isosuperficie IGMH para la interacción entre el timol y los residuos HIS41 y CYS145 de la proteasa 3CLpro.

Tabla 2. Índices intrínsecos de la fuerza de enlace obtenidos para las interacciones entre el timol y los residuos.

Residuos	Átomos involucrados	#	IBSIW (u.a.)
HIS41	R(N11-H12), L(H54-C30)	(a)	1,2848
	R(S19), L(C24)	(b)	0,4984
CYS145	R(N13-H14), L(O27)	(c)	1,6519
	R(C18-H43), L(O27)	(d)	0,4317

R: residuo, L: ligando.

Como se puede observar en la Figura 13, el análisis IGMH revela cuatro interacciones entre el timol y los residuos de la proteasa 3CL. Las zonas de color azul revelan una alta concentración de densidad electrónica característica de enlaces de hidrógeno; por su parte, las

zonas de color rojo señalan una baja densidad electrónica. Los valores de IBSIW permiten ordenar en función de la fuerza de la interacción; el enlace de hidrógeno formado entre la CYS145 y el timol es el de mayor magnitud, lo cual indica una fuerte interacción.

Conclusiones

Se emplearon métodos computacionales para analizar las interacciones moleculares entre el timol y los residuos clave en el sitio activo de la proteasa 3CL del SARS-CoV-2. Los resultados obtenidos a través del acoplamiento molecular revelaron que el timol se une al sitio activo de la 3CLpro, con una energía de interacción de -3,784 kcal/mol y una constante de inhibición de 1,29 mM. El mapeo de las interacciones mostró la formación de enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas con los residuos de aminoácidos HIS41, LEU141, GLY143, SER144, CYS145 e HIS163.

Asimismo, se caracterizaron las interacciones moleculares entre el timol y los residuos HIS41 y CYS145 utilizando las teorías QTAIM, ELF, RDG e IGMH. Estas teorías permitieron identificar la presencia de enlaces de hidrógeno y otras interacciones no covalentes. El análisis QTAIM mostró puntos críticos de enlace y la existencia de un enlace de hidrógeno entre el grupo OH del timol y el residuo CYS145 con valores de Laplaciano y densidad de energía total de 0,01036 y 0,0027 u.a. Además, ELF reveló cómo los pares de electrones libres en el oxígeno se orientan hacia el hidrógeno en CYS145, lo que favorece la formación del enlace de hidrógeno.

Finalmente, los análisis de RDG e IGMH para las interacciones no covalentes confirmaron la presencia de la formación del enlace de hidrógeno entre el timol y la CYS145 y la presencia de interacciones del tipo Van der Waals con la HIS41. Adicionalmente, en la formación de estas diversas interacciones el timol puede unirse de forma efectiva con los residuos CYS145 y HIS41 localizados en la región activa de la proteasa 3CLpro.

Referencias

- [1] B. Hu, H. Guo, P. Zhou, and Z.-L. Shi, “Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19”, *Nat Rev Microbiol*, vol. 19, no. 3, art. no. 3, Mar. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7>.
- [2] I. Antonopoulou, E. Sapountzaki, U. Rova, and P. Christakopoulos, “Inhibition of the main protease of SARS-CoV-2 (Mpro) by repurposing/designing drug-like substances and utilizing nature’s toolbox of bioactive compounds”, *Comput Struct Biotechnol J*, vol. 20, pp. 1306-1344, Mar. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2022.03.009>.
- [3] Q. Peng et al., “Structural Basis of SARS-CoV-2 Polymerase Inhibition by Favipiravir”, *Innovation (Camb)*, vol. 2, no. 1, p. 100080, Feb. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.xinn.2021.100080>.
- [4] Z. Jin et al., “Structure of Mpro from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors”, *Nature*, vol. 582, no. 7811, art. no. 7811, Jun. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2223-y>.
- [5] Z. Jin et al., “Structural basis for the inhibition of SARS-CoV-2 main protease by antineoplastic drug carmofur”, *Nat Struct Mol Biol*, vol. 27, no. 6, art. no. 6, Jun. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41594-020-0440-6>.
- [6] L. G. Ferreira, R. N. Dos Santos, G. Oliva, and A. D. Andricopoulos, “Molecular docking and structure-based drug design strategies”, *Molecules*, vol. 20, no. 7, pp. 13384-13421, Jul. 2015. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules200713384>.
- [7] L. Pinzi and G. Rastelli, “Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery”, *Int J Mol Sci*, vol. 20, no. 18, p. 4331, Sep. 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms20184331>.
- [8] M. T. López Luengo, “Tomillo”, *Offarm*, vol. 25, no. 1, pp. 74-77, Jan. 2006.
- [9] A. Kowalczyk, M. Przychodna, S. Sopata, A. Bodalska, and I. Fecika, “Thymol and Thyme Essential Oil-New Insights into Selected Therapeutic Applications”, *Molecules*, vol. 25, no. 18, p. 4125, Sep. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules25184125>.
- [10] A. Marchese et al., “Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature”, *Food Chem*, vol. 210, pp. 402-414, Nov. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.111>
- [11] P. Kumar Yadav, A. Jaiswal, and R. Kumar Singh, “In silico study on spice-derived antiviral phytochemicals against SARS-CoV-2 TMPRSS2 target”, *J Biomol Struct Dyn.*, vol. 40, no. 22, pp. 11874-11884, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1080/07391102.2021.1965658>
- [12] P. Umadevi, S. Manivannan, A. M. Fayad, and S. Shelly, “In silico analysis of phytochemicals as potential inhibitors of proteases involved in SARS-CoV-2 infection”, *J Biomol Struct Dyn.*, vol. 40, no. 11, pp. 5053-5059, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1866669>
- [13] S. Ali et al., “Natural products can be used in therapeutic management of COVID-19: Probable mechanistic insights”, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 147, p. 112658. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.112658>
- [14] B. Salehi et al., “Thymol, thyme, and other plant sources: Health and potential uses”, *Phytother Res*, vol. 32, no. 9, pp. 1688-1706, Sep. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1002/ptr.6109>
- [15] J. C. Ferreira, S. Fadl, A. J. Villanueva, and W. M. Rabeh, “Catalytic dyad residues His41 and Cys145 impact the catalytic activity and overall conformational fold of the main SARS-CoV-2 protease 3-chymotrypsin-like protease”, *Frontiers in Chemistry*, vol. 9, p. 692168, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.692168>.
- [16] M. A. Alamri et al., “Pharmacoinformatics and molecular dynamics simulation studies reveal potential covalent and FDA-approved inhibitors of SARS-CoV-2 main protease 3CLpro”, *J Biomol Struct Dyn.*, vol. 39, no. 13, pp. 4936-4948, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1782768>.
- [17] E. F. Pettersen et al., “UCSF Chimera visualization system for exploratory research and analysis”, *J Comput Chem*, vol. 25, no. 13, pp. 1605-1612, Oct. 2004. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>.
- [18] G. M. Morris et al., “AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility”, *J Comput Chem*, vol. 30, no. 16, pp. 2785-2791, Dec. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>.
- [19] S. Kim, “Getting the most out of PubChem for virtual screening”, *Expert Opin Drug Discov*, vol. 11, no. 9, pp. 843-855, Sep. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1080/17460441.2016.1216967>.
- [20] S. Kim et al., “PubChem in 2021: new data content and improved web interfaces”, *Nucleic Acids Res*, vol. 49, no. D1, pp. D1388-D1395, Jan. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa971>.
- [21] S. Kim et al., “PubChem 2023 update”, *Nucleic Acids Research*, vol. 51, no. D1, pp. D1373-D1380, Jan. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkac956>.
- [22] 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, p. 17, Aug. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1186/1758-2946-4-17>.
- [23] 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, 1996. 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).
- [24] E. J. Gardiner, P. Willett, and P. J. Artymiuk, “Protein docking using a genetic algorithm”, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, vol. 44, no. 1, pp. 44-56, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1002/prot.1070>.
- [25] F. Neese, “The ORCA program system”, *WIREs Computational Molecular Science*, vol. 2, no. 1, pp. 73-78, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1002/wcms.81>.

- [26] F. Neese, "Software update: The ORCA program system-Version 5.0", *WIREs Computational Molecular Science*, vol. 12, no. 5, p. e1606, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1002/wcms.1606>.
- [27] R. F. W. Bader, *Atoms in Molecules: A Quantum Theory*. In *International Series of Monographs on Chemistry*. Oxford, New York: Oxford University Press, 1994.
- [28] J. Hernández-Trujillo and R. F. W. Bader, "Properties of Atoms in Molecules: Atoms Forming Molecules", *J. Phys. Chem. A*, vol. 104, no. 8, pp. 1779-1794, Mar. 2000. DOI: <https://doi.org/10.1021/jp994096z>.
- [29] A. D. Becke and K. E. Edgecombe, "A simple measure of electron localization in atomic and molecular systems", *J. Chem. Phys.*, vol. 92, no. 9, pp. 5397-5403, May 1990. DOI: <https://doi.org/10.1063/1.458517>.
- [30] E. R. Johnson, S. Keinan, P. Mori-Sánchez, J. Contreras-García, A. J. Cohen, and W. Yang, "Revealing Noncovalent Interactions", *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 132, no. 18, pp. 6498-6506, May 2010. DOI: <https://doi.org/10.1021/ja100936w>.
- [31] M. T. Alotaibi, "Noncovalent interaction stabilizes the 2,4-Dinitrophenylhydrazone Derivatives over g-C₃N₄ surface to enhance optical properties: Synthesis, characterization, and DFT investigation", *Journal of Molecular Structure*, vol. 1214, p. 128192, Aug. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.128192>.
- [32] T. Lu and Q. Chen, "Independent gradient model based on Hirshfeld partition: A new method for visual study of interactions in chemical systems", *Journal of Computational Chemistry*, vol. 43, no. 8, pp. 539-555, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcc.26812>.
- [33] T. Lu and F. Chen, "Multiwfnn: A multifunctional wavefunction analyzer", *Journal of Computational Chemistry*, vol. 33, no. 5, pp. 580-592, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcc.22885>.
- [34] W. Dai et al., "Structure-based design of antiviral drug candidates targeting the SARS-CoV-2 main protease", *Science*, vol. 368, no. 6497, pp. 1331-1335, Jun. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.abb4489>.
- [35] D. Kumar, V. Chandel, S. Raj, and B. Rathi, "In silico identification of potent FDA approved drugs against Coronavirus COVID-19 main protease: A drug repurposing approach", *Chemical Biology Letters*, vol. 7, no. 3, art. no. 3, Mar. 2020. <http://pubs.acs.org/journal/index.php/cbl/article/view/1033>
- [36] L. Zhang et al., "Crystal structure of SARS-CoV-2 main protease provides a basis for design of improved α -ketoamide inhibitors", *Science*, vol. 368, no. 6489, pp. 409-412, Apr. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.abb3405>.
- [37] H. Yang, P. Boulet, and M.-C. Record, "A rapid method for analyzing the chemical bond from energy densities calculations at the bond critical point", *Computational and Theoretical Chemistry*, vol. 1178, p. 112784, May 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.comptc.2020.112784>.
- [38] R. Hilal, S. G. Aziz, A. O. Alyoubi, and S. Elroby, "Quantum Topology of the Charge Density of Chemical Bonds. QTAIM Analysis of the C-Br and O-Br Bonds", *Procedia Computer Science*, vol. 51, pp. 1872-1877, Jan. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procs.2015.05.423>.
- [39] R. W. Gora, S. J. Grabowski, and J. Leszczynski, "Dimers of Formic Acid, Acetic Acid, Formamide and Pyrrole-2-carboxylic Acid: An Ab Initio Study", *J. Phys. Chem. A*, vol. 109, no. 29, pp. 6397-6405, Jul. 2005. DOI: <https://doi.org/10.1021/jp044072e>.
- [40] M. Zahedi-Tabrizi, S. F. Tayyari, F. Badalkhani-Khamseh, R. Ghomi, and F. Afshar-Qahremani, "Molecular structure and intramolecular hydrogen bonding in 2-hydroxybenzophenones: A theoretical study", *J. Chem. Sci.*, vol. 126, no. 4, pp. 919-929, Jul. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12039-014-0651-7>.
- [41] C. F. Matta, J. Hernández-Trujillo, T. H. Tang, and R. F. Bader, "Hydrogen-hydrogen bonding: a stabilizing interaction in molecules and crystals", *Chemistry-A European Journal*, vol. 9, no. 9, pp. 1940-1951, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1002/chem.200204626>.
- [42] G. R. Desiraju, "The C-H \cdots O Hydrogen Bond: Structural Implications and Supramolecular Design", *Acc. Chem. Res.*, vol. 29, no. 9, pp. 441-449, Sep. 1996. DOI: <https://doi.org/10.1021/ar950135n>.
- [43] Y. Gu, T. Kar, and S. Scheiner, "Fundamental Properties of the CH \cdots O Interaction: Is It a True Hydrogen Bond?", *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 121, no. 40, pp. 9411-9422, Oct. 1999. DOI: <https://doi.org/10.1021/ja991795g>.
- [44] D. J. Wolstenholme, J. Flogeras, F. N. Che, A. Decken, and G. S. McGrady, "Homopolar Dihydrogen Bonding in Alkali Metal Amidoboranes: Crystal Engineering of Low-Dimensional Molecular Materials", *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 135, no. 7, pp. 2439-2442, Feb. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1021/ja311778k>.
- [45] N. Mohan, A. Varela-Álvarez, C. V. Ramana, and S. Sirimulla, "Computational Study of the C-H \cdots H-C Contacts in Valine-Methane Complexes", *ChemRxiv*, Apr. 15, 2021. DOI: <https://doi.org/10.26434/chemrxiv.14418869.v1>.
- [46] P. L. A. Popelier, "Characterization of a Dihydrogen Bond on the Basis of the Electron Density", *J. Phys. Chem. A*, vol. 102, no. 10, pp. 1873-1878, Mar. 1998. DOI: <https://doi.org/10.1021/jp9805048>.
- [47] C. Lefebvre, G. Rubbez, H. Khartabil, J.-C. Boisson, J. Contreras-García, and E. Hénon, "Accurately extracting the signature of intermolecular interactions present in the NCI plot of the reduced density gradient versus electron density", *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 19, no. 27, pp. 17928-17936, Jul. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1039/C7CP02110K>.
- [48] J. Klein, H. Khartabil, J.-C. Boisson, J. Contreras-García, J.-P. Piquemal, and E. Hénon, "New Way for Probing Bond Strength", *J. Phys. Chem. A*, vol. 124, no. 9, pp. 1850-1860, Mar. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jpca.9b09845>.

Citación del artículo:

J. G. González A., P. Iza, J. G. Parra, "Estudio computacional de las interacciones moleculares entre el timol y los residuos HIS41 y CYS145 presentes en el sitio activo de la proteasa 3CLpro", *Rev. Colomb. Quim.*, vol. 52, no. 1, pp. 42-48, 2023. DOI: <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v52n1.110606>

Síntesis de tioureas con isoniacida y niacida estructural: test frente a bacterias Gram + y Gram -

Resumen

Se sintetizaron los compuestos N-(2-nicotinoylhidrazina-1-carbonotioil)benzamida (H_3L1) y su isómero N-(2-isonicotinoylhidrazina-1-carbonotioil)benzamida (H_3L2) tipo N, S, O doadores, por reacción del isotiocianato de benzoilo con la hidracida nicotínica y la isoniacida, respectivamente. Los compuestos H_3L1 y H_3L2 fueron caracterizados por 1H -RMN, ^{13}C -RMN, FT-IR y análisis elemental. Se realizó el análisis computacional utilizando las funciones de Fukui para determinar las razones por las cuales no se formaron los 1,2,4-triazoles. Se hicieron pruebas preliminares de los compuestos sintetizados frente a *Staphylococcus aureus* (Gram+) y *Escherichia coli* (Gram-). Se demostró importante actividad frente a las bacterias mencionadas.

Synthesis of thioureas with structural isoniazid and niazid: test against Gram + and Gram - bacteria

Abstract

The compounds N-(2-nicotinoylhidrazine-1-carbonothiaryl)benzamide (H_3L1) and its isomer N-(2-isonicotinoylhidrazine-1-carbonothiaryl)benzamide (H_3L2) type N, S, O donors, by reaction of benzoyl isothiocyanate with nicotinic hydrazide and isoniazid respectively were synthesized. The H_3L1 and H_3L2 compounds were characterized by 1H -NMR, ^{13}C -NMR, FT-IR and elemental analysis. Computational analysis using the Fukui functions were performed to determine the reasons why the 1,2,4-triazoles were not formed. Preliminary tests of the synthesized compounds were carried out against *Staphylococcus aureus* (Gram+) and *Escherichia coli* (Gram-), having demonstrated significant activity against such bacteria.

Síntese de tioureas com isoniazida e niacida estruturais: teste contra bactérias Gram + e Gram -

Resumo

Os compostos N-(2-nicotinoilhidrazina-1-carbonotioil)benzamida (H_3L1) e seu isômero N-(2-isonicotinoilhidrazina-1-carbonotioil)benzamida foram sintetizados. (H_3L2) doadores tipo N, S, O, por reação de isotiocianato de benzoila com hidrazida nicotínica e isoniazida, respectivamente. Os compostos H_3L1 e H_3L2 foram caracterizados por 1H -NMR, ^{13}C -NMR, FT-IR e análise elementar. A análise computacional usando as funções de Fukui foi realizada para determinar as razões pelas quais os 1,2,4-triazóis não foram formados. Testes preliminares dos compostos sintetizados foram realizados contra *Staphylococcus aureus* (Gram+) e *Escherichia coli* (Gram-), tendo demonstrado atividade significativa contra as referidas bactérias.

Palabras clave: compuesto N, S, O dador; benzoiltioureas; DFT; funciones de Fukui.

Keywords: N, S, O donor compound; benzoyltioureas; DFT; Fukui functions.

Palavras-chave: composto doador N, S, O; benzoiltioureas; DFT; funções de Fukui.

Introducción

La isoniacida es uno de los principales fármacos utilizados como parte del tratamiento actual de la tuberculosis bajo las recomendaciones dadas por la OMS [1]. Por otro lado, su isómero, la niacida, ha demostrado propiedades antiinflamatorias, analgésicas y anticonvulsivantes [2].

Por medio de la reacción del grupo NH_2 terminal de la niacida y la isoniacida con diferentes tipos de isotiocianatos ha sido posible sintetizar diversas tiosemicarbazidas, las cuales han sido utilizadas en la formación de compuestos heterocíclicos como los 1,2,4-triazoles con un amplio espectro de actividad biológica [3], [4]. La síntesis de estos compuestos puede darse por medio de la ciclación espontánea de su tiosemicarbazida respectiva, o ciclándolos por acción de bases como NaOH , NaOEt o Na_2CO_3 [5], [6].

Las benzoiltioureas han ganado especial atención en los últimos años, debido a su utilidad como ligandos en la formación de complejos con metales de transición, reactivo de partida en la síntesis de compuestos heterocíclicos y por exhibir una amplia actividad biológica; se destaca su actividad antiviral, antimicrobiana y tuberculostática [7], [8].

Se ha demostrado que la inclusión de restos tipo 1,2,4-triazoles y 1,2,3-tiadiazoles en la estructura de las tioureas ha tenido una importante actividad como agente antituberculoso y antimicrobiano [9]. Los derivados que contienen restos ciclobutil y 1,3-oxazoles han mostrado alta y mejorada actividad inhibidora frente a un aislado clínico *Mycobacterium multidrogorresistente* [10]. El uso de la teoría del funcional de densidad (DFT) basada en la química cuántica proporciona una herramienta muy importante para la investigación de nuevos compuestos sintetizados. El uso de los descriptores de reactividad local, tales como la función de Fukui, ha demostrado que es posible predecir con gran exactitud la reactividad local de las moléculas analizadas y determinar si existe posibilidad de un ordenamiento intramolecular (ciclación) debido a la presencia de zonas de alta susceptibilidad a ser atacadas cercanas a un grupo altamente reactivo; esto contribuye con proporcionar un sustento teórico a lo que ocurre experimentalmente [11]-[15]. Se debe precisar que las referencias 11 y 15 contienen detalles sobre la síntesis de los compuestos N-(2-nicotinoilhidracina-1-carbonotioil)benzamida y N-(2-isonicotinoilhidracina-1-carbonotioil)benzamida y sus complejos metálicos de cobre y níquel.

Teniendo en cuenta las mejoras de la actividad biológica por la modificación estructural de las tioureas, se han obtenido nuevos compuestos que contienen en una misma estructura molecular a la benzoiltiourea, la niacida y la isoniacida, con la finalidad de potenciar las propiedades antibacterianas, antiinflamatorias y tuberculostáticas de estas. En ese sentido, el objetivo del presente trabajo es sintetizar y caracterizar dos nuevos ligandos, N, O y S dadores derivados de la benzoiltiourea, la isoniacida y la niacida, evaluar preliminarmente las actividades antimicrobianas de los ligandos obtenidos y utilizar las funciones de Fukui como descriptor de la reactividad local con el fin de determinar las zonas de reactividad y dar un sustento teórico a la ausencia de ciclación intramolecular en los ligandos sintetizados.

Materiales y métodos

Los reactivos utilizados en la síntesis fueron: cloruro de benzoilo, Merck (Alemania), para síntesis; tiocianato de potasio, Merck (Alemania), para síntesis; acetato de cobre (II) monohidratado, Merck (Alemania), para síntesis; acetato de níquel (II) hexahidratado, Sigma-Aldrich (EE. UU.), para síntesis; isoniacida, Sigma-Aldrich, (EE. UU.), grado analítico, $\geq 99\%$ (TLC); hidracida nicotínica, Sigma-Aldrich (EE. UU.), grado analítico, $\geq 97\%$ (TLC). Los solventes: metanol JT, Baker[®] ACS (EE. UU.); acetona JT, Baker[®] ACS; éter etílico JT,

Baker[®] ACS (EE. UU.); cloroformo JT, Baker[®] ACS (EE. UU.); etanol JT, Baker[®] ACS (EE. UU.), fueron secados antes de utilizarlos.

Los espectros de infrarrojo se obtuvieron en un espectrofotómetro modelo NicoletTM iSTM 10 FTIR Spectrometer, marca Thermo ScientificTM (EE.UU.). Se preparó la pastilla de bromuro de potasio utilizando 1 mg del compuesto en 10 mg de KBr a temperatura ambiente 20 °C, luego la lectura se realizó en los intervalos de 4000 a 400 cm^{-1} .

Los espectros de los compuestos ^1H -RMN, ^{13}C , APT, DEPT, COSY, HSQC, HMBC se obtuvieron de un espectrómetro marca Agilent, modelo Varian Mercury 400 plus (EE. UU.), tomado a 400 MHz para ^1H y 100 MHz para ^{13}C utilizando DMSO-d_6 como solvente a temperatura del ambiente (20 °C). Los compuestos estudiados fueron recristalizados previamente en etanol y secados a temperatura ambiente. Estas muestras purificadas se enviaron a la Universidad de Leipzig para la obtención de sus espectros por técnicas unidimensionales (C, H) y bidimensionales. De igual manera, las muestras purificadas sirvieron para realizar el análisis elemental en un analizador elemental, marca Perkin Elmer[®], modelo 2400 Series II CHNS/O Elemental Analysis (EE. UU.), de la Universidad de Leipzig.

Síntesis de los compuestos

Síntesis del compuesto N-(2-nicotinoilhidracina-1-carbonotioil)benzamida (H₃L1)

Se adicionaron 0,7 mL (6 mmol) de cloruro de benzoilo (PhCOCl) a una suspensión de 0,6 g (6 mmol) de tiocianato de potasio y 10 mL de acetona. La mezcla se dejó en reflujo a 56 °C durante 2 h con vigorosa agitación. Luego se enfrió y el precipitado de KCl se separó por filtración lavándolo con acetona caliente. La disolución obtenida se dejó enfriar en hielo a aproximadamente 10 °C.

En un vaso de 100 mL se depositaron 0,8 g (6 mmol) de niacina, a lo que se añadió la mezcla fría de isotiocianato de benzoilo y se dejó en reflujo a 56 °C por 4 h. La mezcla se dejó enfriar y luego se agregó este contenido en un vaso que contenía una mezcla de 10 mL de etanol con 0,07g de NaOH , la que se sometió a reflujo por 8 h a 56 °C; se observó la aparición de un precipitado amarillo que fue lavado con etanol frío y acidificado con HCl diluido. El precipitado cristalino blanco se filtró y lavó en etanol. El compuesto se recristalizó en etanol y se obtuvo un rendimiento del 68%. Punto de fusión: 200-202 °C; masa molecular: 300,34 g/mol.

Ánálisis elemental calculado para: $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}$: C (55,99%), H (4,03%), N (18,65%), S (10,68%). Encontrado: C (55,36%), H (4,09%), N (18,32%), S (10,53%).

FT-IR (cm^{-1}): 3241 (N-H); 3067 (C-H_{aromático}); 1653 (C=O_{tiourea}); 1668 (C=O hidracida); 1026 (anillo piridina); 876 (C=S).

^1H -RMN (400 MHz, DMSO-d_6): δ (ppm): 12,34 (s, 1H, $^1\text{N}-\text{H}$); 11,78 (s, 1H, $^2\text{N}-\text{H}$); 11,34 (s, 1H, $^3\text{N}-\text{H}$); 7,64 ($J = 4\text{Hz}$, d, 2H, Ar-H); 7,55 ($J = 6\text{Hz}$ t, 3H, Ar-H); 7,98 ($J = 4\text{Hz}$, d, 2H, Ar-H); 9,08 (s, 1H, Py-H); 8,79 ($J = 4\text{Hz}$, d, 1H, Py-H); 8,27 ($J = 4\text{Hz}$, d, 1H, Py-H); 7,59 ($J = 8\text{Hz}$, t, 1H, Py-H).

$^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ -APT-RMN (100 MHZ, DMSO-d_6): δ (ppm): 181,3 (C=S); 168,1 (C=O_{tiourea}); 163,7 (C=O hidracida); 132,2 (ipso-Phc=O): 128,4 (ipso-Pyc=O); 153,0 (o-ipso-N-Pyc=O); 149,0 (o-ipso-Pyc=O); 135,9 (o-ipso-Pyc=O); 133,6 (p-ipso-Phc=O); 129,2 (2C, o-ipso-Phc=O); 128,9 (2C, m-ipso-Phc=O); 124,1 (m-ipso-Pyc=O).

Síntesis del compuesto N-(2-isonicotinoilhidracina-1-carbonotioil)benzamida (H3L2)

En un balón de dos bocas se agregó 1 g (10 mmol) del reactivo tiocianato de potasio (KSCN) y 1,20 mL (10 mmol) de cloruro de benzoilo; se utilizó como solvente acetona anhidra (20 mL). La mezcla

se dejó en reflujo a 60 °C y agitación continua por dos horas; se separó luego por filtración el precipitado de cloruro de potasio (KCl) formado. La solución de isotiocianato de benzoilo en acetona resultante fue dejada en reposo.

Se preparó una suspensión de 1,12 g (8 mmol) de isonicida en acetona, la cual se agregó a la solución amarilla de isotiocianato de benzoilo y se obtuvo una suspensión amarilla pálida, que se dejó en agitación continua a temperatura ambiente durante 24 h, luego de las cuales se separó por filtración un precipitado blanco que se lavó varias veces con acetona fría. El compuesto resultante fue finalmente recristalizado en etanol absoluto y se obtuvieron cristales cúbicos blancos con un rendimiento del 60%. Punto de fusión: 207-208 °C; masa molecular: 300,34 g/mol.

Ánálisis elemental calculado para: $C_{14}H_{12}N_4O_2S$: C (55,99%), H (4,03%), N (18,65%), S (10,68%). Encontrado: C (55,72%), H (4,03%), N (18,40%), S (10,70%).

FT-IR (cm^{-1}): 3216 (N-H); 2974 (C-H_{aromático}); 1680 (C=O_{tiourea/hidracina}); 900 (C=S).

¹H-RMN (400 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm): 12,31 (s, 1H, ¹N-H); 11,80 (s, 1H, ²N-H); 11,44 (s, 1H, ³N-H); 7,99 (J = 4Hz, d, 2H, Ar-H); 7,67 (J = 6Hz t, 3H, Ar-H); 8,80 (d, 2H, Py-H); 7,82 (J = 4Hz, d, 2H, Py-H); 7,55 (J = 8Hz, t, 1H, Ar-H).

¹³C-{¹H}-DEPT-RMN (100 MHZ, DMSO-d₆) δ (ppm): 181,5 (C=S); 168,1 (C=O_{hidracina}); 163,6 (C=O_{tiourea}); 139,7 (ipso-Pyc=O); 133,6 (ipso-Phc=O); 150,9 (o-ipso-N-Pyc=O); 121,9 (m-ipso-Pyc=O); 128,9 (2C, o-ipso-Phc=O); 132,3 (p-ipso-Phc=O); 129,4 (2C, m-ipso-Phc=O).

Estudio preliminar de enfrentamiento microbiano

Los análisis de eficacia antimicrobiana contra *Escherichia coli* (bacteria gram-negativa) con cepa tipo ATCC 11229 y *Staphylococcus aureus* (bacteria gram-positiva) con cepa tipo ATCC 6538, de los compuestos H₃L1 y H₃L2, fueron realizados por el método AOAC Official Methods of Analysis (Use-Dilution Method (2) Official Final Action), el cual proporciona las diluciones adecuadas y los tiempos de exposición para evaluar la eficacia del candidato a desinfectante.

La evaluación se realizó tomando cantidades entre 46 y 147,5 mg de los compuestos en 6 mL de DMSO sobre un inóculo de concentración 1×10^6 ugfc/mL por un tiempo de contacto de 15 min.

Resultados y discusión

Caracterización infrarroja (FT-IR)

En el espectro FT-IR del compuesto H₃L1 se observa que existen dos señales que corresponden a los carbonilos que forman parte de la estructura del compuesto C=O (tiourea) 1653 cm^{-1} y C=O (hidracina) 1668 cm^{-1} . También se puede observar la presencia del grupo N-H (tiourea- hidracina) 3241 cm^{-1} , C-H (aromático) 3067 cm^{-1} y C=S (tiocarbonilo) 876 cm^{-1} . Estos valores de número de onda son semejantes a los encontrados en derivados de acil tiosemicarbazidas [16], [17], lo cual reforzaría la evidencia de que el compuesto está bajo la forma ceto.

En el análisis del espectro FT-IR del compuesto H₃L2 se observan las señales correspondientes a los grupos carbonilos C=O (tiourea e hidracina) a 1680,78 cm^{-1} ; también se observa la banda asociada al grupo N-H a 3216,39 cm^{-1} , C-H (aromático) a 2974,48 cm^{-1} y las bandas asociadas al grupo tiocarbonilo (C=S) a 1090, 1010 y 900,30 cm^{-1} [18]. Los anteriores valores de número de onda asociadas a las bandas descritas están de acuerdo con los valores encontrados en diversos derivados de las acil tiosemicarbazidas y también en varias tioureas sintetizadas [19]-[21].

Caracterización por espectroscopía RMN (¹H-RMN, ¹³C, APT, DEPT-135, COSY, HSQC, HMBC)

En el espectro ¹H-RMN del compuesto H₃L1, en DMSO-d₆, se observan tres señales pertenecientes a los protones de N-H¹, N-H², N-H³ a 12,34; 11,78 y 11,34 ppm, respectivamente. La señal 12,34 ppm a campos bajos fue asignada a la formación de un puente de hidrógeno intramolecular entre el grupo N-H¹ de la hidracina y el oxígeno del grupo carbonilo (N-H---O=C) característicos en derivados de las aroil tioureas [22]. Las otras dos señales a 11,78 y 11,34 ppm fueron asociadas a los grupos N-H² de la hidracina y la tiourea (N-H³), respectivamente. La señal doblete a 7,98 ppm, las señales tripletes a 7,55 y 7,64 ppm fueron asignadas al grupo fenil. Finalmente, en las señales asociadas al anillo piridínico se hallaron una señal singlete a 9,08 ppm, dos señales dobles a 8,79 y 8,27 ppm y una señal triplete a 7,59 ppm, las cuales son semejantes a algunos derivados de la hidracina nicotínica [23].

El espectro ¹³C-{¹H}-APT-RMN, en DMSO-d₆, muestra que las señales 181,3; 168,2 y 163,7 ppm corresponden respectivamente al grupo tiocarbonilo (C=S), al carbonilo (C=O) adyacente al grupo fenil y al carbonilo adyacente al anillo piridínico; es preciso resaltar que el desplazamiento del grupo C=S es muy característico de las benzoiltioureas [24], [25] y de las acil (aroil) tiosemicarbazidas [26], [27]. Los desplazamientos C-H asociados al grupo fenil se muestran en el rango de 133,11-128,5 ppm, mientras que los desplazamientos C-H relacionados al anillo piridínico se observaron entre 136, 154 y 124 ppm.

El espectro ¹H-RMN del compuesto H₃L2, en DMSO-d₆, como solvente, muestra tres señales singletes a 12,31 (N-H³), 11,80 (N-H²⁰) y 11,44 (N-H⁵) ppm debido a la presencia de tres protones tipo N-H. La presencia de estas señales confirmaría la existencia del compuesto H₃L2 bajo la forma ceto. El desplazamiento del protón N-H³ (12,31 ppm) se encuentra a campos bajos, probablemente debido a la formación de un puente de hidrógeno intramolecular, bastante típico en derivados de aciltioureas [21]. Los protones del anillo aromático bencénico dan señales triplete a 7,55 y 7,67 ppm, además de un doblete a 7,99 ppm, mientras que los protones pertenecientes al anillo piridínico muestran señales dobles a 7,82 y 8,80 ppm [28].

El espectro ¹³C-RMN muestra las señales 181,5; 168,19 y 163,61 ppm correspondientes a los grupos tiocarbonilo (C=S), carbonilo (C=O) unido al anillo bencénico y carbonilo (C=O) unido al anillo de piridina, respectivamente. El desplazamiento del grupo tiocarbonilo (C=S) encontrado en este compuesto es característico de varios compuestos tipo benzoiltioureas [29], [30].

Caracterización por análisis elemental

La composición porcentual obtenida para los compuestos H₃L1 y H₃L2 por medio del análisis elemental está de acuerdo con los valores esperados teóricamente; de esta manera se confirman las fórmulas moleculares propuestas.

Estudio computacional

Para determinar la distribución de los sitios activos de la molécula se utilizó Ec. (1), y Ec. (2) para calcular los valores de la función de Fukui para un ataque nucleofílico y electrofílico:

$$\text{Ataque nucleofílico} = f_A^+ = q_{N+1}^A - q_N^A \quad (1)$$

$$\text{Ataque electrofílico} = f_A^- = q_N^A - q_{N-1}^A \quad (2)$$

En la Tabla 1 se reportan los valores de la función de Fukui electrofílica y nucleofílica para los compuestos H₃L1 y H₃L2 para los átomos más importantes; estos valores han sido calculados con cargas Hirshfeld [31]- [33], las cuales han sido calculadas a nivel de la teoría DFT B3LYP/6-31G++ (d, p), a partir de las estructuras neutras

optimizadas con B3LYP/6-31G (d, p). Todos los cálculos fueron realizados con el paquete de programas Gaussian 09W. Rev. A02 [34], implementado en un PC Workstation AMD Fx(tm)-4300 3,80 GHz Quad-Core Processor, 4GB RAM.

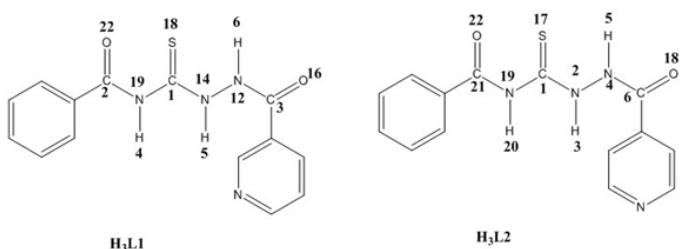


Figura 1. Estructura de los compuestos H_3L1 y H_3L2 .

Tabla 1. Valores para la función de Fukui para un ataque nucleofílico (f^+) y electrofílico (f^-) de los compuestos H_3L1 y H_3L2 .

H_3L1			H_3L2		
Átomo	f^+	f^-	Átomo	f^+	f^-
O22	0,07538	0,053424	O22	0,072932	0,046334
C3	0,045199	0,009622	C21	0,055992	0,005813
N12	0,015751	0,009461	N19	0,003222	0,024181
H6	0,021612	0,016615	H20	0,015155	0,016491
N14	0,012068	0,033616	N2	0,006371	0,031094
H5	0,01962	0,023669	H3	0,024899	0,016046
O16	0,065802	0,047894	H5	0,026867	0,011818
C1	0,026876	0,031922	O18	0,079938	0,038168
S18	0,102835	0,33675	C6	0,053838	0,008539
N19	0,005841	0,02041	S17	0,080762	0,345067
H4	0,010404	0,02113	N4	0,009704	0,015133
C2	0,056713	0,006829	C1	0,020568	0,031289

Los valores en negrita, indican la función de Fukui a tomar en cuenta para el análisis de reactividad local.

Con la finalidad de explicar la imposibilidad de ciclación de los compuestos se utilizó la función de Fukui para determinar los sitios más probables de desprotonación por parte de una base. Utilizando el concepto de interacción duro-duro conocida como la regla de Li-Evans [35], se consideraron los valores más bajos para la función de Fukui electrofílica (f^+) correspondientes a los hidrógenos H4 y H20 de los compuestos H_3L1 y H_3L2 , respectivamente.

Los carbonilos C2=O22 y C21=O22 son las zonas más susceptibles a un ataque nucleofílico en H_3L1 y H_3L2 , respectivamente; en el momento de la desprotonación el N19 desplaza su densidad electrónica a estos carbonilos, lo que da lugar a la forma enol en ambos compuestos; esto imposibilita la ciclación intramolecular de los compuestos al no poder disponer de una zona altamente electrofílica para ser atacada por un átomo de nitrógeno nucleofílico (Figura 2).

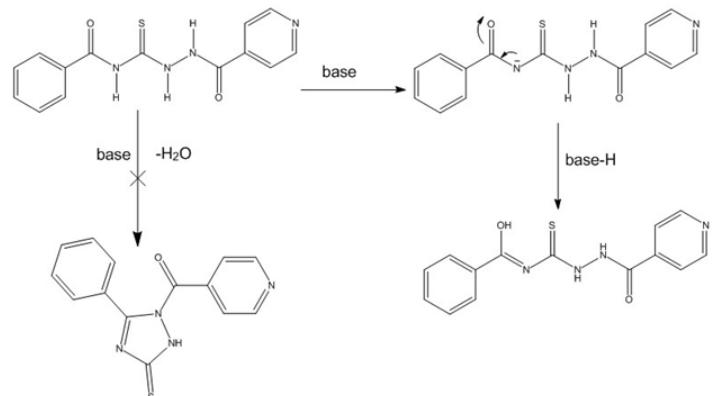


Figura 2. Formación de los compuestos H_3L1 y H_3L2 en concordancia con las funciones de Fukui.

Para el compuesto H_3L1 y su isómero H_3L2 , se muestra que los mayores valores para la función de Fukui nucleofílica (f^-) (susceptible a ataques electrofílicos) fueron para los átomos S18, O22, O16 y N14 en el compuesto H_3L1 , y S17, O22, O18 y N2 en el compuesto H_3L2 ; los átomos de azufre y oxígeno tienen la mayor posibilidad. Analogamente, en estructuras tipo dihidrotiouracilo-indenopiridopirimidinas se ha demostrado que las zonas de mayor preferencia para un ataque electrofílico son las que interactúan de mejor manera con los sitios activos de enzimas como la topoisomerasa humana II α y II β , y pueden ser fármacos antitumorales potenciales [36].

Análisis de enfrentamiento microbiano

Los resultados del análisis de eficacia antimicrobiana de los compuestos mostrados en la Tabla 2 indican que los compuestos analizados presentan actividad antimicrobiana para cantidades entre 46-147,5 mg en 6 mL de DMSO sobre un inóculo de concentración 1×10^6 ugfc/mL frente a *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) y *Escherichia coli* (ATCC 11229), desde el primer minuto de contacto.

Tabla 2. Estudios de enfrentamiento microbiano de los compuestos H_3L1 y H_3L2 .

Compuestos	Bacterias	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
H_3L1	+	+
H_3L2	+	+

Conclusiones

Se sintetizaron los compuestos H_3L1 y H_3L2 tipo aroil tiosemicarbazida por reacción entre el isotiocianato de benzoilo, la hidracida nicotínica y la isonicacida, los cuales se caracterizaron por espectroscopía FT-IR, RMN- 1H , ^{13}C y por análisis elemental. Se corroboró de manera preliminar que los compuestos sintetizados presentan actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, por lo que serían buenos candidatos a desinfectantes de superficies.

La función de Fukui ayudó a elucidar las zonas más probables de reactividad frente a especies nucleofílicas y electrofílicas, con la finalidad de explicar la imposibilidad de ciclación de los compuestos H_3L1 y H_3L2 , además de determinar las zonas más susceptibles a sufrir un ataque electrofílico por parte de iones de metales o a interactuar muy probablemente con los sitios activos de sistemas proteicos. Esto proporciona una herramienta muy útil en química para determinar qué partes específicas de las moléculas interactúan de mejor o peor manera.

Referencias

- [1] S. Van Beek, R. ter Heine, J. C. Alffenar, C. Magis-Escurra, R. Aarnoutse and E. Svensson, "A Model-Informed Method for the Purpose of Precision Dosing of Isoniazid in Pulmonary Tuberculosis", *Clin Pharmacokinet.*, vol. 60, no. 7, pp. 943-953, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40262-020-00971-2>.
- [2] N. Galić, I. Brođanac, D. Kontrec and S. Miljanić, "Structural investigations of arylhydrazones derived from nicotinic acid hydrazide in solid state and in solution", *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.*, vol. 107, pp. 263-270, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2013.01.028>.
- [3] R. Joshi, N. Pandey, S. Kumar, R. Tilak, H. Mishra, and S. Pokharia, "Synthesis, spectroscopic characterization, DFT studies and antifungal activity of (E)-4-amino-5-[N'-(2-nitro-benzylidene)-hydrazino]-2,4-dihydro-[1,2,4]triazole-3-thione", *J. Mol. Struct.*, vol. 1164, pp. 386-403, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2018.03.081>.
- [4] E. D. Dincel, N. Ulusoy-Güzeldemirci, D. Şatana, and Ö. Küçükbasımcı, "Design, synthesis, characterization and antimicrobial evaluation of some novel hydrazinecarbothioamide, 4-thiazolidinone and 1,2,4-triazole-3-thione derivatives", *J Heterocyclic Chem.*, vol. 58, no. 1, pp. 195-205, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1002/jhet.4159>.

- [5] J. Zhang, T.-H. Xi, Z. Chen, and X.-F. Wu, "Metal-free oxidative cyclization of trifluoroacetimidohydrazides with methylhetarenes: a facile access to 3-hetaryl-5-trifluoromethyl-1,2,4-triazoles", *Org. Chem. Front.*, vol. 8, no. 16, pp. 4490-4495, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1039/DQ000790D>.
- [6] M. N. Lino-Pacheco, "Síntesis y caracterización de ligandos polidentados n, o y s dadores y sus complejos metálicos por modificación estructural en las periferias de las aciltioureas". Tesis doctoral, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 2022.
- [7] U. Zahra, A. Saeed, T. Abdul Fattah, U. Flörke, and M. F. Erben, "Recent trends in chemistry, structure, and various applications of 1-acyl-3-substituted thioureas: a detailed review", *RSC Adv.*, vol. 12, pp. 12710-12745, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1039/d2ra01781d>.
- [8] J. R. Angulo-Cornejo, D. Bazalar de Valdivia, M. N. Lino, and F. Sosa-Amaya, "Acción tuberculostática y antibactariana de la 1,1-dietil-3-benzoiltiourea", *Rev. Soc. Quim., Perú*, vol. 70, no. 4, pp. 184-188, 2004.
- [9] S. Karakus and S. Rollas, "Synthesis and antituberculosis activity of new N-phenylN-[4-(5-alkyl/arylamino-1,3,4-thiadiazole-2-yl)phenyl]thioureas", *Il Farmaco*, vol. 57, no. 7, pp. 577-581, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0014-827X\(02\)01252-1](https://doi.org/10.1016/S0014-827X(02)01252-1).
- [10] D. Sriram, P. Yogeeswari, M. Dinakaranand, and R. Thirumurugan, "Antimycobacterial activity of novel 1-(5-cyclobutyl-1,3-oxazol-2-yl)-3-(sub)phenyl/pyridylthiourea compounds endowed with high activity toward multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*", *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 59, no. 6, pp. 1194-1196, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/dkm085>.
- [11] C. F. Tovar-Taboada, "Síntesis y caracterización del ligando N-{{[2-(piridin-3-ilcarbonil) hidrazinil] carbotionil} benzamida y su complejo de Níquel (II)". Tesis de título profesional, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 2017.
- [12] M. C. Henry, H. M. Senn, and A. Sutherland, "Synthesis of Functionalized Indolines and Dihydrobenzofurans by Iron and Copper Catalyzed Aryl C-N and C-O Bond Formation", *J. Org. Chem.*, vol. 84, no. 1, pp. 346-364, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.joc.8b02888>.
- [13] R. Kishida, A. G. Saputro, R. Arévalo, and H. Kasai, "Effects of introduction of α -carboxylate, N-methyl, and N-formyl groups on intramolecular cyclization of o-quinone amines: Density functional theory-based study", *Int. J. Quantum. Chem.*, vol. 117, no. 23, pp. e25445, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1002/qua.25445>.
- [14] M. Kut, M. Fizer, M. Onysko, and V. Lendel, "Reactions of N-alkenyl Thioureas with p-alkoxy phenyltellurium trichloride", *J. Heterocyclic. Chem.*, vol. 55, no. 10, pp. 2284-2290, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1002/jhet.3281>.
- [15] C. F. Tovar-Taboada, "Síntesis y caracterización de ligandos tipo N,O,S dadores y sus complejos metálicos derivados de las aroiltioureas y la sacarina". Tesis de maestría, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 2021.
- [16] A. Saeed, S. Ashraf, J. M. White, D. B. Soria, C. A. Franca, and M. F. Erben. "Synthesis, X-ray crystal structure, thermal behavior and spectroscopic analysis of 1-(1-naphthoyl)-3-(halo-phenyl)-thioureas complemented with quantum chemical calculations", *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol.*, vol. 150, pp. 409-418, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2015.05.068>.
- [17] F. Odame, E. Hosten, J. Krause, M. Issacs, H. Hoppe, S. D. Khanye, Y. Sayed, C. Frost, K. Lobb, and Z. Tshentu, "Synthesis, Characterization and Biological Activity of Some Dithiourea Derivatives", *Acta Chim. Slov.*, vol. 67, pp. 764-777, 2020. DOI: <https://doi.org/10.17344/acs.2019.5689>.
- [18] M. H. Abosadiya, H. Anouar, and B. M Yamin, "Synthesis, X-Ray, spectroscopic characterization (FT-IR, NMR, UV-Vis) and quantum chemical calculations of some substituted benzoylthiourea derivatives", *J. Mol. Struct.*, vol. 1194, pp. 48-56, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.05.060>.
- [19] D. Polo-Ceron, "Cu(II) and Ni(II) Complexes with New Tridentate NNS Thiosemicarbazones: Synthesis, Characterisation, DNA Interaction, and Antibacterial Activity", *Bioinorg. Chem. Appl.*, vol. 2019, pp. 1-14, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1155/2019/3520837>.
- [20] A. Muntaz et al., "Synthesis, characterization and urease inhibition studies of transition metal complexes of thioureas bearing ibuprofen moiety", *J. Chil. Chem. Soc.*, vol. 63, no. 2, pp. 3934-3940, 2018. DOI: <https://doi.org/10.4067/s0717-97072018000203934>.
- [21] D. A. Tolan, T. I. Kashar, K. Yoshizawa, and A. M. El-Nahas, "Synthesis, spectral characterization, density functional theory studies, and biological screening of some transition metal complexes of a novel hydrazide-hydrazone ligand of isonicotinic acid", *Appl. Organomet. Chem.*, vol. 35, no. 6, pp. e6205, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1002/aoc.6205>.
- [22] A. Saeed, R. Qamar, T. A. Fattah, U. Flörke, and M. F. Erben, "Recent developments in chemistry, coordination, structure and biological aspects of 1-(acyl/aroyl)-3-(substituted) thioureas", *Res Chem Intermed.*, vol. 43, pp. 3053-3093, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11164-016-2811-5>.
- [23] A. Gueye, F. Tamboura, A. Sy, M. Gaye, N. Gruber, and A. Jouaiti, "Six New Transition Metal Mononuclear Complexes of N-(5-bromo-2-hydroxybenzylidene)nicotinohydrazide Schiff Base. Synthesis, Spectroscopic Characterization And X-ray structure Determination of the Zinc(II) Complex", *IOSR-JAC*, vol. 12, no. 4, pp. 24-30, 2019. DOI: <https://doi.org/10.9790/5736-1204012430>.
- [24] B. Özgeriç, "Design, synthesis, characterization, and biological evaluation of nicotinoyl thioureas as antimicrobial and antioxidant agents", *J. Antibiot.*, vol. 74, no. 4, pp. 233-243, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41429-020-00399-7>.
- [25] F. Aydin and N. B. Arslan, "Synthesis, Crystal Structure and Cyclic Voltammetric Behavior of N-aryloyl-N'-(4'-cyanophenyl) thioureas", *Molbank*, vol. 2022, no. 1, p. M1316, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/m1316>.
- [26] K. Jayanthi1, R. P. Meena, K. Chithra1, S. Kannan, W. Shanthi, R. Saravanan, M. Suresh, and D. Satheesh, "Synthesis And Microbial Evaluation of Copper(II) Complexes of Schiff Base Ligand Derived From 3-Methoxysalicylaldehyde With Semicarbazide and Thiosemicarbazide", *J. Pharm Chem Biol Sci.*, vol. 5, no. 5, pp. 205-215, 2017.
- [27] S. Demir Kanmazalp, E. Basaran, A. Karaküçük-İyidoğan, E. Oruç-Emre, F. Şen, and N. Dege, "Synthesis, characterization, spectroscopy, X-ray structure and gaussian hybrid computational investigation of (-)-(S)-1-[2-(benzenesulfonamido)-3-phenylpropanoyl]-4-[(4-methyl)phenyl]thiosemicarbazide", *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*, vol. 193, no. 10, pp. 675-684, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1080/10426507.2018.148871>.
- [28] K. Feinstein, *Guide to Spectroscopic Identification of Organic Compounds*, 2th. ed. CRC Press, 2018.
- [29] K. Ghazal, S. Shoaib, M. Khan, S. Khan, M. K. Rauf, N. Khan, A. Badshah, M. Nawaz Tahir, I. Ali, and Attiq-ur-Rehman. "Synthesis, characterization, X-ray diffraction study, in-vitro cytotoxicity, antibacterial and antifungal activities of nickel(II) and copper(II) complexes with acyl thiourea ligand", *J. Mol. Struct.*, vol. 1177, pp. 124-130, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2018.09.028>.
- [30] A. Khurshid et al., "Experimental and Hirshfeld Surface Investigations for Unexpected Aminophenazone Cocrystal Formation under Thiourea Reaction Conditions via Possible Enamine Assisted Rearrangement", *Crystals*, vol. 12, no. 5, p. 608, Apr. 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/cryst12050608>.
- [31] B. Wang, C. Rong, K. Chattaraj, and S. Liu. "A comparative study to predict regioselectivity, electrophilicity and nucleophilicity with Fukui function and Hirshfeld charge", *Theor. Chem. Acc.*, vol. 138, no. 12, pp. 1-9, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00214-019-2515-1>.

- [32] D. Soro, L. Ekou, M. G.-R. Koné, T. Ekou, and N. Ziao, "DFT Study of Molecular Stability and Reactivity on Some Hydroxamic Acids: An Approach by Hirshfeld Population Analysis", *EJENG*, vol. 4, no. 2, pp. 45-49, 2019. DOI: <https://doi.org/10.24018/ejeng.2019.4.2.1121>.
- [33] J. Carmona-Espíndola and J. L. Gázquez, "Charge transfer excitations and constrained density functional theory", *Theor Chem Acc.*, vol. 141, no. 1, pp. 1-10, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00214-021-02860-8>.
- [34] Gaussian 09 W A02, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuse-ria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Iz-maylov, J. Ioino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, T. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Yengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Kle-
ne, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Strat-mann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dan-nenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, O. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, D. J. Fox, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.
- [35] Z. Fellahi, H. Chenaf-Ait, D. Hannachi, A. Djedouani, L. Ouk-sel, M. François, S. Fleutot, and R. Bourzami, "Synthesis, X-ray crystallography, Hirshfeld surface analysis, thermal properties and DFT/TD-DFT calculations of a new material hybrid ionic (C₁₀H₁₈N₂O₈2⁺.2ClO₄-4H₂O)", *J. Mol. Struct.*, vol. 1244, no. 130955, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.130955>.
- [36] M. E. Elshakre, M. A. Noamaan, H. Moustafa, and H. Butt, "Density Functional Theory, Chemical Reactivity, Pharmacological Potential and Molecular Docking of Dihydrothiouracil-Indenopyridopyrimidines with Human-DNA Topoisomerase II", *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 21, no. 4, p. 1253, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21041253>.

Citación del artículo:

J. R. Angulo-Cornejo, C. F. Tovar-Taboada, "Síntesis de tioureas con isoniacida y niacida estructural: test frente a bacterias Gram + y Gram -", *Rev. Colomb. Quim.*, vol. 52, no. 1, pp. 49-54, 2023. DOI: <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v52n1.108362>