

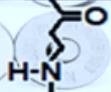
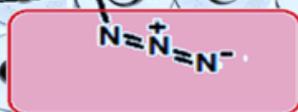


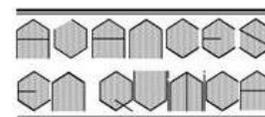
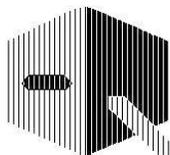
# Avances en Química

Volumen 18

Número 2

Mayo - Agosto 2023





# Desarrollo de un método de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) para la separación y cuantificación de diosgenina en un extracto del fruto iguaraya de la planta cardón guajiro (*Stenocereus griseus*)

Emerson Eliecer León Ávila

Facultad de Ciencias, Programa de química farmacéutica, Universidad El Bosque.  
Grupo de Investigación en Química Aplicada (INQA) Bogotá, Colombia.

[leonemerson@unbosque.edu.co](mailto:leonemerson@unbosque.edu.co)

Recibido: 01/02/2023

Revisado: 24/03/2023

Aceptado: 31/07/2023

## Resumen

La comunidad indígena Wayuú (La Guajira, Colombia), ha tratado enfermedades con recursos naturales de su entorno. Uno de los recursos más utilizados en esta región para el tratamiento de enfermedades de tipo gastrointestinal, son las infusiones de la iguaraya, un fruto de la planta cardón guajiro. Teniendo en cuenta que un buen número de saponinas poseen propiedades antiinflamatorias, el presente trabajo estudia la diosgenina, una saponina que puede estar presente en un extracto metanólico de la pulpa del fruto, desarrollando un método de separación y cuantificación del analito por medio de cromatografía líquida de alta resolución con un detector UV-VIS y posteriormente validando el procedimiento para garantizar la exactitud, precisión, linealidad, selectividad, reproducibilidad y robustez de los resultados.

**Palabras claves:** cromatografía líquida; diosgenina; iguaraya; validación

## Abstract

**Development of a high efficiency liquid chromatography (HPLC) method for the separation and quantification of diosgenin in an extract of the iguaraya fruit of the Cardón Guajiro plant (*Stenocereus griseus*).** The native community Wayuú (Guajira, Colombia) has treated several body illnesses using natural resources from their surroundings. One of these resources, used mainly for gastrointestinal matters, is the infusion of the Iguaraya, fruit from a local Tree called "Cardon guajiro". Considering that a significant group of Saponins has anti-inflammatory properties, this research focuses on the study of the Diosgenin, saponin which might be present on the extract of the mentioned fruit. This project intends to develop a method in order to separate and quantity through high resolution liquid chromatography with a detector UV-VIS and subsequently, assessing the procedure in order to quarante the accuracy, linearity, selectivity, reproducibility and the robustness of the final results.

**Keywords:** Liquid chromatography; Diosgenin; Iguaraya; Validation

## Introducción

*Stenocereus griseus* conocido como cardón guajiro, es una planta que pertenece a la familia *Cactaceae*, especie endémica de Colombia, encontrado en el departamento de La Guajira, el fruto de esta planta es conocido como la iguaraya, consumido frecuentemente por los indígenas de la Península de la Guajira (pueblo Wayuú) en infusiones con agua, como tratamiento tradicional, debido a los conocimientos ancestrales pertenecientes a esta etnia<sup>1</sup>, para el tratamiento de enfermedades de tipo gastrointestinal, en donde se destacan propiedades curativas para el dolor estomacal como antiespasmódico y en personas con colitis como antiinflamatorio. Sin embargo, las propiedades que se le han atribuido a la iguaraya corresponden al conocimiento empírico generado por la comunidad Wayuú y no se cuenta con una base científica sólida que verifique la composición de la iguaraya y la relación de dichos componentes con los posibles usos farmacéuticos para el tratamiento medicinal alternativo.

Las saponinas (glucósidos triterpenoides) han demostrado una importante actividad antiinflamatoria<sup>2</sup> mediada por la inhibición de la síntesis y liberación de sustancias proinflamatorias tales como las citocinas, las cuales son proteínas reguladoras de las respuestas inmunitaria e inflamatoria; así como también inhiben la producción de mediadores inflamatorios, la iguaraya es un fruto que puede contener saponinas, analito de interés para cuantificar por las propiedades anteriormente mencionadas<sup>3</sup>.

Con base en lo anterior, este proyecto busca desarrollar y validar un método para separar y cuantificar por cromatografía líquida de alta eficiencia con detector UV/VIS, la diosgenina, una saponina que posiblemente puede estar presente en la iguaraya, validando el método de separación por medio de parámetros como la exactitud, precisión, selectividad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, y robustez, siguiendo las directrices de la guía ICH Q2, validación de procesos analíticos<sup>4</sup>, a través de curvas de calibración que permitan encontrar la concentración de este analito.

## Parte experimental

### *Obtención del extracto de la pulpa y semillas de Stenocereus griseus*

Para el tratamiento de la materia prima, recolectada en la rancharía Laachon del corregimiento de Mayapo, perteneciente al municipio de Manaure, La Guajira-Colombia se decidió realizar una extracción por maceración dinámica, ya que es uno de los métodos convencionales más usados para este fin y lograr obtener el extracto que puede contener diosgenina (saponina). Las saponinas poseen en su estructura química una parte polar (azúcar) y una apolar, sapogenina<sup>5</sup>, sin embargo, se ha demostrado experimentalmente que se pueden obtener extractos con buen porcentaje de recuperación, empleando únicamente solventes polares. Se procedió a realizar la extracción con metanol, etanol, acetona y diclorometano.

Para preparar la muestra se tomó la fruta madura de iguaraya, eliminando la cáscara y obteniendo únicamente como fuente de trabajo la pulpa. Posteriormente, se disminuyó el tamaño de partícula. El producto resultante fue congelado y liofilizado, en un equipo BUCHI Lyovapor TM L-200, a 0,100 mbar y -58,6 °C. Se pesaron 26,2433 g de la pulpa y se adicionó el disolvente polar correspondiente. El extracto se obtuvo mediante maceración dinámica a 200 rpm por 24 horas. Finalmente, los extractos fueron filtrados al vacío para eliminar impurezas y componentes no disueltos.

Para poder trabajar con un patrón de referencia que permita soportar el estudio, se adquirió por Sigma Aldrich el estándar diosgenina (CAS 512-04-9) marca TRC Canadá, con una pureza de  $\geq 95\%$ . Para la curva de calibración se preparó una solución madre con diosgenina de 1000 ppm; la solución fue sometida a tratamiento con ultrasonido por 5 minutos. Se hicieron diluciones en rango de 5 ppm a 800 ppm.

## Resultados y discusión de resultados

### *Separación de diosgenina de la matriz*

La diosgenina es una molécula con carácter ligeramente polar que exhibe alta solubilidad en agua; por lo tanto, la técnica más adecuada para trabajar fue la cromatografía de fase inversa<sup>6</sup> (RP-HPLC). Inicialmente, se hicieron pruebas paralelas, tanto de la solución madre como de los extractos de la iguaraya para poder reconocer el comportamiento de estos, frente a diferentes condiciones cromatográficas. Se hicieron variaciones controladas de componentes y las proporciones de la fase móvil, del flujo y longitudes de onda, entre otras. Se analizaron los tiempos de retención, la simetría de los picos, la selectividad, la repetibilidad y la reproducibilidad para comprender la complejidad de la matriz<sup>7</sup>.

Dado que la polaridad de los grupos funcionales presentes en el analito determina el orden de elución de los compuestos y reconociendo la presencia de grupos funcionales orgánicos en la diosgenina, se esperaba que los tiempos de retención sean me-

nores a los 15 minutos. El tiempo de retención puede verse alterado cambiando la polaridad de la fase móvil, se ajustó la proporción de acetonitrilo:agua, para reconocer la composición de fase móvil adecuada para lograr obtener el pico característico tanto para el patrón como para el analito dentro de la matriz de los extractos obtenidos, sea selectivo y con una distribución normal superior del 95,45% de los valores en el intervalo que presenta la forma de la campana gaussiana, que permita evaluar estadísticamente el área bajo la curva y pueda cuantificar la concentración de la sustancia de estudio con una confianza y reproducibilidad<sup>8</sup>.

### *Selección de las condiciones cromatográficas*

Con una solución de concentración conocida del estándar, se efectúa un barrido en el espectrofotómetro Genesys<sup>®</sup> 10S UV-VIS marca Thermo Scientific para determinar la longitud de máxima absorción, la cual es de 194 nm. Posterior se realizaron corridas de patrón y los diferentes extractos con disolventes polares (metanol, etanol, acetona y diclorometano) del fruto de iguaraya, aplicando un algoritmo para controlar las variables según los resultados obtenidos. Después de realizar múltiples ensayos y buscando la mejor resolución del pico de diosgenina, separado de los demás picos correspondientes a los componentes de los extractos obtenidos, se encontró que las condiciones que permiten una separación y cuantificación con alto grado de repetibilidad, selectividad y robustez se presentan en la tabla 1.

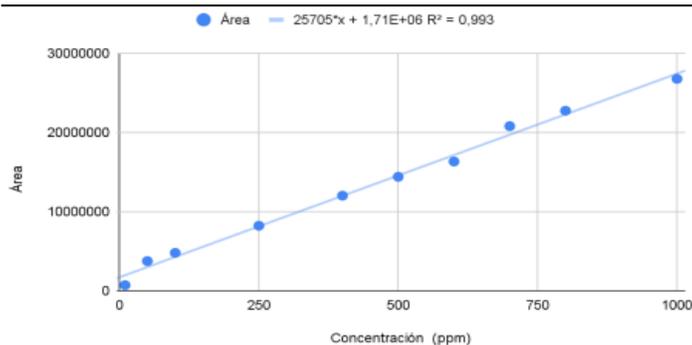
**Tabla 1.** Condiciones establecidas en el desarrollo del método cromatográfico.

Flujo	1 mL/min
Volumen de inyección	10 $\mu$ L
Fase móvil	90:10 ACN:Agua
Fase estacionaria	Columna Ultra AQ C18
Tiempo de análisis	10 min
Detector	UV- VIS a 194 nm
Temperatura	35 °C

Para este caso de la extracción de diosgenina en la pulpa de la iguaraya, dada la señal arrojada por el equipo de cromatografía líquida de alta eficiencia y la comparación de los resultados con el estándar, la mayor intensidad obtenida fue dada por el extracto tratado con metanol, soportando esto en que la intensidad de la señal, en ese tiempo de retención específico, está relacionado directamente con la concentración del analito<sup>7,9</sup>.

### *Curva de calibración*

A partir de las diferentes concentraciones evaluadas por triplicado se obtuvo una curva con un  $R^2 > 0,99$ , como se puede observar en la gráfica 1. Con base en lo anterior, se puede inferir que la curva de calibración presenta buena relación de área bajo de curva del pico con respecto a la concentración de patrón diosgenina<sup>10</sup>, lo que permite resultados confiables para cuantificar el analito en la pulpa del fruto iguaraya con base en las áreas obtenidas.

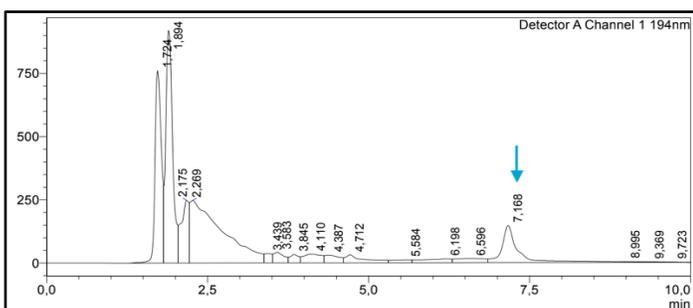


**Grafica 1.** Curva de calibración empleando el estándar diosgenina.

### Separación y cuantificación de diosgenina presente en *Stenocereus griseus* por HPLC:

En cuanto a la separación y cuantificación de diosgenina por cromatografía líquida de alta eficiencia, se determinó que en fase reversa y con las condiciones adecuadas se puede lograr obtener resultados con sensibilidad, exactitud, precisión y robustez.

En el cromatograma de la figura 1, se puede apreciar el pico característico en un tiempo de retención ( $t_R$ ) 7,16 minutos, el cual es el mismo tiempo de retención obtenido para el estándar de diosgenina ( $\approx t_R = 7,20$  min), posterior a esto se realizó una adición de patrón al extracto y se evidenció un incremento en la intensidad del pico en ese tiempo de retención, lo que posiblemente permite considerar que se está encontrando una señal característica de la diosgenina. Para este estudio se trabajó con el método de estándar externo y el área bajo la curva del pico obtenido fue de 2.642.171, determinando que la concentración de diosgenina (saponina) presente en el extracto metanólico del fruto iguarraya fue de 36,36 ppm.



**Fig. 1:** Cromatograma obtenido del extracto de iguarraya bajo condiciones del método desarrollado a 194 nm.

### Validación del método

Se siguieron las guías para la validación de métodos analíticos descritos<sup>9</sup>. A partir de estas pautas, se hizo la evaluación de los siguientes parámetros:

**I. Linealidad.** Se determinó por medio de la curva de calibración, para la cual se prepararon diluciones en concentraciones en un rango entre 5 ppm y 1000 ppm del estándar y se inyectaron por triplicado. Se obtuvo la curva y la respectiva ecuación de regresión. Los coeficientes de correlación, y determinación fueron calculados. Adicionalmente, se hizo un test estadístico de student.

Se utilizó la ecuación 1 para calcular el valor del coeficiente de regresión lineal ( $r$ ), el cual es un valor determinante para la linealidad.

$$r = \frac{\Sigma X*Y - (\Sigma X*\Sigma Y/n)}{\sqrt{[\Sigma X^2 - ((\Sigma X)^2/n)][\Sigma Y^2 - ((\Sigma Y)^2/n)]}} \quad (\text{ecuación 1})$$

El resultado fue para  $r = 0,996$ , y para  $r^2 = 0,993$ . En este caso, se observó que el modelo lineal se considera aceptable, de acuerdo con lo establecido por la guía ICH Q2.

Adicionalmente, se procedió a hacer un test estadístico con los valores de la tabla t de student, donde se compara un valor de t calculado y con un valor de t tabulado, este test estadístico, verifica la relación lineal directa estadísticamente significativa entre las variables. Para hallar el t calculado se empleó la ecuación 2, donde se obtuvo un valor de 33,24. Al comparar ambos valores, se observa que  $33,24 > 2,31$ ; demostrando que existe correlación significativa entre la concentración y la señal arrojada por el equipo, que en este caso es el área.

$$t_{calculada} = \frac{r * \sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}} \quad (\text{ecuación 2})$$

**II. Precisión.** La precisión se evaluó por medio de dos parámetros: la repetibilidad, y la reproducibilidad. Se hallaron la desviación estándar (S), la desviación estándar relativa (RSD), y finalmente se halló el intervalo de confianza de la medida.

En el caso de la repetibilidad, se evaluaron 6 inyecciones, se hallaron la desviación estándar (S) y la desviación estándar relativa (RSD), las cuales se pueden observar en la tabla 2.

**Tabla 2.** Valores obtenidos para muestra de concentración conocida (1000 ppm) para evaluación de la repetibilidad.

Muestra	Concentración (ppm)
Promedio	968,96
S	7,48
RSD	0,77

De acuerdo con lo establecido por la guía ICH Q2, RSD menor al 2% se considera aceptable, indicando que hay una buena repetibilidad. Para el presente estudio, se encontró un RSD de 0,77%, por lo que se puede deducir que el método tiene una buena repetibilidad.

Por otra parte, se midió la reproducibilidad o precisión interlaboratorios, para lo cual se varió el analista y el día. En este caso, la RSD fue de 0,92 % para el analista 1, y 0,57 % para el analista 2, ambos RSD son menores a 2% por lo que se consideran aceptables. Los resultados de concentración no evidencian diferencias significativas estadísticamente.

**III. Exactitud.** Se determinó por medio del porcentaje de recuperación con una muestra de concentración conocida que es inyectada en el equipo, y por medio de la curva de calibración de determina la concentración para realizar la comparación pertinente.

La determinación de la exactitud se llevó a cabo con muestras a tres niveles diferentes de concentración dentro del rango establecido (80, 120 y 200 ppm). Las inyecciones de dichas muestras se hicieron por triplicado, para un total de 9 muestras, 3 de cada concentración. Para cada muestra, se calculó el porcentaje de recuperación. Se halló el valor promedio del porcentaje de recuperación para las tres concentraciones, la desviación estándar, y la desviación estándar relativa.

A partir de estos datos fue posible calcular la  $t_{exp}$ , usando la ecuación 3, como se muestra en la tabla 3.

**Tabla 3.** Resultados estadísticos para verificación de exactitud.

Promedio	98,39
S	2,45
RSD	2,49
$t_{exp}$	1,94

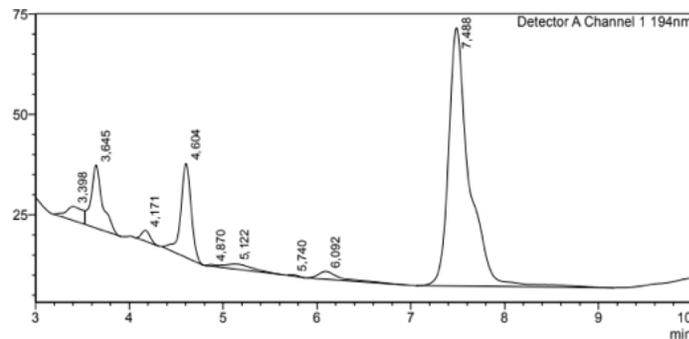
$$t_{exp} = \frac{(100 - \% \text{ recuperación}) * \sqrt{9}}{RSD} \quad (\text{ecuación 3})$$

El valor calculado para  $t_{exp}=1,94$ , fue comparado con  $t_{tab}$ , de acuerdo con las tablas de t de student para  $n-1= 8$  grados de libertad, con el 95% de confianza. En este caso, el valor de  $t_{tab}= 2,31$ . Con ambos valores, se hace una comparación donde  $t_{exp}$  debe ser menor a  $t_{tab}$  para que no exista una diferencia significativa, y se considere que el método tiene una exactitud aceptable. Para este caso, efectivamente  $t_{exp}=1,94 < t_{tab}= 2,31$ , por lo que se puede inferir que el método es exacto para dicho nivel de confianza.

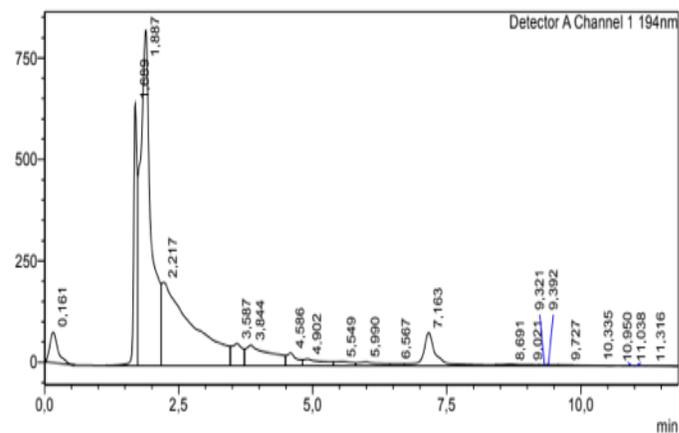
**IV. Robustez.** En este caso, se inyectaron muestras de concentración conocida del analito, y se hicieron algunos cambios en las condiciones cromatográficas, se sometió las muestras a ensayos de degradación forzada, tales como hidrólisis alcalina (a), hidrólisis ácida (b), y oxidación (c). Con el fin de analizar los resultados y reconocer interferencias en la señal del analito. Se tomó una solución madre de 40 ppm, y se tomaron alícuotas y fueron transferidas para llevar a siguientes condiciones: (a) reflujo a 80°C con NaOH por 1 hora; (b) reflujo a 80°C con HCl por 1 hora; y (c) calentamiento en baño maría con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 1 hora. Pasado este tiempo, se transfirieron las soluciones a viales y se analizaron por cromatografía líquida a las mismas condiciones, obteniéndose los siguientes cromatogramas.

En las figuras 2 y 3, correspondientes a los cromatogramas de las muestras sometidas a hidrólisis básica, y ácida, respectivamente, se observa el posible pico característico de la diosgenina, en un tiempo de retención ( $t_R$ ) 7,17 minutos; los otros picos pueden corresponder a algún producto de degradación, tales como subproductos de esterificaciones en el C3 y C27, de igual forma la ruptura de uno de los anillos de la estructura y la oxidación de la misma puede llegar a general productos como la diosona; productos que pueden permitir la aparición de picos adicionales dentro del cromatograma. En la hidrolisis básica se evidencia una alteración en el pico de interés de nuestro analito, pues se observa asimetría (tailing) en el pico y se evidencia un

ensanchamiento de banda del pico, como se observa en la figura 2, por lo que se sugiere mantener el extracto fuera del contacto con sustancias básicas que generen subproductos no deseados, tal como se muestra en el cromatograma donde aparecen dos picos con intensidades superiores a 30 mv en los tiempos de retención de 3,64 min y 4,60 min. Por último, no se evidencia solapamiento de otros picos con el pico del analito de estudio, sin embargo, para estudios posteriores sobre dicho analito se sugiere realizar extracciones y uso de fase móvil con pH cercanos a 7, para no generar asimetrías y garantizar resultados reproducibles que permitan una cuantificación por medio del área bajo la curva.



**Fig. 2:** Cromatograma obtenido al someter la muestra a hidrólisis básica con NaOH en reflujo por 1h a 80 °C.



**Fig. 3.** Cromatograma obtenido al someter la muestra a hidrólisis ácida con HCl en reflujo por 1h a 80 °C.

Por otra parte, a condiciones de oxidación, se observan diversos picos que no coinciden al compararlo con los cromatogramas resultantes de la corrida del extracto sin tratamiento externo. Adicionalmente, el pico de la diosgenina se puede observar con un ensanchamiento anómalo. Por esta razón, en caso de utilizar el presente método es recomendable proteger las muestras de condiciones que puedan llevarlo a la oxidación.

De igual forma, se variaron condiciones de manera controlada, condiciones como el flujo, y la fase móvil se observa variación notable en los tiempos de retención. El volumen de inyección y el flujo modificaron el área drásticamente. Se concluyó entonces que, el método no es robusto frente a dichas variaciones, por lo que se recomienda mantener y controlar las condiciones cromatográficas determinadas.

Teniendo en cuenta que las saponinas poseen una importante actividad antiinflamatoria mediada por la inhibición de la síntesis y liberación de sustancias proinflamatorias y con base en los resultados obtenidos por la cromatografía líquida de alta eficiencia con el detector UV/VIS, se puede decir que la extracción de la pulpa del fruto iguaraya de la planta cardón guajiro evidencia la posible presencia de diosgenina, sustancia con aporte farmacológico de tipo antiinflamatorio<sup>11-13</sup>.

**II. Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ).** Se usaron soluciones con concentraciones mínimas del analito (1,5 ppm, 3,5 ppm, 6 ppm, 8 ppm y 10 ppm) las cuales se inyectaron cada una por triplicado y se elaboró una curva de calibración con dichas concentraciones versus las áreas promedio encontradas.

Se realizó mediante la preparación de cinco diluciones en un rango de concentraciones de 1,5 a 10 ppm, para determinar el área bajo la curva al tiempo de retención específico, para cada muestra y de esta manera poder realizar la curva de calibración, analizando el coeficiente de correlación, coeficiente de determinación, error típico y  $R^2$ . Los resultados se muestran en la tabla 4.

**Tabla 4.** Concentraciones para curva de calibración vs. área promedio para determinar LOD y LOQ.

Concentración (ppm)	Área promedio
1,50 esta	96,11
3,50	231,58
6	409,09
9	557,44
10	671,98

Por medio de la ecuación de la recta para curva y el error típico, se obtiene un LOD de 0,66 ppm y un LOQ de 2,44 ppm.

## Conclusiones

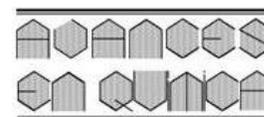
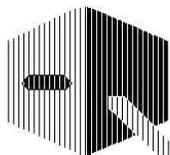
En cuanto a la separación y cuantificación de diosgenina por cromatografía líquida de alta eficiencia se determinó que en fase reversa y con las condiciones adecuadas se puede lograr obtener resultados con sensibilidad, exactitud, precisión, robustez y resolución. Se encontró que el extracto con metanol de la pulpa de la iguaraya contiene una concentración de diosgenina de 36,36 ppm.

La validación del método de extracción presentó una precisión con un RSD menor a 2% y una exactitud con un porcentaje de recuperación promedio de 98%; se obtuvo un límite de detección de 0,65 ppm y un límite de cuantificación de 2,40 ppm. Adicionalmente, el modelo de regresión lineal obtenido en la curva de calibración presentó un coeficiente de correlación de 0,99; lo cual permite garantizar confiabilidad del método para la determinación de la concentración de este analito. Sin embargo, cabe

aclearar que es necesario adelantar estudios de elucidación estructural del analito aislado para verificar su presencia.

## Referencias

1. S Hurtado Alba. Análisis composicional del fruto desértico Iguaraya (*Opuntia Stricta*, *Stenocereus*, *Griseus*) para la evaluación de diferentes alternativas de diseño de productos de interés. Trabajo de grado de pregrado. Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia (2019).
2. HS Hassan, IM Sule, MA Musa, YK Musa SM Abubakar, SA Hassan. Anti-inflammatory activity of crude saponin extracts from five Nigerian medicinal plants. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines** **9(2)**, 250–255 (2012).
3. H Wang, J Gao, J Kou, D Zhu, B Yu. Anti-inflammatory activities of triterpenoid saponins from *Polygala japonica*. **Phytomedicine** **15(5)**, 321–326 (2008).
4. R Hernández, EC Lugo, L Díaz, S. Villanueva. Extracción y cuantificación indirecta de las saponinas de agave lechuguilla Torrey extraction and indirect quantification of saponins from the agave lechuguilla Torrey. **e-Gnosis** **(3)**, 1-9 (2005).
5. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of analytical procedures: text and methodology q2(r1). En: *International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use*. 1994: 1–17.
6. CY Cheok, HAK Salman, R Sulaiman. Extraction and quantification of saponins: A review. **Food Research International**, **59**, 16–40 (2014).
7. SX Angulo Alvarez, LP Jaimes García. Desarrollo de un método de análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC-DAD) para la caracterización de especies de la familia Asteraceae. Trabajo de grado de pregrado. Universidad de Ciencia Aplicadas y Ambientales, Bogotá, Colombia (2019).
8. DA Skoog, FJ Holler, SR Crouch. Principios de análisis instrumental. Editorial Cengage Learning Editores (2008).
9. EL Ávila, J Guevara-Pulido. Development of a RP-HPLC Method for Separating and Quantifying Muscimol in Different Developmental Stages of the Fungus *Amanita muscaria*. **Journal Chemistry** **2020**, (2020).
10. O Quattrocchi, S Abelaira de Andrizzi, R Laba. Introducción al HPLC. Aplicación y Práctica - Quattrocchi; Andrizzi; Laba. Editorial Artes gráficas Farro SA (1992).
11. L Rojas, C Jaramillo, M Lemus. Métodos analíticos para la determinación de metabolitos secundarios de plantas. Universidad Técnica Machala, Ecuador (2015).
12. L Qi, QT Yu, P Li, SL Li, YX Wang, LH Sheng et al. Quality evaluation of Radix Astragali through a simultaneous determination of six major active isoflavonoids and four main saponins by high-performance liquid chromatography coupled with diode array and evaporative light scattering detectors. **Journal of Chromatography A**, **1134(1-2)**, 162–169 (2006).
13. ZY Qu, HC Wang, YP Jin, YL Li, YP Wang. Isolation, identification, and quantification of triterpene saponins in the fresh fruits of *Panax notoginseng*. **Natural Product Research**, **36 (20)**, 5319–5329 (2022).



# Caracterización estructural por métodos espectroscópicos y difracción de rayos-X de un nuevo compuesto hidantoina

José L. Fonseca, Asiloé J. Mora, Gerzon E. Delgado\*

Laboratorio de Cristalografía, Departamento de Química, Facultad de Ciencias,  
Universidad de Los Andes, Mérida 5101, Venezuela

(\*) [gerzon@ula.ve](mailto:gerzon@ula.ve)

Recibido: 15/07/2023

Revisado: 22/08/2023

Aceptado: 28/08/2023

## Resumen

El compuesto 1,5,5-trimetil-hidantoina, con fórmula  $C_6H_{10}N_2O_2$ , ha sido recristalizado y caracterizado estructuralmente mediante las técnicas FT-IR, RMN, y difracción de rayos-X. Los resultados espectroscópicos son consistentes con el esqueleto de la molécula hidantoina. El patrón de difracción de rayos-X en polvo confirma la pureza de la muestra cristalina. El análisis por difracción de cristal único indica que el compuesto cristaliza en el grupo espacial tetragonal  $I4/m$  ( $N^\circ 87$ ),  $Z=8$ , y parámetros de celda unidad  $a=15.554(2)$  Å,  $c=6.623(6)$  Å,  $V=1602.0(3)$  Å<sup>3</sup>. Este grupo espacial, con alta simetría, es muy raro de encontrar en moléculas puramente orgánicas. En este caso todo el anillo hidantoina se encuentra en un plano especular  $m$  en la unidad asimétrica lo que aumenta la simetría del cristal. El empaquetamiento cristalino se estabiliza mediante la formación de interacciones intermoleculares del tipo de enlace de hidrógeno del tipo  $N-H\cdots O$  entre los anillos de hidantoina vecinos. Además, la estructura cristalina presenta la formación de enlaces de hidrógeno no convencionales más débiles del tipo  $C-H\cdots O$ . Estos enlaces de hidrógeno dan lugar a la formación de estructuras supramoleculares formando anillos de 8, 24 y 36 miembros descritas por los grafos  $R^2_2(8)$ ,  $R^4_4(24)$  y  $R^8_8(36)$ , respectivamente.

**Palabras claves:** hidantoina; estructura cristalina; difracción de rayos-X

## Abstract

**Structural characterization by spectroscopic methods and X-ray diffraction of a new hydantoin compound.** The compound 1,5,5-trimethyl-hydantoin, with formula  $C_6H_{10}N_2O_2$ , has been recrystallized and structurally characterized by FT-IR, NMR, and X-ray diffraction techniques. Spectroscopy results are consistent with the skeleton structure of the hydantoin compound. The powder X-ray diffraction data confirm the phase purity of the crystalline sample. Single-crystal X-ray diffraction analysis indicated that crystallizes in the tetragonal space group  $I4/m$  ( $N^\circ 87$ ),  $Z=8$ , and unit cell parameters  $a=15.554(2)$  Å,  $c=6.623(6)$  Å,  $V=1602.0(3)$  Å<sup>3</sup>. This space group is very rare to find in purely organic molecules. In this case, all the hydantoin ring lies on a mirror plane  $m$ , in the asymmetric unit, which increases the symmetry of the crystal. The crystalline packing is stabilized by the formation of intermolecular interactions of the strong hydrogen bond type of the  $N-H\cdots O$  between the neighboring hydantoin rings. In addition, the crystalline structure presents the formation of weaker unconventional hydrogen bonds of the  $C-H\cdots O$  type. These hydrogen bonds give rise to the formation of 8, 24, and 36-membered ring-type supramolecular structures described by the graphs  $R^2_2(8)$ ,  $R^4_4(24)$ , and  $R^8_8(36)$ , respectively.

**Keywords:** Hydantoin; Crystal structure; X-ray diffraction

## Introducción

Los compuestos heterocíclicos conocidos como hidantoinas constituyen una clase importante de compuestos orgánicos heterocíclicos que tienen un uso frecuente en una multitud de productos farmacéuticos debido a la diversidad de propiedades bioquímicas y farmacológicas que poseen<sup>1-3</sup>.

También conocidas como imidazolidina-2,4-dionas son compuestos con un anillo imidazol que posee grupos ceto en las posiciones 2 y 4, formando un núcleo altamente reactivo con cuatro posibles puntos de sustitución.

Los compuestos que contienen hidantoina exhiben un amplio espectro de actividades farmacológicas y biológicas tales como anticancerígeno, antiinflamatorio, antidiabético, antimicrobia-

no, anticonvulsivo, anti-VIH, y actividades antiplaquetarias<sup>4,5</sup>. Algunos de los compuestos farmacológicos más representativos que poseen el núcleo hidantoina son la fenitoína, mefenitoína, etotoína y fosfenitoína utilizados como anticonvulsivos. La nitrofurantoína y dantrium usados como relajantes musculares. La nilutamida y enzalutamida utilizados como antagonista de receptor androgénico<sup>6,7</sup>.

Un grupo particular de estos heterociclos lo constituyen las hidantoinas 5,5 sustituidas, hidantoinas cuaternarias, las cuales pueden presentar actividad óptica importante. Por ejemplo, la hidantoina BIRT-377, (5*R*)-5-[(4-bromofenil)metil]-3-(3,5-diclorofenil)-1,5-dimetil-hidantoina, actúa como antagonista del antígeno 1 asociado a la función linfocitaria conocido por sus

siglas en inglés LFA-1<sup>8</sup>, y la (+)-hidantocidina es un potente herbicida natural<sup>9</sup>.

A pesar del pequeño tamaño de la molécula hidantoina, estos heterociclos se utilizan frecuentemente en química combinatoria debido a su núcleo reactivo, dado que poseen grupos donantes de enlaces de hidrógeno (NH de dos anillos) y átomos aceptores (dos carbonilos CO), adecuados para formar arquitecturas supramoleculares a través de enlaces de hidrógeno. Los enlaces de hidrógeno, como interacciones inter e intramoleculares, desempeñan un papel clave en el reconocimiento molecular y la ingeniería de cristales<sup>10,11</sup>.

En este trabajo se describe la caracterización estructural del compuesto 1,5,5-trimetil-hidantoina como continuación de nuestros estudios estructurales de pequeñas moléculas biológicamente activas con potenciales actividades farmacéuticas<sup>12-16</sup>.

### Parte experimental

La cristalización del compuesto 1,5,5-trimetil-hidantoina (Aldrich 98%) se llevó a cabo disolviendo 100 mg de la hidantoina en metanol caliente (Aldrich 99,8%), seguido de una lenta evaporación del solvente en un lugar estable hasta la precipitación de cristales con el tamaño adecuado para el análisis de difracción de rayos X. Luego de algunas semanas se obtuvieron cristales incoloros en forma de pequeños bloques con dimensiones entre 0,20 y 0,40 mm. Punto de fusión: 162-164°C.

El punto de fusión se midió en un aparato Electrothermal modelo 9100. El espectro infrarrojo (FT-IR) se midió en un equipo Perkin-Elmer 1600 en pastillas de KBr. Los espectros de resonancia magnética nuclear RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C, se obtuvieron en un espectrómetro Bruker Avance DRX 400, utilizando DMSO. Los datos de difracción de rayos-X en muestra policristalina se registraron en un difractómetro Siemens D5005 utilizando radiación de CuK $\alpha$  ( $\lambda = 1.5418$  Å). Los datos se colectaron en un rango de 5-55° en 2 $\theta$  con pasos de 0,02° y un tiempo de 20 segundos por paso. Se utilizó silicio como estándar externo. La toma de datos de intensidad de difracción de rayos-X de cristal único se realizó, a temperatura ambiente, en un difractómetro Bruker SMART APEX II CCD, empleando radiación de Mo K $\alpha$  ( $\lambda = 0.71073$  Å). Los datos se corrigieron por efectos de polarización y absorción.

### Discusión de resultados

#### Difracción de rayos-X en monocristal (XRD)

La estructura cristalina de la 1,5,5-trimetil-hidantoina se determinó utilizando el método de fase intrínseca empleando el programa OLEX-2<sup>17</sup> y se refinó mediante cálculos de mínimos cuadrados de matriz completa utilizando el programa SHELXL<sup>18</sup>. Los átomos de hidrógeno se colocaron en posiciones calculadas y tratados usando un modelo rígido con distancias C-H 0,96-0,98 Å y U<sub>iso</sub>(H) = 1,2 U<sub>eq</sub>(C), O-H 0,82 U<sub>iso</sub>(H) = 1,2 U<sub>eq</sub>(O), N-H 0,86 Å y U<sub>iso</sub>(H) = 1,2 U<sub>eq</sub>(N)].

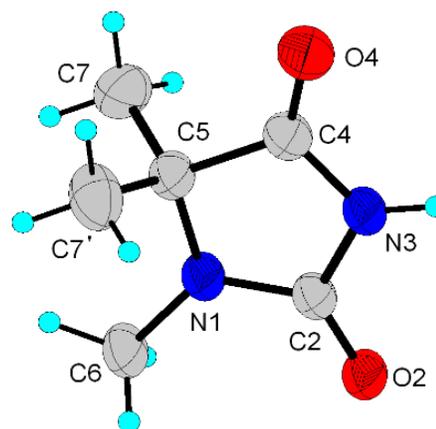
Los datos cristalográficos aquí reportados se depositaron en la base de datos Cambridge Crystallographic Data Centre<sup>19</sup> (No. de depósito CCDC: 2096755).

En la tabla 1 se muestran los datos cristalográficos para la 1,5,5-trimetil-hidantoina. Los parámetros de celda concuerdan muy bien con los encontrados con difracción en muestra policristalina, lo cual es un indicativo de la homogeneidad de la muestra cristalizada.

**Tabla 1.** Datos cristalográficos de la 1,5,5-trimetil hidantoina obtenidos por difracción de rayos-X de monocristal.

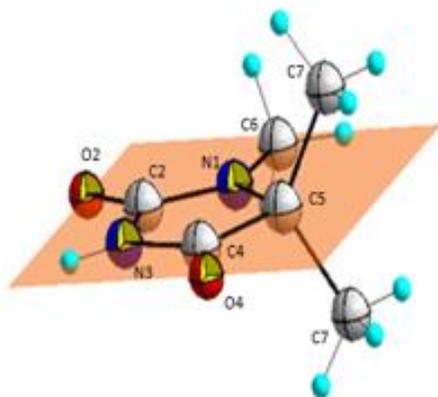
Fórmula	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	CCDC	2096755
Peso molecular	142.16		
Sistema cristalino	Tetragonal	Rango en 2 $\theta$	1.9 – 28,8
Grupo espacial	<i>I</i> /4 <i>m</i> (N° 87)	D <sub>calc</sub> (g/cm <sup>3</sup> )	1,179
a (Å)	15,554 (2)	Mu(MoKa) (mm)	0,090
c (Å)	6,623(6)	F(000)	608
Volumen (Å <sup>3</sup> )	1602,0(3)	Refl. únicas (R <sub>int</sub> )	1114 (0.021)
Z	8	R(F <sup>2</sup> ) [I > 2 $\sigma$ (I)]	0,0455
Temperatura (K)	293	wR(F <sup>2</sup> ) [I > 2 $\sigma$ (I)]	0,1604
Radiación (Å)	MoKa (0,71070)	S	1,07

El compuesto 1,5,5-trimetil-hidantoina cristaliza en una celda tetragonal con grupo espacial centrosimétrico *I*4/*m* (N°87) y 8 unidades fórmula por celda unidad (Z=8). En la figura 1 se muestra la estructura molecular del compuesto. Los elipsoides se dibujaron con una probabilidad del 35% y los átomos de hidrógeno se muestran como esferas con radio arbitrario. La unidad asimétrica está conformada por un anillo heterocíclico de cinco miembros con dos grupos ceto en las posiciones 2 y 4, dos nitrógenos en las posiciones 1 y 3, y un carbono en la posición 5. El anillo hidantóico está sustituido en las posiciones 1,5,5 por grupos metilo.



**Fig. 1:** Unidad asimétrica de la 1,5,5-trimetil-hidantoina.

Los átomos O2, O4, N1, N3, C2, C4, C5 y C6 están en la posición especial de Wyckoff 8h, lo que indica que todos estos átomos descansan en un plano especular *m* tal como se muestra en la figura 2. El metilo enlazado al carbono 5 (C7) forma un ángulo de 56,48(2)° con el plano especular *m* y por reflexión ge-



**Fig. 2:** Conformación plana que adopta el anillo de la 1,5,5-trimetilhidantoina.

nera el segundo grupo metilo unido al carbono 5 ( $C7'$ ), mientras que el metilo unido al nitrógeno 1 ( $C6$ ) descansa sobre el plano del anillo.

Todas las distancias de enlace, ángulos de enlace y ángulos de torsión se ajustan al rango de valores normales reportados en la base de datos de Cambridge (versión 5.44, Abril 2023)<sup>19</sup> para 77 estructuras con anillos hidantóico, con grupo NH sin sustitución e hibridación  $sp^3$  en el carbono 5. El empaquetamiento cristalino de la 1,5,5-trimetilhidantoina, está conformado por interacciones de enlace de hidrógeno del tipo  $N-H\cdots O$  y  $C-H\cdots O$ , cuyos parámetros geométricos se resumen en la tabla 2. La estructura supramolecular se puede describir mediante tres tipos de grafos cíclicos<sup>20</sup>. El primer grafo corresponde a un dímero descrito por el grafo  $R_2^2(8)$  mostrado en la Figura 3; el cual indica la formación de un ciclo constituido por 8 miembros en donde están involucrados 2 átomos donadores y 2 aceptores de enlaces de hidrógeno. Este tipo de dímero se ha reportado en otras hidantoinas como la 5,5-dimetilhidantoina<sup>21</sup>, 1-metilhidantoina<sup>22</sup> y la 5-metil-5-fenilhidantoina<sup>23</sup>. En el centro de estos dímeros existe un centro de inversión, por lo que ambas moléculas están relacionadas por esta operación de simetría.

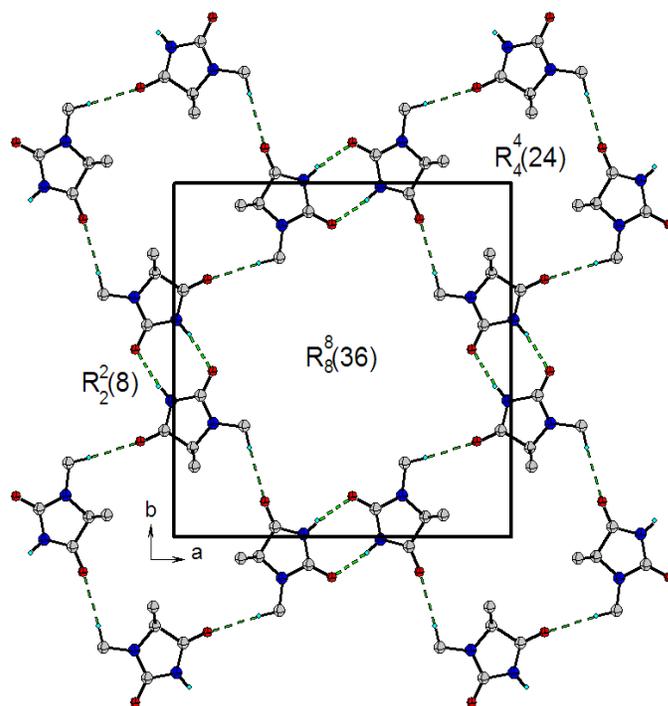
Adicionalmente, estas interacciones forman otros dos tipos de grafos. Un grafo del tipo  $R_4^4(24)$  que involucra 4 hidantoinas y un grafo  $R_8^8(36)$  que involucra 8 moléculas de hidantoina, respectivamente. Finalmente, la combinación de estas interacciones produce una capa de moléculas conectadas por una red de enlaces de hidrógeno bidimensional perpendicular al eje  $c$  (figura 3).

Curiosamente, la molécula cristaliza en un grupo espacial poco común ( $I4/m$ ) para estructuras puramente orgánicas con todos

**Tabla 2.** Parámetros geométricos de los enlaces de hidrógeno presentes en la 1,5,5-trimetil hidantoina.

D-H $\cdots$ A	D-H (Å)	H $\cdots$ A (Å)	D $\cdots$ A (Å)	D-H $\cdots$ A( $^\circ$ )
N3-H3 $\cdots$ O2 <sup>a</sup>	0,860	1,930	2,779(2)	171,0
C6-H6 $\cdots$ O4 <sup>b</sup>	0,960	2,500	3,457(3)	177,0

Código de simetría: <sup>a</sup>  $x, I-x, z$ ; <sup>b</sup>  $-x, I-x, I-y, z$ .

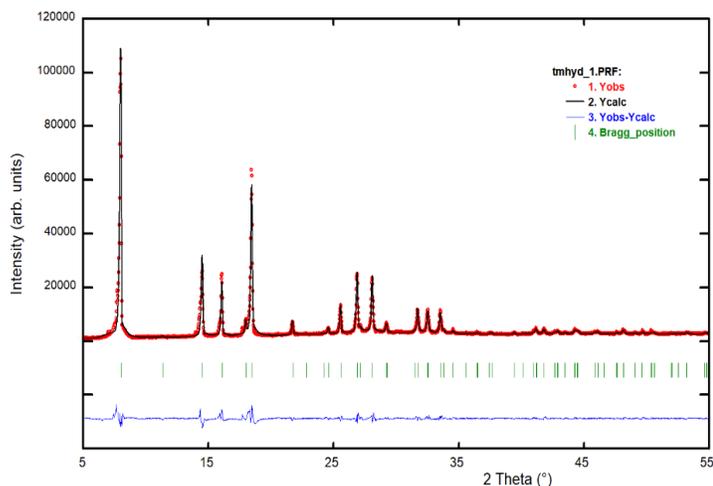


**Fig. 3:** Vista parcial del empaquetamiento cristalino de la 1,5,5-trimetilhidantoina en el plano  $ba$  mostrando las interacciones  $N-H\cdots O$  y  $C-H\cdots O$ , junto con los grafos formados.

los átomos del anillo hidantóico ubicados en una posición especial (8h) correspondiente a un plano especular ( $m$ ). Una búsqueda realizada en la última versión de la base de datos de Cambridge (versión 5.44, abril de 2023)<sup>19</sup>, indica un total de 1.238.169 estructuras reportadas de las cuales 684.707 (55,30%) son compuestos organometálicos o metal-orgánicos y 553.462 (44,70%) son materiales orgánicos. Además, 971.191 (78,44%) del total de estructuras cristalizan en grupos espaciales centrosimétricos y el resto lo hacen en 266.978 (21,56%) grupos no centrosimétricos. Respecto a estructuras que cristalizan en el grupo espacial  $I4/m$  ( $N^\circ 87$ ), se encontraron 81 resultados para estructuras orgánicas. Cuando la búsqueda se restringe a moléculas puramente orgánicas, sin especies no metálicas ni iónicas, se encuentran sólo 14 resultados. Son las estructuras con códigos: AZANUL, BEDWAL, CESPUL, FIYXOD, GAJCUS, KECYBU08, GOBFEJ, KUJLUX01, MIBHEM, POZHAQ, SOVKEU, TIZXOR, XEQCEE, XOZMIJ<sup>19</sup>, en todos los casos la molécula central se encuentra sentada en una posición especial (plano especular  $m$ ) en el sitio de Wyckoff (8h) como en el caso de la 1,5,5-trimetilhidantoina.

#### Difracción de rayos-X en muestras policristalinas (XRPD)

El patrón de difracción indica la presencia de una sola fase (Figura 4) y se indexó utilizando el programa Dicvol06<sup>24</sup>. La hidantoina cristaliza en una celda tetragonal con parámetros de celda  $a = 15.550(4)$  Å,  $c = 6.625(2)$  Å muy cercanos a los medidos con difracción de monocristal. La celda obtenida se refinó sin modelo estructural por el método de Le Bail<sup>25</sup> utilizando el programa Fullprof<sup>26</sup>. La figura 4 muestra el resultado

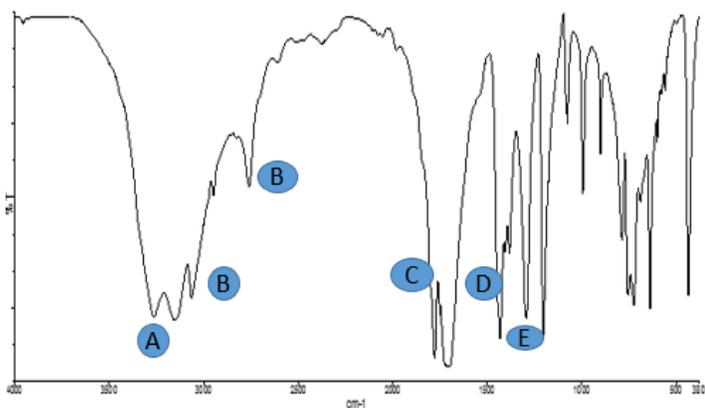


**Fig. 4:** Gráfica del ajuste final Le Bail para la 1,5,5-trimetil-hidantoina.

del refinamiento observándose un buen ajuste entre los patrones observado y calculado para la hidantoina. Las figuras de mérito del refinamiento fueron  $R_{exp} = 5,7$ ;  $R_p = 6,1$ ;  $R_{wp} = 7,2$ ;  $S = 1,3$ .

#### Espectroscopia Infrarroja (FT-IR)

En la figura 5 se observa el espectro FT-IR obtenido para la 1,5,5-trimetil-hidantoina. En el espectro se pueden apreciar las señales de vibración características de los grupos funcionales presentes. En la tabla 3 se resumen las bandas de absorción más significativas de dicho espectro.



**Fig. 5:** FT-IR espectro de la 1,5,5-trimetil-hidantoina.

**Tabla 3.** Asignación de las bandas de absorción infrarroja para la 1,5,5-trimetil hidantoina.

Banda	Frecuencia (cm <sup>-1</sup> )	Asignación	Tipo de vibración
A	3400-3300	N-H	Tensión
B	2947/2759	C-H	Tensión
C	1751/1713	C=O	Tensión
D	1432	N-H	Flexión
E	1292/1203	C-H	Flexión

La tensión correspondiente al grupo imida N-H (ubicado dentro de los dos grupos carbonilos) se puede encontrar en el rango de

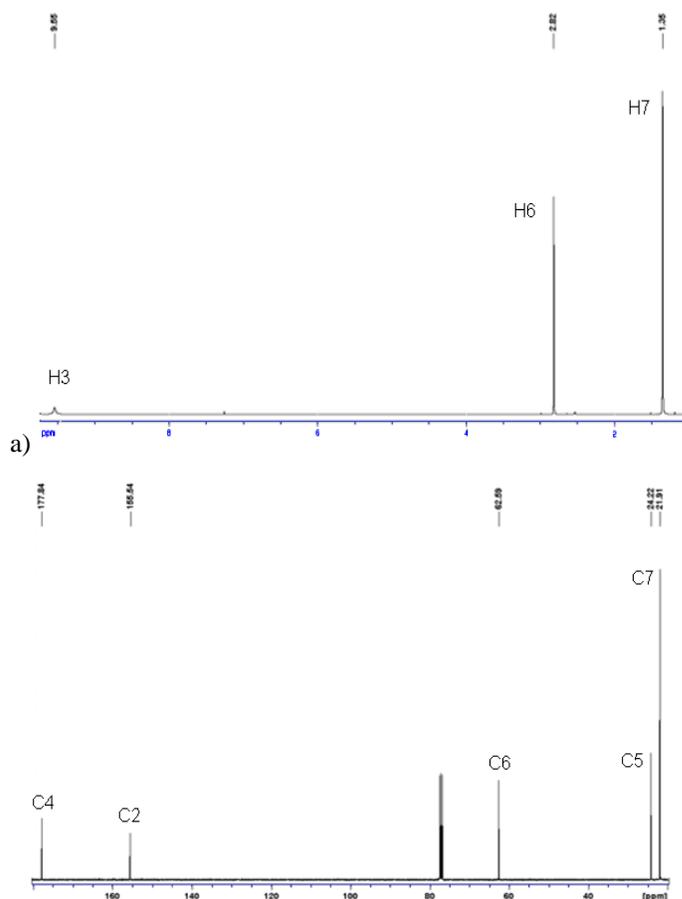
3400-3300 cm<sup>-1</sup>. Por otro lado, también se observan bandas de absorción que corresponden a vibraciones de tensión de los enlaces C-H de los grupos metilo (CH<sub>3</sub>), tanto asimétrico como simétrico en 2947 cm<sup>-1</sup> y 2759 cm<sup>-1</sup>, respectivamente, así como su flexión en el plano en 1292 y 1203 cm<sup>-1</sup>.

También se observa la señal de las bandas correspondiente a la vibración de tensión de los dos grupos carbonilo C=O del compuesto en 1751 cm<sup>-1</sup> y 1713 cm<sup>-1</sup>; la primera se debe al carbono carbonílico unido a un solo nitrógeno, mientras que la de menor frecuencia se debe al carbono carbonílico unido a los dos nitrógenos, ésta banda demuestra dos señales características una del carbonilo que tiene los dos nitrógenos vecinos sumado a la resonancia que corresponde a la formación del doble enlace entre el nitrógeno y el carbono por ello es ligeramente más ancha. Además, se aprecia la señal de flexión débil del grupo N-H a una frecuencia de 1432 cm<sup>-1</sup>. En la tabla III.1 se resumen las bandas de absorción más significativas de dicho espectro.

#### Resonancia magnética nuclear (RMN-<sup>1</sup>H y RMN-<sup>13</sup>C)

En la figura 5 se muestran los espectros RMN-<sup>1</sup>H (a) y RMN-<sup>13</sup>C (b) para la 1,5,5-trimetil-hidantoina. Se obtuvieron las siguientes señales de desplazamiento químico:

NMR-<sup>1</sup>H (400 MHz, CHCl<sub>3</sub>-d<sub>6</sub>) δ = 9,55 (s, 1H, N-H), 2,82 (s, 3H, N-CH<sub>3</sub>), 1,40 (s, 6H, C-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).



**Fig. 5:** Espectros RMN-<sup>1</sup>H (a) y RMN-<sup>13</sup>C (b) del 1,5,5 trimetil-hidantoina.

El espectro muestra tres señales atribuidas a los 3 tipos de hidrógenos. Se puede observar un singlete ancho de baja intensidad a campo bajo con un desplazamiento químico  $\delta H=9,55$  ppm cuya integral posee un valor igual a uno, esta señal se asigna al protón del grupo N-H. Se aprecia un singlete con un desplazamiento químico  $\delta H=2,82$  ppm, que integra para tres, asignado a los protones metilénicos. Finalmente se aprecia un singlete con un  $\delta H= 1,40$  ppm, que integra para seis y corresponde a los protones metilénicos.

NMR- $^{13}C$  (100,6 MHz,  $CHCl_3-d_6$ )  $\delta =177,8$  (C4), 155,0 (C2), 62,6 (C6), 4,2 (C5), 21,9 (C7).

El espectro presenta cinco tipos de señales lo que corresponde al número de carbonos presentes en la estructura. En 177,8 ppm aparece la señal correspondiente al carbono carbonílico C4. La señal del C2 aparece en 155,04 ppm y corresponde al carbono carbonílico del grupo ureido. La señal del carbono metílico C6 a 62,6 ppm el cual se encuentra unido al nitrógeno del anillo hidantóico, en 24,2 ppm aparece la señal correspondiente al carbono cuaternario C5 y finalmente en 21,9 ppm se encuentra una señal de mayor intensidad debida a dos carbonos metilénicos C7 los cuales se encuentran enlazados al carbono cuaternario.

El análisis espectroscópico permitió dilucidar el esqueleto molecular de la 1,5,5-trimetil-hidantoina.

## Conclusiones

El compuesto 1,5,5-trimetil-hidantoina se recristalizó utilizando la técnica de evaporación se solvente. Esta hidantoina cristaliza en el sistema tetragonal con grupo espacial  $I4/m$ , producto de alta simetría de la molécula de hidantoina que se ubica en un plano especular  $m$ . Los datos espectroscópicos, FT-IR y RMN, permitieron elucidar el esqueleto molecular del compuesto y fueron consistentes con los resultados estructurales. En la estructura cristalina, las moléculas están unidas por enlaces de hidrógeno convencionales  $N\cdots H\cdots O$  y no convencionales  $C\cdots H\cdots O$ , formando una red bidimensional descrita por el conjunto de grafos  $R^2_2(8)$ ,  $R^4_4(24)$  y  $R^8_8(36)$ .

## Agradecimientos

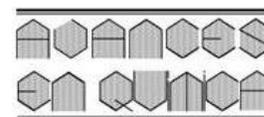
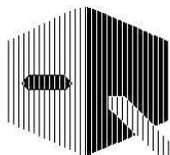
Este trabajo ha sido financiado gracias al CDCHT-ULA y al CONICIT (LAB-97000821).

## Referencias

1. C Avendaño López, G González Trigo. The chemistry of hydantoins. **Adv. Heter. Chem.**, **38(1)**, 177-228 (1985).
2. M Meusel, M Gütschow. Recent developments in hydantoin chemistry. A review. **Org. Prep. Proced. Int.**, **36(5)**, 391-443 (2004).
3. L Konnert, F Lamaty, J Martinez, E Colacino. Recent advances in the synthesis of hydantoins: The state of the art of a valuable scaffold. **Chem. Rev.** **117(23)**, 13757-13809 (2017).
4. KA Kochetkov, ON Gorunova, NA Bystrova. Biologically oriented hybrids of indole and hydantoin derivatives. **Molecules**, **28(2)**, 602 (18 páginas) (2023).
5. DE Shybanov, ME Kukushkin, YS Hrytseniuk, YK Grishin, VA Roznyatovsky, VA Tafeenko, DA Skvortsov, NV Zyk, EK Beloglazkina. [4+2]-cycloaddition to 5-methylidene-hydantoins and 5-methylidene-2-thiohydantoins in the synthesis of spiro-2-chalcogenimidazolones. **Int. J. Mol. Sci.**, **24(5)**, 5037 (17 páginas) (2023).
6. SH Cho, SH Kim, D Shin. Recent applications of hydantoin and thiohydantoin in medicinal chemistry. **Eur. J. Med. Chem.**, **164(2)**, 517-545 (2019).
7. S Wadghane, R Bhor, G Shinde, M Kolhe, R Pooja. A Review on the some biological activities of the hydantoin derivatives. **J Drug Delivery Ther.**, **13(1)**, 171-178 (2023).
8. NS Chowdari, CF Barbas. Total synthesis of LFA-1 antagonist BIRT-377 via organocatalytic asymmetric construction of a quaternary stereocenter. **Org. Lett.** **7(5)**, 867-870 (2005).
9. M Shiozaki. Syntheses of hydantocidin and C-2-thioxohydantocidin. **Carbohydr. Res.**, **337(21-23)**, 2077-2082 (2002).
10. GR Desiraju. Crystal engineering: A brief overview. **J. Chem. Sci.**, **122(5)**, 667-675 (2010).
11. T Steiner. The hydrogen bond in the solid state. **Angew. Chem. Int. Ed.**, **41(1)**, 48-76 (2002).
12. GE Delgado, AJ Mora, LE Seijas, R Almeida, C Chacón, L Azotla-Cruz *et al.* N-acetyl-5-isopropyl-2-tioxoimidazolidin-4-one: Synthesis, spectroscopic characterization, crystal structure, DFT calculations, Hirshfeld surface analysis and energy framework study, **J. Mol. Struct.**, **1219(1)**, 128630 (13 páginas) (2020).
13. GE Delgado, AJ Mora, LE Seijas, L Rincón, G Marroquin, J Cisterna *et al.* Combined DFT calculation, Hirshfeld surface analysis, and Energy framework study of non-covalent interactions in the crystal structure of (Z)-5-ethylidene-2-thiohydantoin determined by powder X-ray diffraction. **J. Mol. Struct.**, **1236(1)**, 130361 (11 páginas) (2021).
14. R Márquez, LM Belandria, M Guillen, T González, AJ Mora, GE Delgado. Síntesis y caracterización estructural del compuesto hidantoina de D,L-valina. **Av. Quím.**, **16(3)**, 49-55 (2021).
15. GE Delgado, C Chacón, G Marroquin, J Cisterna, I Brito. X-ray powder diffraction data for the two new polymorphs of 1-methylhydantoin. **Powder Diffr.**, **37(2)**, 108-114 (2022).
16. GE Delgado, AJ Mora, P Narea, C Chacón, G Marroquin, B Hernández *et al.* Synthesis, crystal structure, hydrogen bond patterns and Hirshfeld surface analysis of (S)-5-(4-hydroxybenzyl)-imidazolidine-2,4-dione. **J. Mol. Struct.**, **1250(1)**, 131757 (7 páginas) (2022).
17. O Dolomanov, LJ Bourhis, RJ Gildea, JAK Howard, H Puschmann. OLEX2: a complete structure solution, refinement, and analysis program. **J. Appl. Cryst.**, **42(2)**, 339-341 (2009).
18. GM Sheldrick. Crystal structure refinement with SHELXL,

**Acta Cryst., C71(1)**, 3-8 (2015).

19. CR Groom, IJ Bruno, MP Lightfoot. SC Ward. The Cambridge structural database. **Acta Cryst. B72**, 171-179 (2016).
20. MC Etter, JC MacDonald, J Bernstein. Graph-set analysis of hydrogen-bond patterns in organic crystals. **Acta Cryst., B46(2)**, 256-262 (1990).
21. RE Cassady, SW Hawkinson. Structure of 5, 5-dimethylhydantoin. **Acta Cryst., B38(5)**, 1646-1647 (1982).
22. M Puszynska-Tuszkano, T Grabowski, M Daszkiewicz, J Wietrzyk, B Filip, G. Maciejewska K K *et al.* Silver (I) complexes with hydantoins and allantoin: Syntesis, crystal and molecular structure, cytotoxicity and pharmacokinetics. **J. Inorg. Biochem., 105(1)**, 17-22. (2011).
23. GE Delgado, JA Rodríguez, AJ Mora, J Bruno Colmenárez, J Uzcátegui, C Chacón. Supramolecular structure of 5-methyl-5-phenyl hydantoin and hydrogen-bonding patterns in 5, 5'-substituted hydantoins. **Mol. Cryst. Liq. Cryst., 629(1)**, 96-104 (2016).
24. A Boultif, D Löuer. Powder pattern indexing with the dichotomy method. **J. Appl. Cryst., 37**, 724-731 (2004).
25. A Le Bail. Whole powder pattern decomposition methods and applications: A retrospection. **Powder Diffr., 20**, 316-326 (2005).
26. J Rodriguez-Carvajal. FULLPROF, versión 7.95, LLB, CEA-CNRS, France, 2023.



# Actividad antineoplásica de la ríproximina, una proteína citotóxica inactivadora de ribosomas tipo II – Una revisión

Antônio Rony da Silva Pereira Rodrigues\*

Centro de Ciencia y Tecnología, Universidad Estatal de Ceará, Fortaleza, Brasil

(\*) [ronny346silva@gmail.com](mailto:ronny346silva@gmail.com)

Recibido: 04/05/2023

Revisado: 25/07/2023

Aceptado: 31/07/2023

## Resumen

El estudio presenta una síntesis del conocimiento a través de los hallazgos en la literatura sobre la ríproximina y su actividad antineoplásica, basada en una revisión en las bases de datos Embase, Scopus, PubMed-Medline y Web of Science. Mediante la aplicación de criterios de selección, se seleccionaron 9 estudios, que después de ser analizados, forman parte de la revisión. Los estudios sobre la ríproximina son escasos pero en algunos se ha informado sobre la actividad antineoplásica contra las líneas celulares de cáncer de hígado y en la cepa Suit2-007 de adenocarcinoma pancreático, lo que demuestra el potencial antineoplásico, por lo cual se necesita información sobre la aplicación de la proteína en terapias contra el cáncer para proponer una nueva clase de terapias antineoplásicas.

**Palabras claves:** bioquímica; inhibidores de la síntesis de proteínas; neoplasias

## Abstract

**Antineoplastic activity of ríproximin, a type II ribosome-inactivating cytotoxic protein – A review.** The study presents a synthesis of knowledge through the findings in the literature about Ríproximin and its antineoplastic activity. This is based on a review in the Embase, Scopus, PubMed-Medline and Web of Science databases. Through the application of selection criteria, 9 studies were selected, which after being analyzed, are part of the review. The studies about the ríproximin are scarce, but some have reported the antineoplastic activity against liver cancer cell lines and in the Suit2-007 strain of pancreatic adenocarcinoma, demonstrating the antineoplastic potential. Information on the application of the protein in anticancer therapies is needed to propose a new class of antineoplastic therapies.

**Keywords:** Biochemistry; Inhibitors of protein synthesis; Neoplasms

## Introducción

El cáncer es una de las enfermedades que causa más muertes en el mundo, requiriendo grandes inversiones para el tratamiento e investigación de nuevas formas de tratar esta enfermedad. Según datos del Observatorio Global del Cáncer (GCO) (<https://gco.iarc.fr>), organismo vinculado a la Organización Mundial de la Salud (OMS), entre los años 2020 a 2040, estimó que se producen 10,9 millones de nuevos casos de cáncer en todo el mundo, alcanzando el récord de 30,2 millones de casos en 2024, lo que supone un incremento del 54,6% respecto a los casos para 2020<sup>1</sup>.

Con el fin de desarrollar nuevos fármacos y terapias para el tratamiento de tumores cancerosos, los investigadores han volcado su investigación con compuestos naturales y bioquímicos en la búsqueda de tecnologías para el tratamiento del cáncer. Se destacaron las aplicaciones de compuestos como la punicalagina, compuestos presentes en *Punica granatum* (granada) y la proteína ríproximina<sup>2</sup>.

Las proteínas inactivadoras de ribosomas (Rips) se están abordando ampliamente para estudios sobre la lucha contra patologías animales y vegetales. Las proteínas inactivadoras

de ribosomas pertenecen a una categoría de proteínas que actúan con actividades celulares para inhibir la síntesis de proteínas de los ribosomas. Las N-glicosilasas actúan dañando los ribosomas, eliminando los residuos de adenina del ARN ribosómico<sup>3-6</sup>.

Las proteínas inactivadoras de ribosomas tipo II consisten en dos cadenas polipeptídicas unidas entre sí por un enlace disulfuro<sup>7</sup>. La proteína 58-63-kDa identificada en la especie *Ximenia americana* fue nombrada Ríproximina (Rpx), recibiendo este nombre porque tiene actividad inactivadora de los ribosomas y porque su origen es de la planta *X. americana*<sup>8,9</sup>.

El modelado molecular de la proteína Rpx se realizó mediante análisis de péptidos y secuencias de ADN, que mostraron similitud con otros miembros del grupo de proteínas inactivadoras de ribosomas tipo II, especialmente con el subgrupo tóxico, teniendo como parientes cercanos ricina, ebulina, lectina de viscumina I y negrina b<sup>9,10</sup>.

La expansión del conocimiento sobre la proteína Rpx como agente antineoplásico es esencial para difundir las acciones de la proteína y ayudar en la investigación que puede ayudar

en la formulación de nuevos medicamentos y terapias contra el cáncer. Este trabajo busca proporcionar datos a través de una revisión exhaustiva de la literatura, con el fin de promover el conocimiento sobre las acciones inactivadoras de los ribosomas y la actividad antineoplásica de la ríproximina.

## Procedimiento metodológico

### Tipo de estudio

El presente estudio es una revisión integradora de la literatura (RI). Las revisiones integradoras permiten sintetizar la investigación y obtener información sobre el tema. Para realizar una RI, son necesarios estándares de rigor, claridad y replicación de los estudios obtenidos en las bases de datos primarias para asegurar la calidad del estudio<sup>11</sup>.

A fin de lograr el objetivo propuesto, se siguieron medidas esenciales para la elaboración de un examen integrador, a saber: la identificación del tema; definición de los criterios de admisibilidad; identificación de los estudios en las bases científicas; calificación de los estudios seleccionados y análisis crítico; evaluación e interpretación de los resultados y presentación de los datos<sup>12</sup>.

### Estrategia de búsqueda

Para la revisión, se seleccionaron artículos indexados en las fuentes primarias de investigación Scopus (<https://www.scopus.com>), Embase (<https://www.embase.com>), MedLine/PubMed ([www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed)) y Web of Science (<https://webofscience.com>), que evaluaron métodos de extracción, purificación y la actividad antineoplásica de la ríproximina. La búsqueda de artículos se realizó a través del conjunto de términos: “ríproximina” AND (“extração” OR “remoção”) AND (“purificação”) AND (“atividade antineoplásica” OR “ação anticancerígena”) e “ríproximin” AND (“extraction” OR “removal”) AND (“purification”) AND (“antineoplastic activity” OR “anticancer action”).

### Criterios de inclusión y exclusión de los estudios

En la selección de artículos, se aplicaron los siguientes criterios de inclusión: (I) Artículos que evalúan la capacidad antineoplásica de ríproximina; (II) Artículos disponibles en su totalidad; (III) Artículos en cualquier idioma; (IV) Estudios publicados en las últimas dos décadas (2003-2023). Los criterios de exclusión fueron: (I) Artículos duplicados; (II) Artículos cuyo contenido no esté relacionado con el tema de investigación; (III) Estudios fuera del diseño temporal propuesto; (IV) Artículos no disponibles en su totalidad; (V) Editoriales, tesis, disertaciones y monografías, libros y capítulos de libros, resúmenes y trabajos publicados en anales de eventos

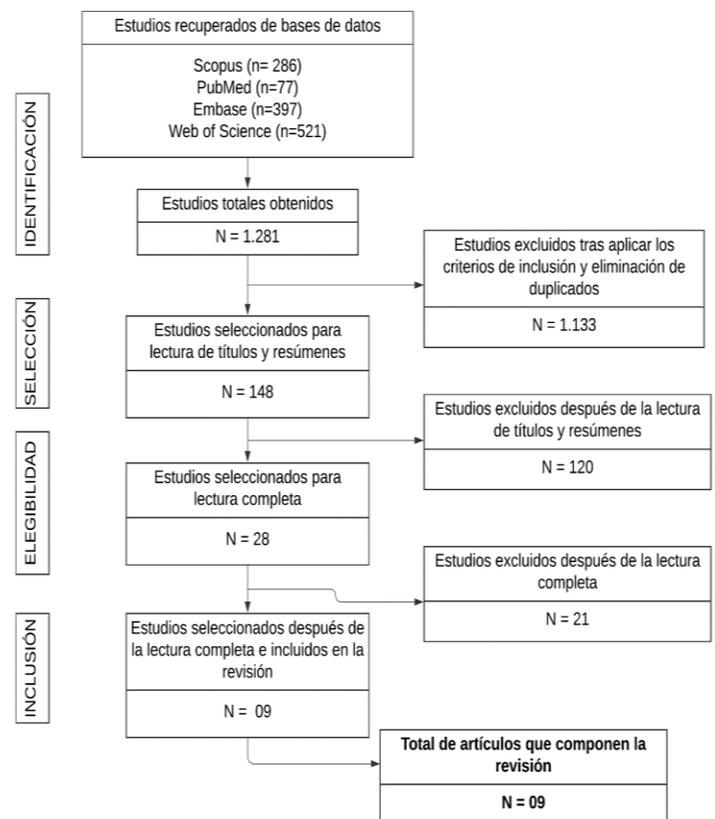
### Selección y comparación de datos

Los estudios recuperados en las bases de datos se sometieron inicialmente a una selección de marco de tiempo, después de lo cual los datos obtenidos tuvieron su RIS (*Reference Manager*) exportado y agregado al *software* libre Rayyan (<https://www.rayyan.ai/>), según lo propuesto por Ouzzani *et al.*<sup>13</sup> (2016), para la eliminación de duplicados, en caso de estudios duplicados, se dio preferencia a la inclusión del estudio encontrado primero, independientemente de la base de datos indexada.

En la siguiente etapa, se analizaron el título y el resumen, y se rechazaron los estudios que no cumplieron con los criterios de inclusión, y luego se accedió a los estudios en su totalidad para su evaluación. Los artículos seleccionados están organizados en una hoja de cálculo de Microsoft Excel, que contiene autor, año, revista, línea celular de cáncer evaluada y observaciones sobre el estudio.

## Resultados

Un total de 1.281 estudios fueron recuperados de las bases de datos. Después de aplicar el marco de tiempo, aplicar los criterios de inclusión, eliminar duplicados, leer los títulos y resúmenes y leer en su totalidad, se seleccionaron nueve estudios que forman parte de la revisión. La estrategia de búsqueda se muestra en la figura 1. El elevado número de artículos duplicados se justifica debido a que Scopus y Embase son del grupo Elsevier, teniendo en ambas bases de datos las mismas revistas indexadas, en lo que se refiere a la exclusión de otros artículos se explica debido al elevado número de estudios que sólo describen ríproximina, y no reporta actividades biológicas ni trata otras sustancias con actividad antineoplásica. La caracterización de los estudios que componen la revisión se muestra en la tabla 1.

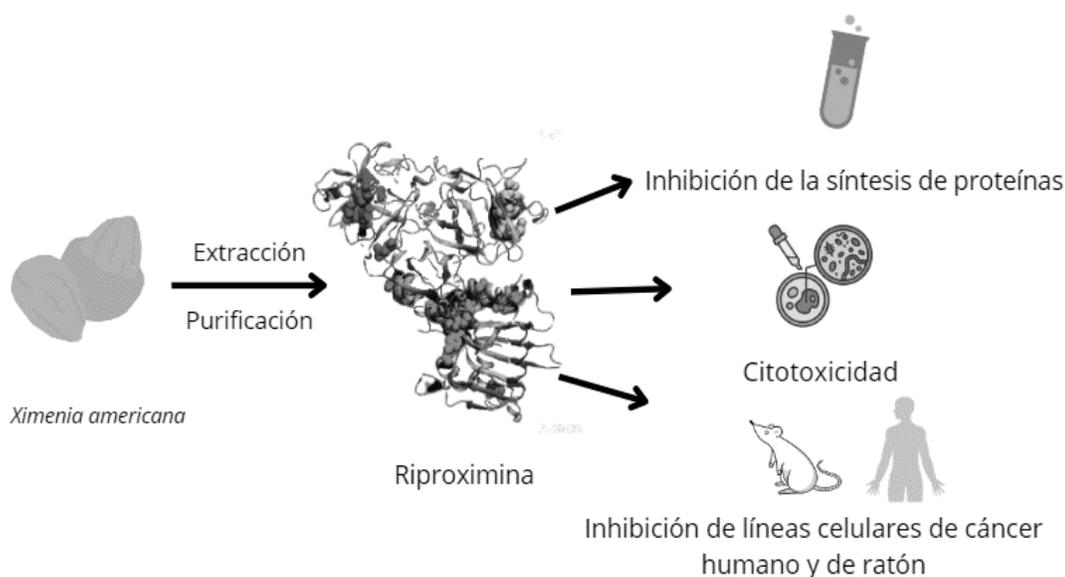


**Fig. 1:** Diagrama de flujo de la estrategia de búsqueda y resultados en las bases de datos. Fuente: Elaboración propia

**Tabla 1.** Caracterización de los estudios que componen la revisión.

Nº	Autor y año	Periódico	Línea celular	Observaciones
1	Pervaiz <i>et al.</i> <sup>14</sup> (2022)	J. Cancer Res. Clin. Oncol.	CC531 (colorrectal)	La riproximina indujo efectos antiproliferativos significativos en un formato dependiente de la concentración y el tiempo
2	Sagini <i>et al.</i> <sup>15</sup> (2020)	Front. Pharmacol.	PDAC Suit2-007 (páncreas)	La rpx tiene el potencial de disminuir la expresión de genes, que han mostrado una regulación positiva significativa en un modelo de ratón de progresión de PDAC
3	Murtaja <i>et al.</i> <sup>16</sup> (2018)	Oncol. Lett.	ASML (páncreas)	La rpx causó una inhibición del crecimiento del 50% (IC <sub>50</sub> ) a una concentración de 65 pM después de 24 h.
4	Pervaiz <i>et al.</i> <sup>17</sup> (2016)	J. Cancer Res. Clin. Oncol.	MDA-MB-231 e MCF-7 (seno)	La riproximina actúa sobre la modulación de las cascadas de señalización, causando efectos citostáticos y apoptóticos sobre las células de cáncer de mama
5	Pervaiz <i>et al.</i> <sup>18</sup> (2015)	Int. J. Oncol.	SW480 e SW620 (colon)	La rpx induce efectos antiproliferativos e inhibe la formación de colonias por exposición
6	Adwan <i>et al.</i> <sup>19</sup> (2014)	Cancer Biol. Ther.	MIA PaCa (páncreas)	El mecanismo de acción de la rpx implica la modulación de cadenas de señalización apoptóticas
7	Horrix <i>et al.</i> <sup>10</sup> (2011)	Cell. Mol. Life Sci.	MDA-MB-231 (seno) e HCT116 (colon)	La riproximina depurina el ARNr 28S e induce la expresión del gen UPR
8	Voss <i>et al.</i> <sup>9</sup> (2006)	The FASEB Journal	CC531-lacZ (Colon)	La riproximina inhibió la síntesis de luciferasa en un ensayo de transcripción <i>in vitro</i>
9	Saenger <i>et al.</i> <sup>20</sup> (2004)	J. Cancer Res. Clin. Oncol.	CC531 (hígado)	Depuración de un residuo específico de adenina a partir del ARNr 28S

Fuente: elaboración propia

**Fig. 2:** Aspectos generales sobre la riproximina y sus actividades biológicas

## Discusión

El estudio de la riproximina describe diferentes aspectos sobre esta proteína, que proviene del proceso de extracción y purificación, a las actividades biológicas contra las líneas celulares cancerosas. El resumen gráfico de la figura 2 aclara los aspectos que se presentarán a continuación.

### Proteína riproximina

La riproximina a es una proteína dividida en dos unidades (heterodímero), que tiene dos cadenas polipeptídicas llamadas cadenas A (dominio activo) y B (interacción celular), unidas por un puente disulfuro intermolecular, para la internalización y los efectos posteriores. La cadena A de Rpx así como

otras proteínas inactivadoras de ribosomas es responsable de la actividad catalítica, mientras que la cadena B tiene propiedades de lectina especificadas, siendo responsable de la unión a glicanos en la superficie celular<sup>21,22</sup>.

La secuencia proteica de la rioximina contiene variaciones de aminoácidos, que resultan del polimorfismo del nucleótido único en 28 posiciones. En comparación con otras proteínas inactivadoras de ribosomas tipo II, como la ricina y la lectina de visco I, como el modelado de estructuras 3D, solo 10 aminoácidos están involucrados en la función de las proteínas. la variación ASN/THR en la posición 159 podría servir como un sitio de glicosilación en la cadena de rioximina A<sup>16</sup>.

#### *Extracción y purificación de rioximina de Ximenia americana*

Pocos estudios describen el proceso de extracción y purificación de la rioximina de la *Ximenia americana*. El principal estudio que evidencia y sirve como base de estudio para otros investigadores, son los estudios de Bayer *et al.*<sup>24</sup> (2012), los autores obtuvieron la proteína a través de huesos de fruta de *X. americana*. En la extracción se rompieron las almendras de *X. americana* y 10 g de almendras se homogeneizaron en 50 ml de Tris-HCl tampón 20 mM, pH 7.0, y se centrifugaron (4000 g, 4 °C, 10 min), para la separación de la capa grasa, la eliminación de lípidos se produjo con el uso de disolventes orgánicos, como cloroformo, éster acético y n-heptano.

Para la purificación de la rioximina se llevan a cabo dos fases: pre-purificación y purificación. En la pre-purificación, el extracto acuoso se insertó en resina pre equilibrada y se lavó la solución tampón Tris-HCl 20 mM, pH 7.0. Se eluyeron fracciones con rioximina para aumentar la concentración de sal hasta 500 mM de NaCl. La purificación sigue el procedimiento descrito para la rioximina de material vegetal<sup>14</sup>, utilizando lactosil-sefarosa equilibrada con tampón Tris-HCl 20 mM, pH 7.0 que contiene hasta 500 mM de NaCl. La rioximina se eluyó con 20 tampón Tris-HCl mM, pH 7.0 que contenía hasta 500 mM de NaCl y 100 mM de galactosa. Las muestras fueron agrupadas y concentradas en filtros de membrana de 10.000 MWCO en tampón de almacenamiento que contenían Tampón Tris-HCl 20 mM, pH 7,0 y galactosa 50 mM, y posteriormente analizadas por SDS-PAGE<sup>24</sup>.

Preparación típica con elución en un solo paso de DEAE-celulosa, demostrar cantidades de proteínas purificadas de 90 µg por afinidad con actividad citotóxica, a partir de 20 g de materia prima<sup>23</sup>.

#### *Inactivación de los ribosomas*

La inactivación de los ribosomas demostrada por la proteína rioximina a puede estar ligada a la cadena A (dominio activo). La cadena A es una rRNAN-glucosidasa, que causa la depura-

ción del rRNA 28S de manera catalítica, lo que provoca la detención de la transcripción de la síntesis de proteínas<sup>16,25</sup>. Los RIP tipo 2 como la rioximina a tienen un dominio léctico que es capaz de unirse a los receptores glicosilados de la superficie celular, que pueden ser internalizados por las células<sup>26</sup>.

Hasta la fecha, no hay registro de que los aminoácidos que constituyen la región C terminal de los RIP estén directamente involucrados en la inactivación de los ribosomas. La mutación de esta región en principio no debe interferir con la actividad catalítica de las proteínas, ni alterar la conformación tridimensional que afecta al sitio activo. A pesar de múltiples estudios, todavía no existe un consenso que aclare el papel de estas interacciones entre las cadenas tóxicas de los RIP y la membrana celular, ni el mecanismo por el cual ocurren<sup>27</sup>.

#### *Actividad de la rioximina en líneas celulares*

La actividad antineoplásica de la rioximina ha sido estudiada contra varias líneas celulares cancerosas, como el cáncer colorrectal<sup>18</sup>, el cáncer de mama<sup>24,28</sup> el cáncer de páncreas<sup>29</sup> y el cáncer de hígado<sup>30</sup>.

La rioximina mostró actividad antineoplásica contra varias líneas celulares cancerosas. Los estudios de Pervaiz *et al.*<sup>17</sup> demostraron que la rioximina modula las cascadas de señalización causando efectos citostáticos y apoptóticos en líneas celulares de cáncer de mama. La rioximina indujo efectos citotóxicos en las cepas de cáncer de mama humano MDA-MB-231 y MCF-7, la proteína promueve una detención significativa en la fase S y la fragmentación nuclear. La rioximina también induce la citoquina IL24/MDA-7 y los genes GADD relacionados con el estrés RE, además de la inhibición de genes para la migración (RHO GTPases), actividades antiapoptóticas (familia BCL) y ciclo celular (ciclinas).

La exposición de la línea celular Suit2-007, cepa asociada a adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC) a rioximina asociada a TRAIL (ligando inductor de apoptosis relacionado con factor de necrosis tumoral), se evaluó mediante el ensayo MTT, se evidenció que la asociación de Rpx y TRAIL induce una supervivencia 6 veces menor en células tumorales PDAC. El estudio también muestra que Rpx tiene afinidad por CEA (antígeno carcinoembrionario), se relacionó significativamente con la expresión génica de moléculas de adhesión celular relacionadas con CEA (CEACAMs)<sup>19</sup>.

Otros estudios realizados por Sagini *et al.*<sup>15</sup> evaluaron la actividad antineoplásica de la rioximina contra la cepa de cáncer de páncreas Suit2-007 y el ASML de rata. La evaluación de Rpx y proteínas de unión a lactosil-sefarosa (LSBPs) para la absorción celular se probó mediante microscopía de fluorescencia. Rpx y LSBPs reducen la proliferación celular *in vitro*, disminuyendo la proliferación en un 15-20% en presencia de galactosa. Además, se identificaron 2.415 genes de expresión modulados por ARNm después de la exposición de células Suit2-007 a Rpx *in vitro*.

Muchos estudios se centran en líneas celulares de cáncer de páncreas, debido a la dificultad del tratamiento del cáncer y la afinidad de Rpx con estas cepas. Las líneas celulares de cáncer de páncreas ASML y sus clones 2, 5 y 10 fueron estudiadas por Murtaja *et al.*<sup>16</sup> (2018), contra la rioximina. Para determinar las tasas de proliferación y el efecto de la rioximina en las células ASML, se realizó el ensayo MTT, sembrándose a densidades de  $1 \times 10^3$ - $10 \times 10^3$  células/ml (100  $\mu$ l de medio por pocillo). En el origen celular original, Rpx causó una inhibición del crecimiento del 50% (IC 50) a una concentración de 65 pM después de 24 h. CI 50 disminuyó 18 veces en los siguientes 3 días, de 22h (48h) a 20h (72h) y 4h (96h). El clon ASML 2 es el más sensible después de 24 h (IC50 33 pM).

En comparación con otras proteínas inactivadoras de ribosomas con actividad antineoplásica, la rioximina presenta resultados similares. La ricina en la incubación de 4 pM es suficiente para disminuir la cantidad de proteína ID1 en las células MDA-MB-231 (línea celular de cáncer de mama) y HCT116 (línea celular de cáncer de colon), mientras que la rioximina demuestra actividad entre 20 y 100 pM para las mismas cepas. La utilidad de la ricina como agente anticancerígeno es limitada debido a la no selectividad de la cadena de lectina B, que no ocurre con la rioximina<sup>10,31</sup>.

Los estudios con otras proteínas inactivadoras de ribosomas tipo II ya han demostrado actividad antineoplásica. El análisis del mecanismo de actividad apoptótica de la ricina cruda (CR) en la vía de cascada de caspasas en el índice A que CR induce apoptosis intrínsecamente en líneas celulares de cáncer de pulmón (A549), a través de la vía de señalización mitocondrial de caspasa-9 y activación de caspasa-3<sup>32</sup>.

Las formas libres ebulina I y nigrina B presentaron valores IC50 muy elevados, cercanos a 4.000 y 1.800 ng/mL, respectivamente. Pueden bloquear el receptor de transferrina humana y reducir la actividad conjugada de Tf<sup>33</sup>.

## Conclusión

Después de analizar la literatura, fue posible observar que incluso con múltiples avances en los estudios sobre el uso de la rioximina como futuro agente antineoplásico, los estudios sobre extracción, purificación y aplicación de rioximina en terapias contra el cáncer son escasos. Sólo dos artículos fueron recuperados por los autores en la literatura que retratan la extracción y purificación de la rioximina de *Ximenia americana*.

La rioximina representa una alternativa futura a favor del desarrollo de nuevos fármacos y terapias antineoplásicas, al demostrar en pruebas *in vitro* resultados prometedores, pero para ello es necesario realizar nuevos estudios para verificar nuevos métodos de extracción, purificación, asegurar el uso y las dosis de rioximina, además del desarrollo de nuevas pruebas contra otras líneas celulares de cáncer, preferiblemente cepas de alta complejidad.

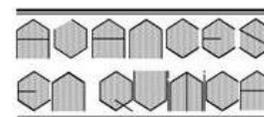
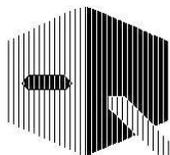
Además de la necesidad de nuevos estudios para obtener la proteína rioximina, es necesario centrarse en cómo aplicar esta biotecnología al tratamiento de enfermedades, especialmente el cáncer. Analizar los métodos farmacoterapéuticos viables para su uso en una escala aplicable al uso.

Los presentes estudios aportan nuevas reflexiones sobre la actividad antineoplásica de la rioximina obtenida de *Ximenia americana*, a través de una síntesis de los conocimientos recuperados de estudios en la literatura en las últimas dos décadas, buscando ayudar con la formación de una fuente de investigación para otros investigadores que buscan estudiar sobre las actividades biológicas de la rioximina.

## Referencias

1. World Health Organization. Global Cancer Observatory. Cancer Tomorrow. Lyon, France: WHO, 2020. Disponible en: <https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/isotype>
2. MMAN Ranjha, B Shafique, L Wang, S Irfan, MN Safdar, MA Murtaza, HR Nadeem. A comprehensive review on phytochemistry, bioactivity and medicinal value of bioactive compounds of pomegranate (*Punica granatum*). *Adv. Trad. Med.*, **23**(1), 37-57 (2023).
3. V Mishra, R Mishra, RS Shamra. Ribosome inactivating proteins—An unfathomed biomolecule for developing multi-stress tolerant transgenic plants. *Int. J. Biol. Macromol*, **210**, 107-122 (2022).
4. F Stirpe, MG Battelli. Ribosome-inactivating proteins: progress and problems. *Cell. Mol. Life Sci.*, **63**, 1850-1866 (2006).
5. R Kumar, A Bhattacharjee, S Tiwari. Plant-derived ribosome-inactivating proteins involved in defense against plant viruses. *Eur. J. Plant Pathol.*, **162**, 1-23 (2022):
6. M Puri, I Kaur, MA Perugini, RC Gupta. Ribosome-inactivating proteins: current status and biomedical applications. *Drug Discov. Today*, **17**(14), 774-783 (2012).
7. MR Hartley, JM Lord. Cytotoxic ribosome-inactivating lectins from plants. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins and Proteomics*, **1701**(1-2), 1-14 (2004).
8. FWMB Preijers. Rationale for the clinical use of immunotoxins: monoclonal antibodies conjugated to ribosome-inactivating proteins. *Leuk. Lymphoma*, **9**(4-5), 293-304 (1993).
9. C Voss, MR Eyol, E Berger. Identification of potent anticancer activity in *Ximenia americana* aqueous extracts used by African traditional medicine. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **211**(3), 177-187 (2006).
10. C Horrix, Z Raviv, E Flescher, C Voss, MR Berger. Plant ribosome-inactivating proteins type II induce the unfolded protein response in human cancer cells. *Cell. Mol. Life Sci.*, **68**, 1269-1281 (2011).
11. RF Celedonio, ACF Queiroga, WF Celedonio, JF Felício, XBL de Queiroz, YS de Oliveira, JF do Amaral. Propriedades antidiabéticas das plantas medicinais do gênero *Bauhinia*: revisão integrativa. *Rev. Fitos.*, **1**(1) (2023). <https://doi.org/10.32712/2446-4775.2023.1399>

12. R Whittemore. Combining in nursing research: methods and implications. **Nurs. Res.**, **54**(1), 56-62 (2005).
13. M Ouzzani, H Hammady, Z Fedorowicz, A Elmagarmid. Rayyan—a web and mobile app for systematic reviews. **Syst. Rev.**, **5**(210) (2016). <https://doi.org/10.1186/s13643-016-0384-4>
14. A Pervaiz, T Saleem, K Kanwal, SM Raza, S Iqbal, M Zepp, MR Berger. Expression profiling of anticancer genes in colorectal cancer patients and their in vitro induction by riproximin, a ribosomal inactivating plant protein. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, 1-13, (2022). <https://doi.org/10.1007/s00432-022-04410-6>
15. MN Sagini, KD Klika, A Orry, M Zepp, J Mutiso, MR Berger. Riproximin exhibits diversity in sugar binding and modulates some metastasis-related proteins with lectin like properties in pancreatic ductal adenocarcinoma. **Front. Pharmacol.**, **11**, e549804 (2020). <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.549804>
16. A Murtaja, E Eyol, J Xiaoqi, MR Berger, H Adwan. The ribosome inhibiting protein riproximin shows antineoplastic activity in experimental pancreatic cancer liver metastasis. **Oncol. Lett.**, **15**(2), 1441-1448 (2018). <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7526>
17. A Pervaiz, M Zepp, H Adwan, MR Berger. Riproximin modulates multiple signaling cascades leading to cytostatic and apoptotic effects in human breast cancer cells. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, **142**, 135-147 (2016). <https://doi.org/10.1007/s00432-015-2013-3>
18. Pervaiz A, Adwan H, Berger MR. Riproximin: A type II ribosome inactivating protein with anti-neoplastic potential induces IL24/MDA-7 and GADD genes in colorectal cancer cell lines. **Int. J. Oncol.**, **47**(3), 981-990 (2015). <https://doi.org/10.3892/ijo.2015.3073>
19. H Adwan, A Murtaja, K Kadhim Al-Tae, A Pervaiz, T Hielscher, MR Berger. Riproximin's activity depends on gene expression and sensitizes PDAC cells to TRAIL. **Cancer Biol. Ther.**, **5**(9), 1185-1197 (2014). <https://doi.org/10.4161/cbt.29503>
20. J Saenger, M Leible, MH Seelig, MR Berger. Chemoembolization of rat liver metastasis with irinotecan and quantification of tumor cell reduction. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, **130**, 203-210 (2004). <https://doi.org/10.1007/s00432-003-0523-x>
21. H Bayer, K Essig, S Stanzel, M Frank, JC Gildersleeve, MR Berger, C Voss. Evaluation of riproximin binding properties reveals a novel mechanism for cellular targeting. **J. Biol. Chem.**, **287**(43), 35873–35886 (2012). <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.368548>
22. F Stirpe. Ribosome-inactivating proteins: from toxins to useful proteins. **Toxicon**, **67**, 12–16 (2013). <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.02.005>
23. C Voss, E Eyol, M Frank, CW Lieth, C Voss, MR Berger. Identification and characterization of riproximin, a new type II ribosome-inactivating protein with antineoplastic activity from *Ximenia americana*. **The FASEB Journal**, **20**(8), 1194-1196 (2006). <http://www.fasebj.org/cgi/doi/10.1096/fj.05-5231fje>
24. H Bayer, N Ey, A Wattenberg, C Voss, MR Berger. Purification and characterization of riproximin from *Ximenia americana* fruit kernels. **Protein Expr. Purif.**, **82**(1), 97-105 (2012). <https://doi.org/10.1016/j.pep.2011.11.018>
25. MR Hartley, JM Lord. Cytotoxic ribosome-inactivating lectins from plants. **Biochim. Biophys. Acta**, **1701**(1-2), 1–14 (2004). <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2004.06.004>
26. LM Roberts, JM Lord. Ribosome-inactivating proteins: entry into mammalian cells and intracellular routing. **Mini Rev. Med. Chem.**, **4**(5), 505-512 (2004). <https://doi.org/10.2174/1389557043403846>
27. LF Reyes. Proteínas inativadoras de ribossomos: identificação de novas proteínas e estudos de interação da cadeia-A da pulchellina (PAC) com monocamada de Langmuir. (Tese de doutorado). São Carlos, Instituto de Física de São Carlos. Universidade de São Paulo, 34 p. (2011). <https://doi.org/10.11606/T.76.2011.tde-27052011-114447>
28. M Zeng, M Zheng, D Lu, J Wang, W Jiang, O Sha. Anti-tumor activities and apoptotic mechanism of ribosome-inactivating proteins. **Chin. J. Cancer**, **34**(3), 1-10 (2015). <https://doi.org/10.1186/s40880-015-0030-x>
29. H Adwan. Riproximin Is A New Plat Lectin With Antineoplastic Activity Against In Rat Pancreatic Cancer. **Qatar Found. Annual Res. Forum**, **1**, 126 (2013). <https://doi.org/10.5339/qfarf.2013.BIOP-0126>
30. H Nie, X Liu, Y Zhang, T Li, C Zhan, W Huo, Y Li. Specific N-glycans of hepatocellular carcinoma cell surface and the abnormal increase of core- $\alpha$ -1, 6-fucosylated triantennary glycan via N-acetylglucosaminyltransferases-IVa regulation. **Sci. Rep.**, **5**(1), 16007 (2015). <https://doi.org/10.1038/srep16007>
31. S Bharadwaj, SS Rathore, PC Ghosh. Enhancement of the cytotoxicity of liposomal ricin by the carboxylic ionophore monensin and the lysosomotropic amine NH<sub>4</sub>Cl in Chinese hamster ovary cells. **Int. J. Toxicol.**, **25**(5), 49-59 (2006). <https://doi.org/10.1080/10915810600846195>
32. IE Herawati, R Lesmana, J Levita, A Subarnas. Cytotoxicity, apoptosis, migration inhibition, and autophagy-induced by crude ricin from *Ricinus communis* seeds in A549 lung cancer cell lines. **Med. Sci. Monit. Basic Res.**, **28**, e936683 (2022). <https://doi.org/10.12659/MSMBR.936683>
33. L Citores, R Munoz, MA Rojo, P Jimenez, JM Ferreras, T Girbes. Evidence for distinct cellular internalization pathways of ricin and nigrin b. **Cell. Mol. Biol.**, **49**, OL461–465 (2003).



# Charles Gerhardt, precursor de la segunda revolución química

Jorge Meinguer Ledesma\*

Universidad Nacional Autónoma de México, Colegio de Ciencias y Humanidades, México.

(\*) [jormeinguer@yahoo.com.mx](mailto:jormeinguer@yahoo.com.mx)

Recibido: 11/05/2023

Revisado: 05/06/2023

Aceptado: 16/06/2023

## Resumen

Promover la reflexión sobre las preguntas, evidencias, personajes y controversias que potenciaron el desarrollo del conocimiento científico a lo largo de la historia, es una cuestión ampliamente reconocida en la educación científica. En este trabajo se presenta una reconstrucción histórica de la vida, obra y legado de Charles Gerhardt (1816-1856). Un brillante y polémico químico francés que realizó valiosas aportaciones en el marco de la teoría unitaria, las cuales sentaron las bases del incipiente campo de la química orgánica en la década de 1850. El impacto de su obra fue tan relevante que, algunos especialistas, lo consideran un precursor del periodo de desarrollo epistemológico denominado como segunda revolución química.

**Palabras claves:** teoría unitaria; historia de la química; educación química; epistemología; química orgánica.

## Abstract

**Charles Gerhardt, precursor of the Second Chemical Revolution.** Promoting reflection on the questions, evidence, characters, and controversies that enhanced the development of scientific knowledge throughout history is a widely recognized issue in the science education. This paper presents a historical reconstruction of the life, work, and legacy of Charles Gerhardt (1816-1856), a brilliant and controversial French chemist who made valuable contributions within the framework of the unitary theory, which laid the foundations of the incipient field of organic chemistry in the 1850s. The impact of his work was so relevant that some specialists consider him a precursor of the period of epistemological development known as the second chemical revolution.

**Keywords:** unitary theory; history of chemistry, chemical education; epistemology; organic chemistry.

## Introducción

### *La historia de la ciencia en la educación química*

Desde hace algunas décadas en la literatura educativa se ha argumentado sobre la importancia que tiene incorporar contenidos relacionados con la historia, la filosofía y la epistemología de la ciencia en el proceso de enseñanza-aprendizaje de las disciplinas científicas. Algunos autores mencionan que, incluir este tipo de contenidos permite dotar de contexto, significado y reflexión tanto al aprendizaje de la ciencia como a la formación docente<sup>1</sup>. A pesar de que se han conseguido avances al respecto en reformas educativas suscitadas en los últimos años, sigue predominando en los currículos de las asignaturas científicas una visión de la ciencia como un saber erudito, lineal, fragmentado, objetivo, neutro e incontrovertible<sup>2,3</sup>. Esta anacrónica visión de la actividad científica tiene su origen en la corriente neopositivista que predominó en el ámbito académico y en los círculos intelectuales durante buena parte del siglo XX.

Como resultado de esta deformada visión, se ha dificultado en el contexto escolar dar cauce a algunos de los objetivos que las teorías y modelos pedagógicos contemporáneos asocian a la educación científica, como es el caso de potenciar el entendimiento del papel de la ciencia en el desarrollo de la humanidad, la utilización del conocimiento científico en

la resolución de problemas y la toma de decisiones en los entornos cotidianos, así como la participación informada en asuntos relacionados con la ciencia y la tecnología que tienen incidencia social<sup>4</sup>. Ante este panorama, resulta pertinente señalar algunos de los beneficios que reviste el análisis histórico de la ciencia y sus repercusiones en la educación escolarizada.

El análisis histórico de la ciencia comenzó a cobrar fuerza en el ámbito educativo cuando en 1962 el físico y filósofo Thomas Kuhn, demostró en su libro la estructura de las revoluciones científicas<sup>5</sup> que una forma viable de trazar una aproximación epistemológica a la evolución del conocimiento científico en sus diferentes disciplinas es acudiendo a su historia. En esta obra el filósofo norteamericano muestra que, el avance de la ciencia es dinámico y está basado en discontinuidades y transformaciones que se suscitan en dos etapas del acontecer científico, lo que denomina ciencia normal y ciencia revolucionaria<sup>5</sup>. La primera de ellas corresponde al escenario convencional en el que opera la comunidad científica, explicando fenómenos y resolviendo problemas mediante el uso de elementos teóricos preestablecidos (teorías, modelos, postulados, etc.). Mientras que, los periodos de ciencia revolucionaria se caracterizan por la acumulación de anomalías y contradicciones de los presupuestos teóricos establecidos con nueva evidencia empírica disponible,

dando lugar a su transformación. Como consecuencia de este proceso, se generan nuevos recursos teóricos más precisos, abarcales y congruentes en un campo o fenómenos científico de interés<sup>6</sup>. Años después de la célebre obra de Khun, Imre Lakatos planteó con lucidez la idea de que, para investigar en torno a la historia de la ciencia, es necesario implementar un proceso de reconstrucción, el cual debe permitir demostrar en el presente como se han edificado, sostenido y transformado los programas de investigación que han estado presente y han potenciado el desarrollo de las diferentes disciplinas científicas<sup>7</sup>.

Con el surgimiento del movimiento CTS (Ciencia, Tecnología y Sociedad), el análisis histórico de la ciencia amplió sus horizontes al incluir aspectos relacionados con las implicaciones sociales, políticas, las motivaciones y los valores que posibilitan la evaluación de la actividad científica<sup>8</sup>. Por su parte, Stephen Toulmin defendió la idea de que las ciencias han sido el resultado de una especie de genealogía entre maestros y sus discípulos, lo que invitó a contemplar en su análisis histórico a los sistemas educativos, esto es, a las concepciones epistemológicas y didácticas de épocas o periodos específicos, así como el desempeño de los profesores y su integración en grupos o circuitos académicos determinados<sup>9</sup>. Esto con la finalidad de mostrar en las aulas y laboratorios que, la construcción del conocimiento científico ha sido producto de disputas internas y externas entre grupos, de incesantes periodos de deliberación de ideas y justificación de evidencias, así como de los intereses que una comunidad pone en juego al establecer consensos<sup>2</sup>.

En el ámbito educativo, Izquierdo y Quintanilla<sup>10</sup> señalan algunas aportaciones que la historia de la ciencia puede hacer a la educación científica.

- Proporciona contexto a los conocimientos que se comunican en las aulas y pone al descubierto elementos teóricos y descubrimientos que no han sido adecuadamente valorados, debido a que fueron desarrollados por colectivos o personajes cuya obra fue considerada irrelevante por los cánones historiográficos de la ciencia positivista (mujeres o personajes que no se ajustaron al *status quo* de su época).
- Sugiere el planteamiento de preguntas desafiantes sobre la emergencia de nuevas teorías y modelos científicos.
- Permite reconocer las ideas de los estudiantes al interpretar fenómenos o teorías en disputa que posibilitaron el desarrollo de las disciplinas científicas.
- Posibilita a los docentes generar nuevas estrategias al secuenciar y presentar contenidos complejos que se consideran curricularmente relevantes.
- Genera procesos sinérgicos entre las ciencias, su historia, su filosofía y su enseñanza.
- Potencia la formación docente, ya que los profesores al considerar a la historia de la ciencia como un elemento relevante en el proceso de enseñanza estarán investigando, recreando y discutiendo como se generó el conocimiento que suelen transmitir durante su práctica docente<sup>10</sup>.

De manera general, lo que busca el análisis histórico de la ciencia, es fomentar el entendimiento y la reflexión de cómo se han construido las teorías, los postulados y los modelos que han permitido tanto el desarrollo como la consolidación de las disciplinas científicas contemporáneas. Para que esto ocurra, es necesario situar a los alumnos en un momento histórico determinado donde puedan reconocer las preguntas y los desafíos que resultaron clave en la construcción de nuevo conocimiento, así como el impacto que tiene en este proceso factores sociales, políticos, económicos y culturales<sup>3</sup>. En el ámbito de la educación química, recurrir al análisis histórico contribuye a robustecer el aprendizaje de contenidos que se consideran curricularmente relevantes y a promover el interés, la reflexión y la formación de actitudes positivas del estudiantado hacia la denominada ciencia central<sup>11</sup>.

En este trabajo se analiza la vida, parte de la obra y el contexto que permitió al químico francés Charles Frédéric Gerhardt (1816-1856) realizar aportaciones que resultaron valiosas para el establecimiento de la teoría unitaria y el desarrollo de la química orgánica durante el siglo XIX. Siendo un precursor del periodo de desarrollo epistemológico que algunos autores han denominado como segunda revolución química<sup>12</sup>.

#### *Datos biográficos*

Charles Frédéric Gerhardt nace en la ciudad de Estrasburgo el 21 de agosto de 1816, cursa su educación básica en un gimnasio protestante a cargo de la Confesión Luterana de Augsburgo, en donde se benefició de una educación bilingüe, ya que en este centro educativo se impartían clases tanto en francés como en alemán. Cursó su educación media en la Escuela Politécnica de Karlsruhe. Su padre Samuel Gerhardt forjó una carrera como banquero y en el año de 1825 decidió invertir la mayor parte de sus ahorros en la adquisición de una fábrica de plomo blanco, un negocio que se convertiría en el sustento familiar. Al concluir su educación media en Karlsruhe, se matriculó en la Escuela de Comercio de la ciudad de Leipzig por indicaciones de su padre, quien identificó en él habilidades para que se convirtiera en apoyo y sucesor del negocio familiar<sup>13</sup>. En 1834 a la edad de 18 años, el joven Charles regresa a su ciudad natal para contribuir en la fábrica de su padre. En poco tiempo se da cuenta que, las actividades de supervisión, producción y ventas de la empresa familiar le resultan aburridas, reafirmando su convicción de especializarse en ciencias puras.

Mientras atiende el negocio familiar, Gerhardt acude por las tardes a la Universidad de Estrasburgo a charlar con Frédéric Kirshleger (1804-1869), un profesor de botánica y a tomar un curso de toxicología con Frédéric Opperman (1806-1872) en la Escuela de Medicina, actividades que le permiten realizar un poco de trabajo experimental. Como resultado de su estancia informal en la Universidad de Estrasburgo, Gerhardt publica una revisión de las fórmulas de los silicatos naturales que por su alto rigor es aceptado en el *Journal für*

*Praktische Chemie* en el año de 1835<sup>14</sup>, siendo su primera publicación científica. Por su deseo de profesionalizarse en ciencias puras y no en la administración, comenzó a tener diferencias con su padre. Este distanciamiento, lo obligó a matricularse en un regimiento militar. Una acción que le permitió desatender de forma decorosa la empresa familiar, pero la disciplina y la monotonía de las labores militares pronto lo asfixiaron<sup>15</sup>. Después de unos cuantos meses, reconsideró su decisión y comunicó a su padre, la necesidad de contar con dos mil francos para poder cubrir la cuota que le permitiría abandonar la carrera militar a cambio de regresar nuevamente a la empresa de la familia. El químico e historiador de la ciencia Edouard Grimaux (1835-1900) señala que, el dinero necesario para que Gerhardt abandonara las instalaciones militares fue cubierto por un amigo alemán de su padre quien parece ser tenía cercanía con el célebre químico Justus von Liebig (1803-1873), quien poco tiempo después invitaría al joven Charles a trabajar en su laboratorio en Giessen<sup>16</sup>. Este será su primer contacto formal con lo que se convertirá en el fervor académico de su vida, la química orgánica.

En Gissen, Charles Gerhardt asiste a varias conferencias impartidas por Liebig y recibe una modesta remuneración económica por la traducción al francés de un libro de este prestigioso químico, el cual fue titulado *Introduction a l'Étude de la Chimie* —introducción al estudio de la química—<sup>17</sup>. Después de casi dos años en Alemania, Gerhardt retorna por un lapso corto de tiempo a Estrasburgo donde publica algunos artículos relacionados con la composición y los derivados de los alcoholes<sup>18</sup>. Manuscritos que dan cuenta del trabajo experimental que emprendió en el laboratorio de Liebig. En 1838, se muda a la ciudad de París con la intención de culminar su formación como científico. En París establece contacto primero como estudiante y luego como colaborador con Jean Baptiste Dumas (1800-1884) en el Colegio de la Sorbona. Por esa época J. Dumas, tenía como asistente a Auguste Laurent (1807-1853), un brillante cristalógrafo y químico experimental, quien se convertiría en el transcurrir de los años en un aliado y el mejor amigo de Gerhardt. A la edad de 22 años, Gerhardt publica en París su primer trabajo teórico relacionado con una nueva clasificación de los compuestos orgánicos<sup>19</sup>. En este trabajo polemiza en torno a algunas ideas de Liebig y Dumas, al postular que la mayoría de los compuestos orgánicos tienen como estructura unitaria solamente a unos cuantos elementos en diferentes proporciones, en contraposición de las extensas y arbitrarias agrupaciones que Liebig y Dumas asumían al adherirse a las ideas de Berzelius sobre los compuestos orgánicos<sup>13</sup>. En esta publicación Gerhardt exhibe dos rasgos muy distintivos de toda su obra, el uso sistemático de ecuaciones químicas como recurso explicativo y el gusto por polemizar ideas con miras de robustecer y normar el cuerpo de conocimiento de la incipiente química orgánica. Un hábito que le haría acreedor de ataques y una mala imagen durante buena parte de su ejercicio profesional<sup>20</sup>.



Fig. 1: Retrato del químico Charles F. Gerhardt<sup>16</sup>.

Gerhardt bajo la tutela de Dumas obtiene su Diploma de Bachelier y el grado de Doctor en ciencias físicas. Su tesis doctoral estuvo basada en el estudio de la helenina, una sustancia incolora que se obtiene de las raíces de varias plantas como la émula o *Inula helenium* que ha sido usada como antiinflamatorio y en el tratamiento de enfermedades como la tuberculosis<sup>21</sup>. Meses después de obtener su doctorado, Gerhardt se traslada a la ciudad de Montpellier, donde ocupó el cargo de profesor titular de química en la facultad de ciencias por cerca de diez años y en donde publica dos libros de texto que le confirieron fama internacional: *Introduction à l'Étude de la Chimie par le Système Unitaire*<sup>22</sup> y *Précis de Chimie Organique*<sup>23</sup>.

En este periodo de tiempo contrae matrimonio con una joven escocesa de nombre Jane Sanders con quien tiene tres hijos. En 1844 crea con su amigo y colega Auguste Laurent (quien se desempeñaba en la universidad de Burdeos) una nueva revista de química titulada *Comptes Rendus Mensuels de Travaux Chimiques de l'Étranger* (informes mensuales de trabajos químicos desde el extranjero). Sus biógrafos narran que, en esta etapa de su vida Gerhardt no se encuentra del todo satisfecho, pues añora la incesante actividad intelectual y política que vivificó en la capital francesa<sup>13,15</sup>. Excusándose en limitaciones en cuanto a equipo e instalaciones para realizar su labor de investigación, viaja de manera continua a París donde se involucra activamente al movimiento revolucionario que se suscita en la capital francesa durante esos años<sup>24</sup>. Gerhardt fue un férreo defensor de los postulados de la revolución francesa, por lo que simpatizaba con las ideas

políticas liberales de su época como la oposición a la monarquía, la defensa del voto universal, la soberanía y el derecho al trabajo.

En 1851, Charles Gerhardt solicita una licencia para instalarse una larga temporada en París y culminar diversos proyectos de investigación pendientes. Una solicitud que es aceptada por el Rector de la Facultad de Ciencias de Montpellier, pero denegada por el Consejo Académico de esta institución a petición del químico Louis J. Thénard (1777-1857). Gerhardt molesto por esta decisión renuncia a su cargo en Montpellier y se traslada a la ciudad parisina<sup>25</sup>. Para cubrir sus gastos en la capital francesa, abre una escuela privada con el nombre de *École de Chimie Pratique* (Escuela de Química Práctica). Un proyecto educativo ambicioso que centraba la formación de los alumnos en el trabajo experimental, aunque también ofrecía cursos de química teórica, industrial, farmacia y filosofía de la química<sup>15</sup>. Durante este tiempo, Gerhardt comienza a escribir su tratado de química orgánica (*Traité de Chimie Organique*)<sup>26</sup>. Una obra de cuatro volúmenes con traducción al alemán que tuvo una fuerte influencia en la formación de químicos durante todo el siglo XIX.

A pesar de que la Escuela de Química Práctica fundada por Gerhardt contaba con un plan de estudios sólido y ambicioso, pronto se vio envuelta en problemas financieros debido a la crisis económica que imperaba en toda Francia producto del golpe de Estado efectuado por Napoleón III (1808-1873) y a una mala administración de su fundador. A inicios de 1854, Gerhardt se ve obligado a cerrar este centro escolar y padece severos problemas económicos. Sin embargo, en ese mismo año recibe una invitación para incorporarse como profesor titular de química en la Facultad de Ciencias de Estrasburgo—su ciudad natal—. Un cargo que ocupa en sustitución del connotado químico Louis Pasteur (1822-1895)<sup>25</sup>.

En Estrasburgo reestructura la introducción de su libro de texto *Introduction a l'Étude de la Chimie par le Systeme Unitaire*—*Introducción al Estudio de la Química por el Sistema Unitario*—<sup>22</sup>. En esta nueva edición, exhibe madurez, pericia y solidez al exponer sus ideas sobre el comportamiento químico de los compuestos orgánicos. Charles Gerhardt muere en el mes de agosto de 1856, a unos cuantos días de cumplir cuarenta años por complicaciones cardíacas asociadas a un antiguo padecimiento de fiebre reumática, el cual contrajo en su juventud por la exposición al plomo (al laburar en la empresa de su padre). Fue sepultado en el Panteón de Santa Helena en la ciudad de Estrasburgo.

## Desarrollo

### *La obra de Gerhardt como precursora de la segunda revolución química*

En 1838 cuando Charles Gerhardt inició formalmente su formación como químico en París, la química orgánica era apenas una subdisciplina emergente e incierta. En esa época, se

debatía aún en algunos circuitos académicos sobre la fuerza vital asociada a los compuestos orgánicos, indistintamente se hacía uso del modelo atómico de Dalton y de la noción de equivalente para explicar la composición de las sustancias y aunque se desarrollaron métodos gravimétricos para la determinación de pesos moleculares, estos aún estaban lejos de ofrecer resultados precisos y confiables<sup>27</sup>.

El historiador de la química William Jensen señala que, el periodo de tiempo comprendido entre 1840 a 1850 es uno de los más difíciles de analizar y comprender en el desarrollo de la química<sup>12</sup>. En esta década caracterizada por la incertidumbre y los incesantes debates para validar teorías en torno a los compuestos orgánicos fueron Auguste Laurent y Charles Gerhardt quienes dotaron de cierta coherencia y regularidad explicativa a los conocimientos generados en este campo<sup>28</sup>. A pesar de haber muerto relativamente joven, las aportaciones de Gerhardt al desarrollo de la química son numerosas. Comunicó varios procesos de síntesis de compuestos orgánicos, contribuyó a refinar algunas teorías, escribió libros de texto que se convirtieron en clásicos en la formación de químicos en toda Europa — *Introduction a l'Étude de la Chimie par le Systeme Unitaire*<sup>22</sup>, *Precis de Chimie Organique*<sup>23</sup> y *Traité de Chimie Organique*<sup>28</sup>, fue un docente e investigador ampliamente conocido en las academias de química de todo el mundo y un referente de químicos de generaciones posteriores. En los siguientes párrafos, se describen las contribuciones más relevantes que realizó Gerhardt al avance de la química durante el siglo XIX, estas son, la corrección al sistema de pesos atómicos y moleculares, el establecimiento de la noción de series homólogas y la denominada teoría de tipos.

En la década de 1840, Jacob Berzelius y el amplio grupo de químicos en el que ejercía influencia, utilizaban el método de densidades de vapor para determinar los pesos moleculares de los ácidos orgánicos junto con el estándar de los cuatro volúmenes. Un principio que, era definido como la cantidad de sustancia que ocupaba en estado gaseoso el mismo volumen que cuatro volúmenes de hidrógeno<sup>29</sup>. A las fórmulas que se obtenían bajo este método se les conocía como las fórmulas de los cuatro volúmenes. Gerhardt para entonces conocía ampliamente las reacciones de sustitución que estaba reportando Laurent de los compuestos orgánicos clorados. Al analizar con cautela estas reacciones de sustitución, se dio cuenta que las masas reportadas de los compuestos orgánicos obtenidos eran múltiplos de relaciones de combinación más pequeñas, un error que podía ser corregido si las masas se dividían entre dos<sup>13</sup>. El químico francés hizo notar que esta anomalía se debía a que Berzelius había definido como equivalente de los ácidos orgánicos a las cantidades que se unían a una molécula de óxido de plata denotado con la fórmula AgO, pero esta fórmula era errónea pues solo consideraba la presencia de un átomo de plata y la corrigió tal como se conoce en la actualidad con dos átomos de plata (Ag<sub>2</sub>O). Por esta omisión, se obtenían fórmulas que eran el

doble de las relaciones de combinación mínimas que se dan entre los elementos que constituyen a los compuestos orgánicos.

La corrección anteriormente descrita, condujo a Gerhardt a proponer que la fórmula del ácido acético es  $C_2H_4O_2$  y no  $C_4H_8O_4$  o  $C_4H_6O_3 + H_2O$  como indistintamente se reportaba a este ácido en las publicaciones de la época. Las modificaciones hechas por Gerhardt en la determinación de las fórmulas y pesos moleculares de los compuestos orgánicos, surtió efecto también en aquellas sustancias inorgánicas que eran eliminadas en las reacciones de sustitución. Por ejemplo, las fórmulas reportadas para estas sustancias eran  $H_4O_2$ ,  $H_2Cl_2$ ,  $C_2O_4$  y  $N_2H_6$  correspondientes al agua, ácido clorhídrico, dióxido de carbono y amoníaco respectivamente. Gerhardt reportó que las fórmulas correctas de estos compuestos eran  $H_2O$ ,  $HCl$ ,  $CO_2$  y  $NH_3$  como se conocen en la actualidad. Las modificaciones hechas por el químico francés a los pesos y fórmulas de los compuestos antes mencionados se develaron en años posteriores como correctas e irrefutables. De hecho, las correcciones de Gerhardt junto con la consolidación de los pesos atómicos del carbono ( $C=12$ ), oxígeno ( $O=16$ ) y el azufre ( $S=32$ ) permitieron que las fórmulas de los compuestos orgánicos mostrarán consistencia con las de los inorgánicos, dando lugar a un nuevo sistema de pesos atómicos y moleculares más preciso y unificado<sup>25</sup>.

Una segunda aportación relevante de Gerhardt fue la noción de sustancias homólogas, hoy en día referenciadas como series o familias homólogas en la química orgánica. Este concepto lo esbozó en una publicación realizada en 1843 que tituló *Recherches sur la Classification Chimique des Substances Organiques*<sup>30</sup> y que desarrolló más ampliamente en su libro *Précis de Chimie Organique*<sup>24</sup> dos años después. Las evidencias experimentales en las que se basó para formular la noción de sustancias homólogas fueron el comportamiento químico que reportó Dumas sobre los ácidos grasos en 1841<sup>31</sup> y Jacob Schiel—un cercano colaborador de Liebig— sobre los alcoholes. Al revisar estas publicaciones, Gerhardt infirió que adiciones sucesivas de metileno ( $CH_2$ ) dan lugar a agrupaciones de compuestos orgánicos con patrones de comportamiento químico similares. De tal forma que, solamente es necesario conocer las reacciones que experimenta un compuesto que pertenece a un grupo determinado para predecir el comportamiento químico de los demás. Específicamente, el químico francés definió a los compuestos homólogos como “*aquellos que tienen las mismas propiedades químicas y cuya composición ofrece ciertas analogías en las proporciones relativas de los elementos que las constituyen*”<sup>23</sup>.

La noción de sustancias homólogas desarrollada por Gerhardt resultó útil no solamente para explicar las propiedades de los compuestos orgánicos que exhibían un parecido químico y estructural, sino también para representarlos mediante fórmulas generales. Ejemplo de ello es la denotación de los alcoholes como  $R_{-2}O$  (donde R designa  $nCH_2$ ) y  $RO_2$

para los ácidos orgánicos<sup>25</sup>. No faltaron las descalificaciones del grupo de químicos influenciados por Berzelius a la noción de sustancias homólogas, al acusar al químico francés de hacer uso del algebra para resolver problemas químicos. Pero el criticismo que caracterizaba a Gerhardt, le permitió sortear sarcásticamente esta severa opinión, al referenciarla como un elocuente cumplido de sus colegas<sup>13</sup>.

La contribución más referenciada de Gerhardt por los historiadores de la química es la teoría de los tipos. Un trabajo que comienza a desarrollar en 1850 y que comunica formalmente tres años después en un artículo relacionado con la síntesis de ácidos orgánicos<sup>32</sup>. Sin embargo, es en su libro *Traité de Chimie Organique*<sup>26</sup> donde presenta de forma amplia, refinada y convincente la teoría de tipos al ejemplificar su poder explicativo en el marco de la teoría unitaria. Un recurso teórico desarrollado por Laurent y Gerhardt, en el que se restaba importancia a las fuerzas eléctricas en la explicación de la naturaleza de los compuestos orgánicos. En su lugar, se postulaba la existencia de fragmentos moleculares estables con sitios activos o susceptibles a reaccionar, los cuales eran referenciados como una especie de núcleos a los que se enlazaban diferentes grupos de átomos para formar una variedad de compuestos<sup>33</sup>. En este contexto, la teoría de tipos establecía que la mayoría de los compuestos orgánicos puede organizarse y derivarse por la sustitución de cuatro moléculas simples: hidrógeno, ácido clorhídrico, agua y amoníaco<sup>28</sup>. Según esta teoría, del tipo agua se derivan los alcoholes, ácidos, óxidos, sulfuros y éteres; del tipo ácido clorhídrico se obtienen los cloruros, bromuros, yoduros, cianuros y fluoruros; del tipo amoníaco se desprenden los nitruros, fosfuros, arseniuros y, finalmente, del tipo hidrogeno se pueden derivar los haluros metálicos y los hidrocarburos<sup>29</sup>.

Los trabajos en los que se basó Gerhardt para establecer su teoría de tipos fueron la síntesis de la metilamina y la etilamina reportada por Würtz en 1849<sup>34</sup>, así como las reacciones para producir éteres publicadas por A. W. Williamson en 1850<sup>35</sup>. Según Würtz, la obtención de diferentes tipos de aminas era el resultado de sustituir uno o dos átomos de hidrógeno del amoníaco por radicales<sup>34</sup>. Por su parte, A. W. Williamson informaba que se podían obtener éteres si se sustituía el átomo de hidrógeno de algunos alcoholes conocidos por fragmentos hidrocarbonados e inclusive fue más allá al informar que, si se sustituían los hidrógenos de la molécula del agua por el radical acetilo ( $C_2H_3O$ ), era posible obtener ácido acético<sup>35</sup>. Gerhardt era un conocedor del comportamiento químico de los ácidos orgánicos, por lo que corroboró la hipótesis de Williamson al preparar el ácido acético mediante una reacción entre el cloruro de acetilo y al acetato de sodio anhidro<sup>32</sup>. Los trabajos de Würtz y Williamson fueron clave para dar sustento a los compuestos orgánicos que eran derivados del tipo amoníaco y agua respectivamente. Mientras que, el soporte empírico alrededor de los dos tipos restantes (hidrógeno y ácido clorhídrico) era producto del

Tipo	Derivado etílico	Derivado benzoílico
$\text{O} \begin{cases} \text{H} \\ \text{H} \end{cases}$ Agua	$\text{O} \begin{cases} \text{C}_2\text{H}_5 \\ \text{H} \end{cases}$ Alcohol	$\text{O} \begin{cases} \text{C}_7\text{H}_5\text{O} \\ \text{H} \end{cases}$ Ácido benzoico
$\begin{cases} \text{H} \\ \text{Cl} \end{cases}$ Ácido clorhídrico	$\begin{cases} \text{C}_2\text{H}_5 \\ \text{Cl} \end{cases}$ Cloruro de etilo	$\begin{cases} \text{C}_7\text{H}_5\text{O} \\ \text{Cl} \end{cases}$ Cloruro de benzoilo
$\text{N} \begin{cases} \text{H} \\ \text{H} \\ \text{H} \end{cases}$ Amoníaco	$\begin{cases} \text{C}_2\text{H}_5 \\ \text{H} \\ \text{H} \end{cases}$ Etilamina	$\begin{cases} \text{C}_7\text{H}_5\text{O} \\ \text{H} \\ \text{H} \end{cases}$ Benzamida
$\begin{cases} \text{H} \\ \text{H} \end{cases}$ Hidrógeno	$\begin{cases} \text{C}_2\text{H}_5 \\ \text{H} \end{cases}$ Hidruro de etilo	$\begin{cases} \text{C}_7\text{H}_5\text{O} \\ \text{H} \end{cases}$ benzaldehido

Fig. 2: Representación del sistema de tipos propuesto por Gerhardt<sup>29</sup>.

amplio conocimiento químico que Gerhardt y Laurent habían compilado sobre las reacciones de sustitución que experimentaban los compuestos orgánicos, al postular y defender la teoría unitaria.

La teoría de tipos fue aceptada por la mayoría de las academias de química europeas en un lapso corto de tiempo. Esto se debió a que resultaba el sistema más útil para clasificar y predecir el comportamiento químico de una amplia cantidad de compuestos orgánicos que constantemente crecía. Además, postulaba a las moléculas como las entidades químicas que dotaban de identidad a las sustancias orgánicas en contraposición de los ambiguos radicales acuñados por Berzelius. Una idea novedosa que comenzaba a ser ampliamente aceptada por la comunidad de especialistas<sup>27</sup>. Químicos de generaciones posteriores como Edward Frankland (1825-1899) contribuyeron en la consolidación del concepto de tipo, al describir en el marco de esta teoría la síntesis de los primeros compuestos organometálicos<sup>29</sup>.

#### *El legado de Gerhardt y su abordaje en la educación química*

En la literatura se menciona que, Gerhardt poseía una personalidad contrastante. En su labor como químico se caracterizó por ser riguroso, comprometido y meticuloso al familiarizarse con la evidencia empírica disponible y el estado del arte de la química de su época, así como poseer una apertura de mente al resolver problemas disciplinares de interés. Estos atributos intelectuales contrastaban con ciertos rasgos de efusividad y una actitud desafiante al debatir ideas que consideraba equivocadas<sup>20</sup>. Cabe señalar que, su fuerte temperamento y su hábito por polemizar era producto de su ideología radical y su activa militancia política, así como su ambiciosa intención de normar y regularizar el incipiente campo de la química orgánica. A causa de lo anterior, fue blanco de severas críticas por parte de influyentes químicos

que formaban parte de la élite conservadora que predominaba en las academias científicas decimonónicas. Esta animadversión por la obra y personalidad de Gerhardt se puede rastrear inclusive en los trabajos de algunos historiadores de la química influenciados por la historiografía neopositivista de la primera mitad del siglo XX que, al aludir la obra del químico francés, lo hacen describiéndolo como un personaje marginal, incomprendido o desacreditado<sup>24</sup>.

Al respecto, no es menester de este escrito polemizar sino enfatizar que los preceptos teóricos de la historiografía de la ciencia contemporánea se han modificado sustancialmente, dotando a este campo de conocimientos de mayor reflexión y amplitud al analizar los elementos que dieron pauta al desarrollo de la actividad científica en un momento determinado<sup>10</sup>. Por tal razón, la obra de Gerhardt y la de otros químicos excepcionales como August Laurent (1901-1944), Henry Moseley (1887-1915), Linus Pauling (1901-1994), Dorothy Hodgkin (1910-1994), entre otros debe ser reexaminada y debidamente ponderada, otorgándoles el debido reconocimiento a sus aportaciones.

Gerhardt publicó cientos de análisis críticos sobre química en las revistas francesas, 9 libros de texto, 7 traducciones de la obra de Liebig y otros químicos contemporáneos, decenas de publicaciones donde reportó métodos para sintetizar y caracterizar alcoholes, aceites esenciales, ácidos orgánicos, aminas y amidas. A estos trabajos hay que agregar sus relevantes contribuciones en el ámbito teórico, las cuales han sido descritas en la sección anterior de este escrito. Perteneció a la Sociedad de Historia Natural de Estrasburgo, al Círculo Farmacéutico de Montpellier, al Colegio de Farmacia de Filadelfia y al Instituto de París. En febrero de 1858, la Real Academia de Ciencias de Francia le otorgó de forma póstuma el Premio *Jecker* por sus contribuciones al avance de la Química Orgánica<sup>25</sup>. La presencia de Gerhardt en un amplio número de organizaciones académicas y el impacto que tuvo su obra en la comunidad de especialistas en el campo de la química orgánica durante el siglo XIX, son las razones que permiten reconocerlo como un precursor de la segunda revolución química.

El historiador de la química William Jensen señala que, la segunda revolución química comenzó formalmente en 1852 cuando el químico Edward Frankland (1825-1899) refina y comunica el concepto de valencia y culminó en 1874 cuando el químico alemán Jacobus van't Hoff reporta la descripción tetraédrica de los átomos de carbono<sup>12</sup>. Los logros más representativos de este periodo de desarrollo epistemológico fueron la descripción de la materia a través de estructuras o fragmentos moleculares, la consolidación de la química orgánica y la obtención de un sistema más preciso y generalizable de los pesos atómicos y moleculares. Los trabajos de Gerhardt incidieron favorablemente en la consecución de estos avances, ya que, con el establecimiento de la teoría unitaria, se comenzó a fincar la tradición en la comunidad de

químicos orgánicos de explicar las propiedades de los compuestos orgánicos en función de su composición y representación espacial<sup>20</sup>. Una visión que se consolidó en años posteriores con la formulación de la teoría estructural<sup>11</sup>. La teoría unitaria fue también un precedente importante en la clasificación de los compuestos orgánicos.

En lo referente a la obtención de un nuevo sistema de pesos atómicos y moleculares, diversos historiadores coinciden que, el antecedente directo de este avance disciplinar fue un congreso de química que se celebró en el año de 1860 en la ciudad alemana de Karlsruhe<sup>27,36</sup>. En este evento, el químico italiano Stanislao Cannizzaro (1826-1910) realizó una brillante y elocuente intervención en la que basándose en la hipótesis de Amadeo Avogadro (1776-1856) sobre el estudio de los gases y las correcciones hechas por Charles Gerhardt a algunos pesos moleculares, reformuló la metodología para obtener medidas más precisas y generalizables del peso de las sustancias químicas, obteniéndose valores que persisten hasta nuestros días<sup>36</sup>. Al congreso de Karlsruhe asistieron químicos ilustres como Adolph Würtz (1817-1884) y Auguste Kekulé (1829-1896), quienes conocían bien la obra de Gerhardt y compartían algunas de sus ideas, así como el químico ruso Dimitri Mendeléyev (1834-1907) quién en una década posterior formularía la ley periódica, una de las bases de la química contemporánea.

SUBSTANCES HOMOLOGUES.	SUBSTANCES HOMOLOGUES.	SUBSTANCES HOMOLOGUES.	SUBSTANCES HOMOLOGUES.
CH <sup>4</sup> O. Esprit de bois.	CH <sup>2</sup> O <sup>2</sup> . Acide formique.	CH <sup>4</sup> O <sup>4</sup> S. Ac. sulfométhylque.	CH <sup>3</sup> Cl. Hydrochl. de méthylène.
C <sup>2</sup> H <sup>6</sup> O. Esprit de vin.	C <sup>2</sup> H <sup>4</sup> O <sup>2</sup> . Acide acétique.	C <sup>2</sup> H <sup>6</sup> O <sup>4</sup> S. Acide sulfovinique.	C <sup>2</sup> H <sup>5</sup> Cl. Hydrochl. d'éthère.
C <sup>3</sup> H <sup>12</sup> O. Huile de pom. de terre.	C <sup>3</sup> H <sup>10</sup> O <sup>2</sup> . Acide valérianique.	C <sup>3</sup> H <sup>12</sup> O <sup>4</sup> S. Acide sulfo-amilique.	C <sup>3</sup> H <sup>11</sup> Cl. Hydroc. d'amilène.
C <sup>16</sup> H <sup>34</sup> O. Éthal.	C <sup>16</sup> H <sup>32</sup> O <sup>2</sup> . Acide éthallique.	C <sup>16</sup> H <sup>34</sup> O <sup>4</sup> S. Acide sulfocétique.	C <sup>16</sup> H <sup>33</sup> Cl. Hydroc. de cétène.

Fig. 3: Representación de las sustancias homólogas en el libro de texto *Précis de Chimie Organique*<sup>23</sup>.

Por lo expuesto con anterioridad, resulta claro porque Gerhardt es considerado uno de los químicos brillantes del siglo XIX. Pues a pesar de haber realizado su trabajo académico en instituciones periféricas distantes de París, de haber participado en intensos debates con los mejores químicos de su época y haber muerto relativamente joven, su obra se mantuvo como un referente en las generaciones de químicos posteriores, siendo un connotado fundador del campo de la química orgánica.

En el ámbito de la educación química, el espacio en el que se puede referenciar la vida y obra de Charles Gerhardt, es en los cursos de química orgánica o química de carbono que se imparten en el bachillerato y en etapas tempranas de la educación superior. Específicamente, cuando se aborda el concepto de series homólogas o se estudian las reacciones

de sustitución que experimentan los halogenuros de alquilo. En el primer caso se puede indicar a los alumnos que, investiguen los antecedentes históricos de la definición de sustancias homólogas y las implicaciones que esta noción tiene en la clasificación de los compuestos orgánicos. Mientras que, en el segundo caso se pueden elaborar e implementar planeaciones didácticas que orienten al alumnado al reconocimiento de las reacciones de sustitución que experimentan los compuestos orgánicos clorados como la base empírica de la teoría unitaria. Una tercera ruta para referenciar la obra de Gerhardt y de otros químicos brillantes en las aulas y laboratorios, es promover el análisis de las tres etapas revolucionarias de la química que postula el historiador W. Jensen<sup>12</sup>. Esto, con la finalidad de que los alumnos comprendan y reflexionen sobre los cambios epistemológicos más significativos que ha experimentado esta ciencia desde su etapa fundacional. La obra de Gerhardt será un referente obligado al analizar el segundo periodo revolucionario de la química. Específicamente, en lo relativo al surgimiento y consolidación de la química orgánica. En las tres rutas educativas antes mencionadas, la indagación que efectúen los estudiantes los conducirá a compilar datos biográficos sobre el químico francés y al reconocimiento de su legado disciplinar.

En este trabajo se considera que, fomentar el análisis histórico de la química en el ámbito educativo, posibilita mostrar la relación dinámica que existe entre esta ciencia y su contexto. Un aspecto que contribuye a que los alumnos internalicen una imagen más adecuada de la química. Esto, al comprender que la construcción del conocimiento químico es un proceso en evolución constante y con una fuerte dimensión humana en donde la experimentación, el rigor, la competencia entre grupos académicos de diferentes ideologías, la colectividad y la búsqueda de consensos juegan un papel relevante<sup>37</sup>. Finalmente, en el plano de la docencia fomentar el análisis del papel que tuvo la obra de Gerhardt en el establecimiento de la teoría unitaria y sus implicaciones en el desarrollo de la química orgánica, contribuye a robustecer la formación del profesorado en lo relativo al dominio de contenidos químicos y a incrementar el acervo de episodios que se pueden referenciar en el salón de clases en el análisis histórico y filosófico de la química, evitando con ello el reduccionismo.

## Conclusiones

En este trabajo se ha presentado una reconstrucción histórica de los hechos, evidencias, trabajos y vicisitudes que permitieron al químico francés Charles Gerhardt hacer valiosas contribuciones al desarrollo y consolidación del campo de la química orgánica. En el ámbito experimental, este connotado químico comunicó métodos de síntesis y reacciones características de los alcoholes, ácidos orgánicos, amidas y diversos productos naturales. En el dominio de lo teórico, contribuyó en la obtención de un sistema más preciso de los pesos atómicos y moleculares, su noción de sustancias homó-

logas junto con la teoría de tipos ampliaron el poder explicativo de la teoría unitaria. Un precepto teórico que potenció un cambio metodológico entre la comunidad de especialistas enfocados en el estudio de los compuestos de carbono, dotando de coherencia al uso de algunas nociones disciplinares que se consideran clave en el desarrollo de la química como es el caso de radical, equivalente, molécula y átomo<sup>28</sup>. Después de su muerte, sus ideas fueron retomadas por brillantes químicos de generaciones posteriores, siendo referenciadas y defendidas en el histórico congreso de Karlsruhe de 1860. Uno de los eventos más representativos e importante de la química moderna. Por su amplio legado, Gerhardt es considerado un precursor de la segunda revolución química y uno de los químicos más representativos del siglo XIX.

En el campo de la educación química, el análisis de la vida y obra de Gerhardt se puede referenciar en el nivel medio y superior en los cursos de química de carbono. Esto, al abordar contenidos que guardan relación con la teoría unitaria como es el caso de la clasificación y la reactividad que experimentan algunos compuestos orgánicos. Finalmente, este trabajo puede servir como una guía en la elaboración de investigaciones que tengan como fundamento el análisis histórico y epistemológico de temas químicos curricularmente relevantes, esto con el propósito de hacer más amplia y significativa su enseñanza.

## Referencias

1. JA Acevedo-Díaz, A García. Uso de la historia de la ciencia para comprender aspectos de la naturaleza de la ciencia. Fundamentación de una propuesta basada en la controversia Pasteur *versus* Liebig sobre la fermentación. **Revista Iberoamericana de Ciencia, Tecnología y Sociedad**, **11(33)**, 203-226 (2016).
2. A Gallego-Torres, R Gallego-Badillo. Historia, epistemología y didáctica de las ciencias: Unas relaciones necesarias. **Ciência & Educação (Bauru)**, **13(1)**, 85-98 (2007).
3. L Cuellar, M Quintanilla, A Marzabal. La importancia de la historia de la química en la enseñanza escolar: Análisis del pensamiento y elaboración de material didáctico de profesores en formación. **Ciência & Educação**, **16(2)**, 277-291 (2010).
4. R Santos, D Auler. Práticas educativas CTS: Busca de uma participação social para além da avaliação de impactos da Ciência-Tecnologia na Sociedade. **Ciência & Educação**, **25(2)**, 485-503 (2019).
5. S Kuhn. *The Structure of Scientific Revolutions*. 1ª Edition. University of Chicago Press. Chicago (1962).
6. C Cortassa. Thomas Kuhn: ¿El último de los clásicos o el primer revolucionario? A 50 años de *La Estructura de las Revoluciones Científicas*. **Revista Iberoamericana de Ciencia, Tecnología y Sociedad CTS**, **8(22)**, 91-104 (2013).
7. I Lakatos. *La Metodología de los Programas de Investigación Científica*. Alianza Editorial. Madrid (1983).
8. E Sosiuk. Sociología de la ciencia y sociología de los problemas sociales. Discusiones y perspectivas. **Revista Iberoamericana de Ciencia, Tecnología y Sociedad-CTS**, **16(47)**, 95-117 (2021).
9. S Toulmin. *La Comprensión Humana: El Uso Colectivo y la Evolución de los Conceptos*, Vol. I. Alianza Editorial. Madrid (1977).
10. M Izquierdo, A García, M Quintanilla, A Aduriz. Historia, filosofía y didáctica de las ciencias: Aportes para la formación del profesorado de ciencias. DIE-Universidad Distrital Francisco José de Caldas. Bogotá (2016).
11. J Meinguer. La caracterización estructural del benceno de Kekulé: Un ejemplo de creatividad y heurística en la construcción del conocimiento químico. **Ciência & Educação**, **26**, 1-13 (2020).
12. W. Jensen. Logic, history, and the teaching of chemistry: III. One chemical revolution or three? **Journal of Chemical Education**, **75(8)**, 961-969 (1998).
13. J Dickerson. Charles Gerhardt and the theory of organic combination. **Journal of Chemical Education**, **62(4)**, 323-325 (1985).
14. C Gerhardt. Sur les Formules des Silicates Naturels. **J. Praktische Chemie**, **4**, 44-79 (1835).
15. M Blondel. Quelques aspects méconnus de la personne et de l'oeuvre de Charles Gerhardt (1816-1856). **Revue d' Histoire de la Pharmacie**, **95 (357)**, 39-62 (2008).
16. E Grimaux. Charles Gerhardt, sa Vie, son Oeuvre, sa Correspondence, 1816-1856: Document d'Histoire de la Chimie. Masson et Cie. Paris (1900).
17. J Liebig. *Introduction à l'Étude de la Chimie*, translated from the German by Charles Gerhardt. Paris (1837).
18. C Gerhardt. Sur la constitution de l'alcool et de ses dérivées. **J. Praktische Chemie**, **14**, 17-54 (1838).
19. C Gerhardt. Recherches sur la classification chimique des corps organiques, **Revue Scientifique et Industrielle**, **7**, 104-106 (1841).
20. A Rocke. *The Quiet Revolution: Hermann Kolbe and the Science of Organic Chemistry*. University of California Press. Berkeley (1993).
21. C Gerhardt. Recherches Chimiques sur l'Hellénine. **Ann. Chim. Phys.**, **72**, 163-183 (1840).
22. C Gerhardt. *Introduction à l'Étude de la Chimie par le Système Unitaire*, 2 vols. Chamerot. Paris (1844).
23. C Gerhardt. *Précis de Chimie Organique*, 2 vols. Fortin et Masson. Paris (1845).
24. JR Partington. *A History of Chemistry*, Vol. IV. Macmillan. London (1964).
25. J Wisniak. Charles Frédéric Gerhardt. **Educación Química**, **17 (3)**, 343-356 (2006).
26. C Gerhardt. *Traité de Chimie Organique*, 4 vols. Firmin-Didot. Paris (1856).
27. I Asimov. *Breve Historia de la Química*. Alianza Editorial. Madrid (1990).
28. L Aguilera, F Garay. La estructuración de la química orgánica a partir de las teorías dual y unitaria: Una mirada Kuhniana. **Educación Química**, **25(2)**, 148-153 (2014).

- 
29. M Katz. Temas de Historia de la Química. Asociación Química Argentina. Buenos Aires (2016).
  30. C Gerhardt. Recherches sur la Classification Chimique des Corps Organiques, **Revue Scientifique et Industrielle**, **12**, 592-600 (1843).
  31. JB Dumas. On the chemical statics of organized beings. **Philosophical Magazine**, **19**, 337-347 (1841).
  32. C Gerhardt. Recherches sur les acides organiques anhydres. **Ann. Chim. Phys.**, **37**, 285-342 (1853).
  33. B Bensaude-Vincent, I Stengers. Historia de la Química. Addison Wesley. Madrid (1997).
  34. A Würtz. Sur une série d'alcalis organiques homologues avec l'ammoniaque. **Comptes Rendus**, **28**, 223-226 (1849).
  35. AW Williamson. Theory of etherification. **Philosophical Magazine**, **37**, 350-356 (1851).
  36. P Román. El Congreso de Karlsruhe. **Anales de la Real Sociedad Española de Química**, **4**, 45-53 (2000).
  37. J Meinguer. La virtud, un paradigma filosófico loable en la educación química. **Educación Química**, **26(1)**, 43-49 (2015).