

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 970 044**

21 Número de solicitud: 202230903

51 Int. Cl.:

G01N 21/64 (2006.01)

G01N 21/78 (2006.01)

G01N 31/22 (2006.01)

G01N 33/14 (2006.01)

G01N 33/52 (2006.01)

C07F 5/02 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

20.10.2022

43 Fecha de publicación de la solicitud:

24.05.2024

Fecha de concesión:

11.11.2024

45 Fecha de publicación de la concesión:

18.11.2024

73 Titular/es:

**UNIVERSITAT DE VALÈNCIA (100.0%)
Avda. Blasco Ibañez, 13
46010 Valencia (Valencia) ES**

72 Inventor/es:

**HERNÁNDEZ CONTRERAS, Jordi;
RODRÍGUEZ NUÉVALOS, Silvia;
GAVIÑA COSTERO, Pablo;
PARRA ÁLVAREZ, Margarita;
GIL GRAU, Salvador;
SÁEZ CASES, Jose Antonio y
ARROYO MÁÑEZ, Pau**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

54 Título: **COMPUESTOS DERIVADOS DE BODIPY PARA LA DETECCIÓN DE DROGAS**

57 Resumen:

La presente invención se refiere al uso de compuestos derivados de BODIPY para la detección de drogas como la escopolamina, ketamina y catinonas. El cromóforo BODIPY combinado con sales de cobre modifica su color y fluorescencia cuando existe la presencia de estas drogas. La presente invención también se refiere a un kit para la detección de estas drogas que incluye estos compuestos derivados de BODIPY.

ES 2 970 044 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.
Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

DESCRIPCIÓN**COMPUESTOS DERIVADOS DE BODIPY PARA LA DETECCIÓN DE DROGAS****SECTOR DE LA TÉCNICA**

La presente invención se refiere a una serie de compuestos derivados del cromóforo
5 BODIPY, que combinados con sales de Cu(II) modifican su color y fluorescencia en presencia de algunas drogas de sumisión química como la escopolamina, la ketamina y las catinonas. La invención también se refiere al uso de estos compuestos para la detección de estas drogas. Por tanto, la presente invención pertenece al campo de los métodos de detección basados en los cambios fisicoquímicos de un compuesto.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los casos de sumisión química están alarmando a la sociedad, complicando el disfrute del ocio nocturno seguro. Es por esta razón, la importancia de desarrollar un kit que permitiese la detección de las drogas más utilizadas en la sumisión química. Apenas
15 hay métodos para la detección de drogas de abuso y/o sumisión química, y los que hay no ofrecen la portabilidad y sencillez de manejo que el usuario necesita. Aunque para ketamina o escopolamina sí existen test, no existe ninguno que ofrezca una respuesta rápida y en presencia simultánea con otras drogas de abuso. Apenas hay métodos para la detección de drogas de abuso y/o sumisión química del tipo catinona y ninguno con
20 portabilidad y sencillez de manejo (*ChemistryOpen* 2018, 7, 401 – 428).

Las drogas de sumisión química cumplen una serie de características que las hacen ideales para perpetrar este tipo de delitos. Entre estas características se encuentra la metabolización rápida y la efectividad a dosis bajas. La escopolamina, en concreto,
25 requiere una dosis de tan solo 7-30 mg para alcanzar la sumisión química. Esto hace que únicamente técnicas de una sensibilidad muy alta, con límites de detección (LD) muy bajos, del orden μM , sean útiles para su detección. Este es el caso de que sea la espectrometría de masas (MS) acoplado a un HPLC la única técnica viable para poder detectar con fiabilidad la escopolamina. En cuanto a la ketamina y catinonas, su
30 aplicación queda limitada bien por su tiempo de respuesta, sus LD o por su dificultad de uso a procedimientos que requieren personal altamente cualificado para su determinación.

A lo largo de los años, han sido desarrollados varios métodos colorimétricos para la
35 detección de catinonas. Todos ellos muestran diversas desventajas: no son selectivos

y hacen uso de reactivos altamente corrosivos y oxidantes como son el ácido sulfúrico o la sosa (Campos et al. WIREs Forensic Sci. 2022; 4:e1455). Se desarrolló un test basado en la reducción de Cu(II) a Cu(I) gracias al poder reductor de la cationas; sin embargo, requiere 10 min de reacción y calentar a 100 °C (Philp et al. Forensic Chemistry, Vol. 1, 2016, p.39-50). También existen otro tipo de métodos que incluyen otro tipo de componentes más complejos como las proteínas (nanoclusters de oro estabilizados con albúmina de suero bovina), polímeros molecularmente impresos (MIPs) o *carbon dots* o métodos de detección basados en el uso de grandes aparatos como la cromatografía de gases.

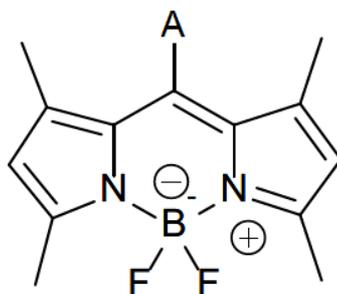
10

EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

Los inventores han desarrollado una serie de compuestos derivados de BODIPY (4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno) que junto a cationes Cu(II) modifican sus propiedades fotofísicas en presencia de alguna o varias de las drogas escopolamina, ketamina y cationas, permitiendo la detección de éstas por el cambio de color y fluorescencia que se puede observar a simple vista.

15

En un primer aspecto, la presente invención se refiere al uso de un compuesto de fórmula (I):



20

(I)

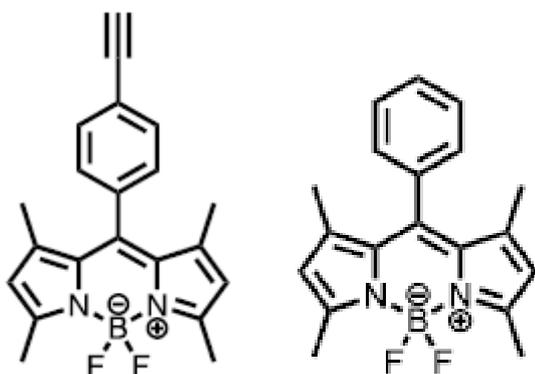
donde A es un grupo que se selecciona de entre arilo o heteroarilo sustituidos o sin sustituir, para la detección de una droga que se selecciona de entre escopolamina y/o ketamina y/o cationas.

25

Preferiblemente, A es un arilo que se selecciona de entre fenilo, antraceno o fenantreno opcionalmente sustituidos por al menos un grupo que se selecciona de entre alquilo C1-C6, alqueno C1-C6 o alquino C1-C6.

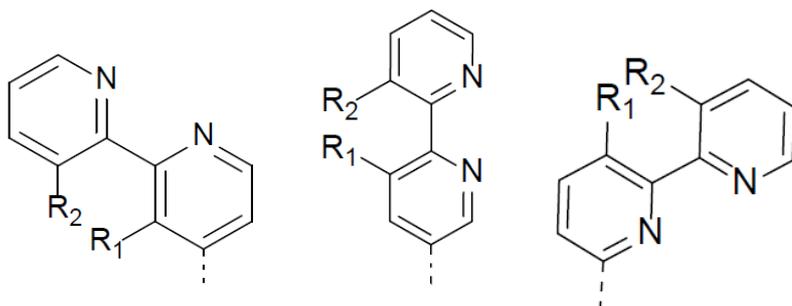
Más preferiblemente, A es un fenilo opcionalmente sustituido por un grupo que se selecciona de entre alquilo C1-C4, alquenilo C1-C4 o alquinilo C1-C4.

5 Aún más preferiblemente, el compuesto de fórmula (I) se selecciona de entre los siguientes compuestos:



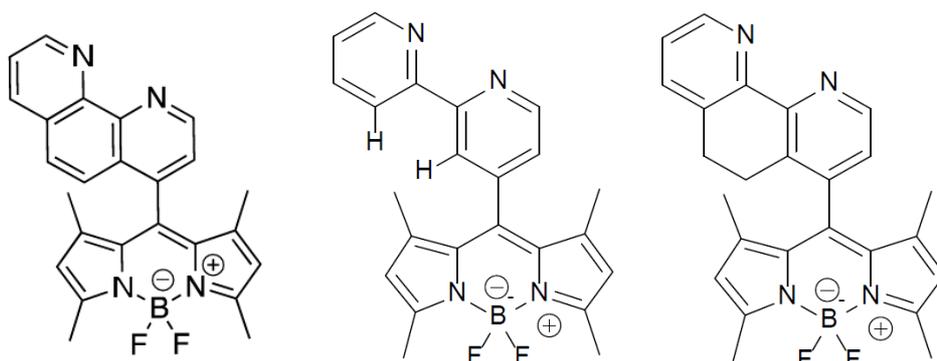
10 Preferiblemente, A es un heteroarilo que se selecciona de entre piridina o fenantrolina opcionalmente sustituidas por al menos un grupo que se selecciona de entre alquilo C1-C6, alquenilo C1-C6 o alquinilo C1-C6.

Más preferiblemente, A es una bis-piridina sustituida que se selecciona de entre los siguientes grupos:



15 donde R_1 y R_2 se seleccionan independientemente de entre H o alquilo C1-C6 o R_1 y R_2 son grupos $-CH_2-$ unidos mediante enlace sencillo o R_1 y R_2 son grupos $-CH-$ unidos mediante un enlace doble.

20 Aún más preferiblemente, el compuesto de fórmula (I) se selecciona de entre los siguientes compuestos:



El término “arilo”, se refiere, en la presente invención, a anillos aromáticos, sencillos o múltiples, que tienen entre 5 a 18 átomos de carbono en la parte del anillo.

5 Preferiblemente el grupo arilo tiene de 5 a 7 átomos de carbono y más preferiblemente el grupo arilo es un fenilo. Los grupos arilo pueden estar opcionalmente sustituidos en cualquiera de sus posiciones por uno o más sustituyentes o por dos sustituyentes formando un ciclo condensado al arilo y se seleccionan independientemente entre tales como CF₃, alquilo C1-C6, alqueno C1-C6, alquino C1-C6, S-alquilo C1-C6, halógeno,

10 CN, O-alquilo C1-C6, NO₂, COO-alquilo C1-C6, NHCO-alquilo C1-C6, NH₂ y NH-alquilo C1-C6.

El término “heteroarilo” se refiere a un arilo, como se ha definido anteriormente, que contiene al menos un átomo distinto de carbono, tales como S, N, ó O, formando parte

15 del anillo aromático. Los grupos heteroarilo pueden estar opcionalmente sustituidos en cualquiera de sus posiciones por uno o más sustituyentes o por dos sustituyentes formando un ciclo condensado al heteroarilo y se seleccionan independientemente entre CF₃, alquilo C1-C6, alqueno C1-C6, alquino C1-C6, S-alquilo C1-C6, halógeno, CN, O-alquilo C1-C6, NO₂, COO-alquilo C1-C6, NHCO-alquilo C1-C6, NH₂ y NH-alquilo C1-

20 C6.

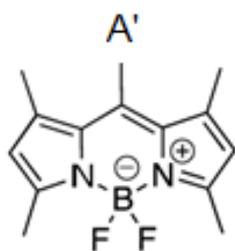
El término “alquilo” se refiere, en la presente invención, a cadenas hidrocarbonadas saturadas, lineales o ramificadas, que tienen de 1 a 6 átomos de carbono, por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, terc-butilo, sec-butilo, n-pentilo, n-hexilo, etc.

25 Preferiblemente el grupo alquilo tiene entre 1 y 4 átomos de carbono. Los grupos alquilo pueden estar opcionalmente sustituidos por uno o más sustituyentes tales como CF₃, alquilo C1-C6, S-alquilo C1-C6, halógeno, CN, O-alquilo C1-C6, NO₂, COO-alquilo C1-C6, NHCO-alquilo C1-C6, NH₂ y NH-alquilo C1-C6.

El término “alquenilo” se refiere a un alquilo como se ha definido anteriormente que contiene al menos un doble enlace entre carbonos.

El término “alquinilo” se refiere a un alquilo como se ha definido anteriormente que
5 contiene al menos un triple enlace entre carbonos.

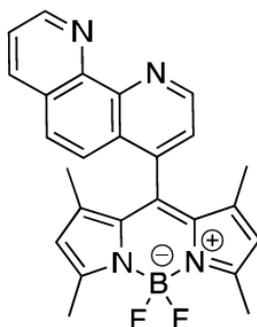
Otro aspecto de la invención se refiere a un compuesto de fórmula (II):



(II)

10 donde A' es un grupo fenantrolina opcionalmente sustituido por al menos un grupo que se selecciona de entre alquilo C1-C6, alquenilo C1-C6 o alquinilo C1-C6, preferiblemente alquilo C1-C4, alquenilo C1-C4 o alquinilo C1-C4.

Preferiblemente, el compuesto de fórmula (II) tiene la siguiente fórmula:



15

Otro aspecto de la invención se refiere a un kit para la detección en una muestra de una droga que se selecciona de entre escopolamina y/o ketamina y/o catinonas que comprende al menos un compuesto de fórmula (I) según se ha descrito anteriormente y una sal de cobre, preferiblemente cobre (II).

20

Preferiblemente, la muestra es una muestra líquida que preferiblemente se selecciona de entre saliva, orina, agua, bebidas alcohólicas y no alcohólicas (zumos, refrescos).

Preferiblemente, la sal de cobre se selecciona de entre nitrato, sales orgánicas como el acetato, haluros como el bromuro o sulfatos.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método para la detección de escopolamina y/o ketamina y/o catinonas en una muestra preferiblemente líquida que comprende las siguientes etapas:

- a. Preparar una disolución que comprende al menos un compuesto de fórmula (I) según se ha descrito anteriormente y una sal de cobre;
- b. Añadir la muestra problema a la disolución anteriormente preparada;
- c. Determinar los cambios de color y/o fluorescencia visualmente o por medio de un dispositivo.

En el caso de que haya habido cambios en la etapa c, se concluirá la presencia de al menos una de las drogas escopolamina, ketamina y catinonas.

Preferiblemente, la mezcla en a se calienta durante un corto periodo de tiempo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1. Espectros UV-vis (A) y espectros de emisión (B) de: compuesto **1** (50 M en THF: solución agua 95:5), compuesto **1** con 1 equiv. de $\text{Cu}(\text{AcO})_2$ y compuesto **1** con 1 equiv. de CuBr ($\lambda_{\text{exc}} = 450 \text{ nm}$). En todos los casos, la solución se calentó previamente al reflujo durante 2 min. Parte inferior de los espectros de absorción/emisión: cambios de color observados bajo luz visible/lámpara UV.

Figura 2. Evolución de la intensidad de emisión a 515 nm ($\lambda_{\text{exc}} = 450 \text{ nm}$) del compuesto **1** (50 M en THF: solución de agua 95:5) en presencia de 1 equiv. de $\text{Cu}(\text{AcO})_2$ (azul) o 1 equiv. de CuBr (naranja) a lo largo del tiempo después de calentar la mezcla al reflujo (A). Evolución de la intensidad de emisión de fluorescencia (derecha) a 515 nm ($\lambda_{\text{exc}} = 450 \text{ nm}$) con el tiempo de una mezcla del compuesto **2** (50 μM en solución THF: agua 95:5) y 1 equiv. de $\text{Cu}(\text{AcO})_2$ o 1 equiv. de CuBr . En cada caso, la solución se sometió a reflujo durante 2,5 minutos (B).

Figura 3. Espectro de emisión ($\lambda_{\text{exc}} = 450 \text{ nm}$) (A) y espectro UV-Vis (B) del compuesto **1** (50 μM en disolución THF:Agua 95:5), en presencia de 1 equivalente de $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ mientras se incrementa la cantidad de efedrona en la disolución. Todas las disoluciones

fueron previamente calentadas a reflujo durante 2 minutos. En las imágenes insertadas se puede observar los cambios a simple vista (A) y los cambios bajo lámpara UV (B).

Figura 4. Absorción a 410 nm de 1 (50 M en THF: solución de agua 93:7) que contiene 1 equiv. de $\text{Cu}(\text{AcO})_2$ (en blanco) y la misma solución en presencia de 2 equiv. de los interferentes correspondientes. En cada caso, la solución se calentó a reflujo durante 2 minutos.

Figura 5. Absorción a 410 nm de 1 (50 M en THF: solución de agua 93:7) que contiene 1 equiv. de $\text{Cu}(\text{AcO})_2$ (en blanco) y la misma solución en presencia de 2 equiv. de las cationas correspondientes. En cada caso, la solución se calentó a reflujo durante 2 minutos.

Figura 6. Espectro de emisión de las disoluciones 50 μM de sensor DMSO:H₂O (9:1) junto con 2 equiv. de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ y una cantidad creciente de escopolamina en el rango 0 a 22,5 μM ($\lambda_{\text{exc}} = 470 \text{ nm}$).

Figura 7. Disoluciones de escopolamina a diferentes concentraciones (orden ascendente, de izquierda a derecha). (a) A simple vista. (b) Bajo lámpara de fluorescencia.

Figura 8. Recta de calibrado.

Figura 9. Espectro de emisión de las disoluciones de 50 μM sensor DMSO:H₂O (9:1) junto con 2 equiv. de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ y, o agua (blanco), o 5 equiv. de la droga correspondiente ($\lambda_{\text{exc}} = 470 \text{ nm}$).

Figura 10. Representación del % *quenching* de cada una de las drogas de sumisión química.

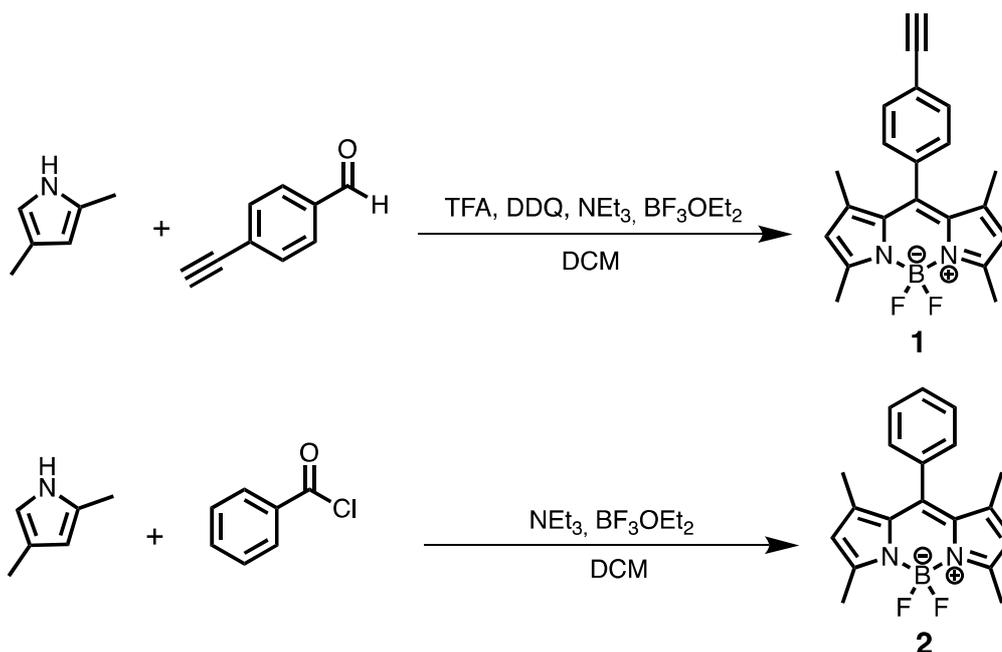
Figura 11. Representación del % *quenching* de cada una de sustancias posibles presentes en la matriz de estudio.

EJEMPLOS DE LA INVENCION

La presente invención se ilustra con los siguientes ejemplos:

Ejemplo 1: síntesis de los compuestos 1 y 2 de la invención

El compuesto 1 se preparó siguiendo el procedimiento descrito en la literatura (Y. Chen, J. Zhao, H. Guo, L. Xie, *J. Org. Chem.*, 2012, 77, 2192), mientras que el compuesto 2 se preparó mediante un nuevo procedimiento optimizado a partir de cloruro de benzoilo que no requiere un tratamiento con DDQ y TFA (Esquema 1):

10 Ejemplo 2: detección de catinonas con los compuestos 1 y 2**Valoración con soluciones de efedrona en agua.**

En una celda de cuarzo de 3 mL (1 cm de longitud de trayectoria), se mezclaron 2565 μ L de una solución del compuesto 1 en THF con 134 μ L de Cu(OAc)₂ en agua para obtener una solución de 50 μ M THF/H₂O (95:5) del compuesto 1 y Cu(II). Después, se agregaron 300 μ L de la mezcla de reacción. La mezcla de reacción se preparó con cantidades crecientes de solución de efedrona 5 mM en agua hasta llegar al punto de saturación. En cada caso, se estableció un período de incubación de 2 min en reflujo.

20 **Mediciones de interferentes.**

En una celda de cuarzo de 3 mL (1 cm de longitud de trayectoria), se mezclaron 2565 μ L del compuesto 1 en THF con 134 μ L de Cu(OAc)₂ en agua para obtener una solución de 50 μ M THF (5% agua) del compuesto 1 y Cu(II). Después, se agregaron 300 μ L de

la mezcla de reacción. La mezcla de reacción se preparó añadiendo 20 μL de una solución de 5 mM en agua de los interferentes correspondientes. Después de un período de incubación de 2 min a temperatura de reflujo, se registraron los espectros correspondientes.

5

Titulación con soluciones de cationes sintéticas en saliva.

En una celda de cuarzo de 3 mL (1 cm de longitud de trayectoria), se mezclaron 2565 μL de una solución de **1** en THF con 134 μL de $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ en agua para obtener una solución de 50 μM THF (5% de agua) del compuesto **1** y $\text{Cu}(\text{II})$. Luego, se agregaron 10 300 μL de la mezcla de reacción a la sonda, y después de un período de incubación de 2 minutos a temperatura de reflujo, se midió el espectro correspondiente. La mezcla de reacción se preparó con cantidades crecientes de solución de cationes 5 mM en saliva, hasta llegar al punto de saturación.

15 Las soluciones de estos colorantes en THF mostraron las propiedades ópticas características de los compuestos BODIPY: una banda de absorción intensa a 501 nm y 503 nm con un hombro a 480 nm y 470 nm para compuestos **1** y **2** respectivamente. Además, ambos muestran una fuerte emisión de fluorescencia a 511 nm. Con el fin de estudiar el comportamiento de **1** y **2** en presencia de $\text{Cu}(\text{II})$ y $\text{Cu}(\text{I})$, se registraron los 20 correspondientes espectros de emisión UV-vis y fluorescente en THF/ H_2O (95:5). Los espectros UV-vis de ambas sondas no mostraron ningún cambio apreciable en presencia de 1 equiv. de $\text{Cu}(\text{AcO})_2$ ni a temperatura ambiente ni bajo reflujo. Sin embargo, se observaron resultados diferentes cuando CuBr (1 equiv.) se añadió a la solución. Cuando el espectro se registró a temperatura ambiente, no se observaron 25 cambios. Sin embargo, cuando la solución de compuestos y $\text{Cu}(\text{I})$ se calentó a reflujo 2-3 minutos, se observaron fuertes cambios tanto en la absorción como en los espectros de emisión de la solución (ver Figura 1 para compuesto **1**).

La Figura 1 muestra los cambios observados en el compuesto **1** en presencia de $\text{Cu}(\text{I})$ 30 y $\text{Cu}(\text{II})$. Como se puede ver, las bandas de absorción características del núcleo BODIPY desaparecen cuando la solución se calentó durante 2 min en presencia de $\text{Cu}(\text{I})$ mientras que no se observaron cambios en presencia de $\text{Cu}(\text{II})$. Los cambios inducidos se observaron a simple vista como una pérdida de color de la solución. Además, ambos cationes indujeron un comportamiento diferente en los espectros de 35 fluorescencia correspondientes: $\text{Cu}(\text{II})$ no indujo ningún cambio, mientras que $\text{Cu}(\text{I})$ dio

lugar a un enfriamiento total de la emisión de fluorescencia del colorante.

Para estudiar el diferente comportamiento de los colorantes con el tiempo en presencia de ambos cationes de cobre y establecer las condiciones experimentales óptimas, se
5 realizaron estudios comparativos (ver Figura 2(A) y (B) para estudios de fluorescencia con compuesto **1**; para los datos UV del compuesto **1** y los datos UV y de fluorescencia del compuesto **2**).

Como se puede observar en la Figura 2, el compuesto **1** no mostró cambios en su
10 intensidad de fluorescencia en presencia de Cu(II). Por el contrario, en presencia de Cu(I) se observó un claro enfriamiento de la fluorescencia después de menos de dos minutos. Basándonos en este comportamiento y en la capacidad de las cationas para reducir Cu(II) a Cu(I) decidimos explorar la respuesta cromogénica y fluorescente de soluciones THF del compuesto **1** y **2** que contienen 1 equiv. de Cu(II), en presencia de
15 cantidades crecientes de efedrona, como modelo de una cationa sintética. Como se puede observar en la Figura 1 para el compuesto **1** cambios importantes tanto en el espectro UV-vis como en el espectro de fluorescencia del colorante se observaron en presencia de efedrona, que puede ser atribuido a la reducción de Cu(II) a Cu(I) por la efedrona. Estos cambios en los espectros de absorción y emisión del compuesto en
20 presencia de Cu(II) mostraron una dependencia lineal con la cantidad de efedrona añadida que permite utilizar el sistema como sensor para esta droga. Además, los cambios se pueden observar a simple vista, ya sea bajo una lámpara UV común (Fig. 3). Los experimentos de control que utilizaron esta cationa en ausencia de Cu(II) no mostraron cambios ni en los espectros UV-vis ni en los de fluorescencia.

25

A partir de los experimentos de titulación realizados, el LD podría determinarse utilizando la expresión: $LD = (3 \cdot S_b) / m$, donde S_b es la desviación estándar en blanco y m la pendiente. El valor determinado a partir de las mediciones de fluorescencia fue de 0,05 μ M de efedrona para el compuesto **1**. Este valor es considerablemente inferior a la
30 cantidad necesaria para producir efectos graves en las bebidas.

Con el fin de disponer de información sobre posibles especies que puedan interferir en la detección de cationas en diferentes matrices, como bebidas o fluidos orales, se realizaron medidas con algunos ácidos (ácidos tartárico y cítrico), tioles (cisteína),
35 especies reductoras (ascorbato de sodio) y azúcares (sacarosa). También se estudiaron

- las aminas (fenilglicina, bencilamina y serotonina) debido a la similitud de su estructura con las cationonas. Como se puede ver en la Figura 4, la respuesta hacia la efedrona es alrededor de 5 veces mayor que la de los interferentes (Figura 4). También se estudiaron otras cationonas sintéticas para confirmar la versatilidad del método. Así, se realizaron mediciones con mefedrona, 3,4-MDPHP y MPHP. Los resultados obtenidos mostraron que la sonda fue capaz de detectar la presencia de estas cationonas sintéticas utilizadas con mayor frecuencia en un entorno real, con resultados aún mejores que para la efedrona (Figura 5).
- Se procedió posteriormente a realizar ensayos para explorar la utilidad del método para detectar cationonas en el fluido oral. Para este propósito, las muestras de saliva se dispararon con efedrona (5 mM) y también se utilizó saliva pura (blanco) para la comparación. Se realizaron experimentos de titulación de fluorescencia (Fig. 6) y se observó una respuesta lineal en el rango de concentración de 0-1 μ M. El límite de detección de efedrona obtenido para el compuesto **1** fue de 96 ng/mL, siendo este valor inferior a la concentración esperada en líquido oral después de su consumo (aprox. 150-300 ng/L). Se observó que los experimentos en muestras de saliva tuvieron una respuesta aún mejor que en muestras de agua. Los experimentos de recuperación realizados con cationona en saliva se resumen en la Tabla 1, lo que resulta en una recuperación de alrededor del 90%:

Tabla 1. Comparación de las propiedades como sensor frente a Cationonas sintéticas (SCs) de diferentes sondas ópticas.

Sonda	técnica de Detección	Selectividad	Límite de detección	Aplicación	Ref.
Derivado de BODIPY de la invención	Extinción de fluorescencia	Cationonas sintéticas	0.16 μ M (32 ng/mL)	Medio acuoso y saliva	Este Estudio
Polímero molecularmente Impreso	Emisión inducida por Agregación	Cationonas sintéticas	0.34 μ M	Orina	Shen <i>et al.</i> , 2022
BSA – Au nanoclusters	Extinción de fluorescencia	Cationonas sintéticas	0.14 mM	Medio acuoso	Yao-Te <i>et al.</i> , 2019
Carbon dots (C-dots)	Extinción de fluorescencia	Cationonas sintéticas	1.74 mM	Medio acuoso	Yao-Te <i>et al.</i> , 2019
CBS - Azyme	Aumento de fluorescencia	Cationonas sintéticas	3 μ M	Saliva (50 %) Orina (50 %)	Yingping <i>et al.</i> , 2019
-	GC-MS	Cationonas sintéticas	10 ng/mL	Saliva	Khaled <i>et al.</i> , 2016

Y. Yan, L. Jiang, S. Zhang, X. Shen, C. Huang, Specific “light-up” sensor made easy: An aggregation induced emission monomer for molecular imprinting, *Biosensors and Bioelectronics* 205 (2022) 114113. DOI: 10.1016/j.bios.2022.114113

5

Y.-T. Yen, T.-Y. Chen, C.-Y. Chen, C.-L. Chang, S.-C. Chyueh, H.-T. Chang, Photoluminescent Colorimetric Probe of Bovine Serum Albumin-Stabilized Gold Nanoclusters for New Psychoactive Substances: Cathinone Drugs in Seized Street Samples, *Sensors* 19 (2019) 3554. DOI: 10.3390/s19163554

10

Y.-T. Yen, Y.-S. Lin, T.-Y. Chen, S.-C. Chyueh, H.-T. Chang, Carbon dots functionalized papers for high-throughput sensing of 4-chloroethcathinone and its analogues in crime sites, *R. Soc. open sci.* 6 (2019) 191017. DOI: 10.1098/rsos.191017

15

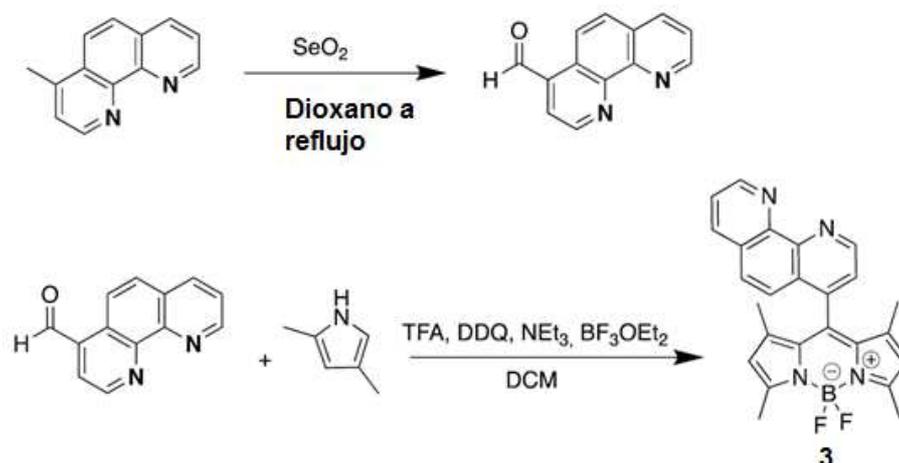
Y. Luo, H. Yu, O. Alkhamis, Y. Liu, X. Lou, B. Yu, Y. Xiao, Label-Free, Visual Detection of Small Molecules Using Highly Target-Responsive Multimodule Split Aptamer Constructs, *Anal. Chem.* 91 (2019) 7199–7207. DOI: 10.1021/acs.analchem.9b00507

20

Khaled. M, Abtehaj. H, Alanoud. M, El-Said. A, A GC–MS Method for Detection and Quantification of Cathine, Cathinone, Methcathinone and Ephedrine in Oral Fluid, *J. Chromatogr. Sci.*, 54, 8 (2016) 1271-1276. DOI: 10.1093/chromsci/bmw082

Ejemplo 3: síntesis del compuesto 3 de la invención

El compuesto **3** de la invención se sintetizó siguiendo el siguiente esquema:



25

El compuesto **3** sintetizado consiste en núcleo de BODIPY funcionalizado con una

fenantrolina unida a su posición meso. En primer lugar, se oxidó el grupo metilo de la fenantrolina, en concreto se oxidó la 4-metil-1,10-fenantrolina a 1,10-fenantrolina-4-carbaldehído. Por ello se utilizó SeO_2 como agente oxidante en dioxano y la reacción tuvo lugar durante 5 horas a la temperatura de reflujo del disolvente. Una vez obtenido, se caracterizó el aldehído derivado por la técnica espectroscópica $^1\text{H-RMN}$. Se observó que, tras filtración a vacío y lavados con Et_2O , el crudo de la reacción presentaba un 15% del reactivo de partida. Sin embargo, no se llevó a cabo ninguna purificación tras el tratamiento de reacción puesto que el reactivo de partida no comprometía ninguna etapa posterior. A continuación, para obtener el compuesto **3**, se condensó el 2,4-dimetilpirrol junto con el aldehído derivado de la fenantrolina, bajo atmósfera de argón. La adición del ácido trifluoroacético (TFA) dio lugar al puente dipirrometano que une los dos pirroles, este, en presencia de DDQ, (2,3-Dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona) se oxidó formando el dipirrometeno. Por último, se añadió el $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ para formar el puente BF_2 en presencia de una base (Et_3N). Todas las etapas transcurren a temperatura ambiente. El crudo de reacción fue evaporado a sequedad, y a continuación, se purificó mediante cromatografía de adsorción en columna de gel de sílice utilizando como eluyente $\text{DCM}:\text{MeOH}$ 99:1. Tras la purificación, se obtuvo 300 mg de producto puro (17% de rendimiento).

20 Ejemplo 4: detección de escopolamina usando el compuesto **3** de la invención

Una vez se controlaron todos los parámetros que podrían provocar variabilidad en las medidas (temperatura, luz y tiempo), se llevó a cabo una valoración para obtener la recta de calibrado de la detección de escopolamina. Las condiciones de medida, que se mantuvieron durante todo el experimento fueron 10 minutos de reacción a 60°C en ausencia de luz. Para llevar a cabo la evaluación, se prepararon disoluciones a $50 \mu\text{M}$ del sensor junto con 2 equivalentes de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ ($100 \mu\text{M}$). Dichas disoluciones fueron contaminadas en un rango de 0 a $22,5 \mu\text{M}$ de escopolamina a partir de una disolución 5 mM. En todas las medidas se mantuvo la relación $\text{DMSO}:\text{H}_2\text{O}$ (9:1). De los resultados obtenidos en la valoración, se obtiene la recta de calibrado a partir del rango lineal (figura 8), representando la concentración de escopolamina frente a la señal de emisión.

A partir de la pendiente de la recta de calibrado y utilizando la fórmula $\text{LD}=3 \cdot \text{Sb}/m$, donde Sb es la desviación estándar del blanco, y m es la pendiente de la recta de calibrado, se calculó el límite de detección. El valor obtenido fue $3,05 \mu\text{M}$. Por otro lado, para evaluar el método se procedió a calcular el *recovery* (porcentaje de recuperación) y su

precisión. Para ello, se contaminó una muestra a 9 μM de escopolamina, y se calculó la concentración a partir de su valor de emisión medido y la recta de calibrado según K. A. Rawat, R. K. Singhal, S. K. Kailasa, RSC Adv. 6 (2016) 32025-32036.

Analito	Concentración conocida (μM)	Concentración calculada (μM)	Recovery % ^a	Precisión % ^b
Escopolamina	9	10,2	113	13

^a recovery % (Concentración calculada /Concentración conocida) x 100

^b precisión % (Concentración calculada–Concentración conocida/Concentración conocida) x 100

5 **Tabla 2.** Resultados en los cálculos de concentración de escopolamina, *recovery* y precisión.

Para llevar a cabo un estudio de interferentes, en primer lugar, se hizo un estudio de diferentes drogas utilizadas en la sumisión química. Para ello, se prepararon disoluciones a 50 μM del sensor junto con 2 equiv. de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ (100 μM). Dichas disoluciones fueron contaminadas con 5 equiv. de una disolución de cada droga a 5 mM. Todas las medidas fueron realizadas bajo las mismas condiciones: 10 minutos de reacción en ausencia de luz y a 60 °C (Figura 9).

15 Debido a la variabilidad de la señal entre experimentos en diferentes días a causa de que la lámpara del fluorímetro no excita con la misma energía, se decidió representar la señal de emisión en un % de *quenching* respecto al blanco medido al momento. Al tratarse de unidades arbitrarias (u.a.), aunque varíen, el valor del % de *quenching* debe mantenerse (ver figura 10).

20

De los resultados anteriores podemos observar que el sensor es capaz de detectar escopolamina y ketamina. Por otro lado, se observa una respuesta poco significativa con metilona y ninguna respuesta con Diazepam. Por esta razón, se preparó una disolución contaminada con ambas de estas drogas que no daban respuesta, y en presencia de escopolamina (5 equiv.). Se preparó, además, la disolución del blanco para mantener siempre la relación DMSO: H₂O 9:1 y poder calcular el % *quenching*. Como podemos observar en la Figura 9, esta vez sí hay una mayor respuesta que se debe a la presencia de la escopolamina.

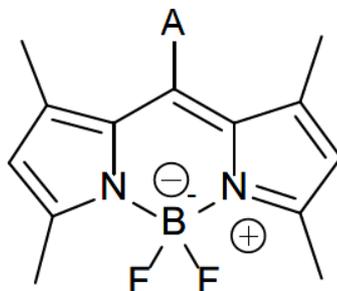
30

Por otro lado, se llevó a cabo un estudio de interferentes con otros compuestos que

podría estar presentes en diferentes matrices de estudio como por ejemplo bebidas, saliva u orina. Se prepararon disoluciones a 50 μM del sensor junto con 2 equiv. de $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ (100 μM). Dichas disoluciones fueron contaminadas con 5 equiv. de una disolución de cada sustancia a 5 mM. Destaca la ketamina con una respuesta de porcentaje de *quenching* de un 70%; destacable pero inferior al de la escopolamina cuyo porcentaje aproximado es de 78%. Por otra parte, se han realizado ensayos para interferentes generales en los que no se aprecia una respuesta significativa en comparación con la escopolamina, ni interfieren en su detección.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un compuesto de fórmula (I):



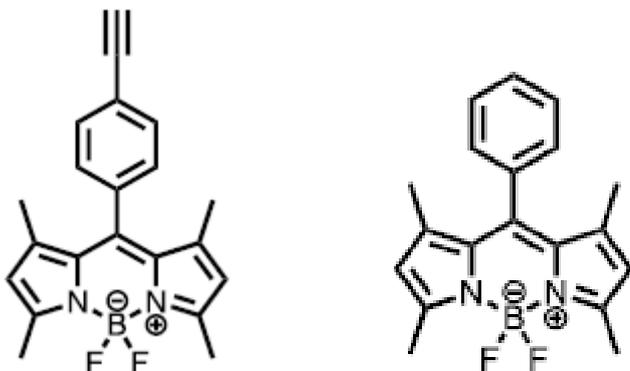
5 (I)

donde A es un grupo que se selecciona de entre arilo o heteroarilo sustituidos o sin sustituir, para la detección de una droga que se selecciona de entre escopolamina y/o ketamina y/o cationas.

10 2. Uso según la reivindicación 1 donde A es un arilo que se selecciona de entre fenilo, antraceno o fenantreno opcionalmente sustituidos por al menos un grupo que se selecciona de entre alquilo C1-C6, alquenilo C1-C6 o alquinilo C1-C6.

15 3. Uso según la reivindicación 2 donde A es un fenilo opcionalmente sustituido por un grupo que se selecciona de entre alquilo C1-C4, alquenilo C1-C4 o alquinilo C1-C4.

4. Uso según la reivindicación 3 donde el compuesto de fórmula (I) se selecciona de entre los siguientes compuestos:

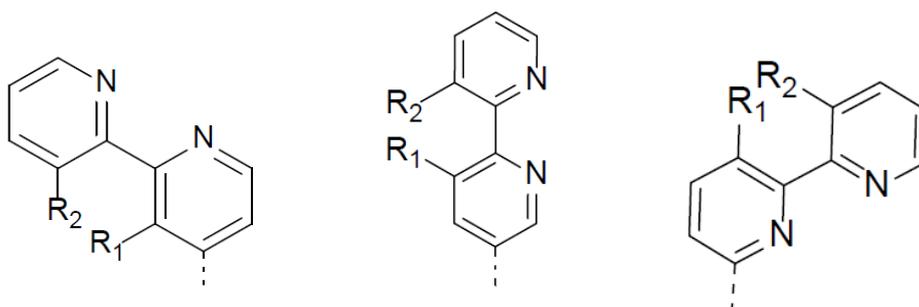


20

5. Uso según la reivindicación 1 donde A es un heteroarilo que se selecciona de entre

piridina o fenantrolina opcionalmente sustituidas por al menos un grupo que se selecciona de entre alquilo C1-C6, alqueno C1-C6 o alquino C1-C6.

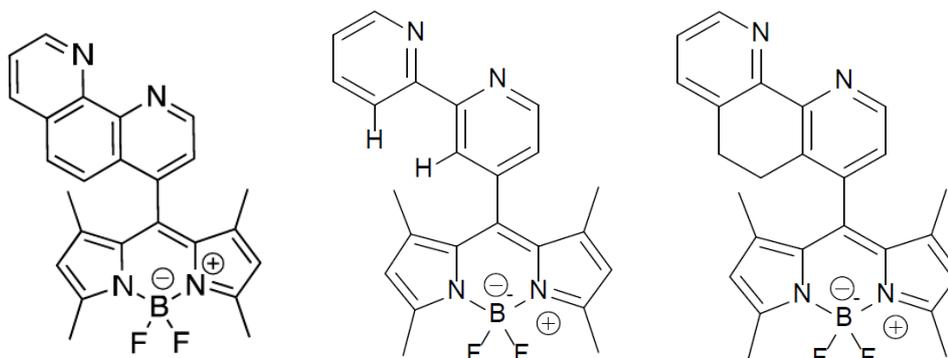
- 5 6. Uso según la reivindicación 5 donde A es una bis-piridina sustituida que se selecciona de entre los siguientes grupos:



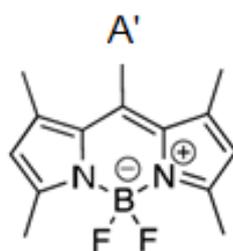
donde R_1 y R_2 se seleccionan independientemente de entre H o alquilo C1-C6 o R_1 y R_2 son grupos $-CH_2-$ unidos mediante enlace sencillo o R_1 y R_2 son grupos $-CH-$ unidos mediante un enlace doble.

10

7. Uso según la reivindicación 6 donde el compuesto de fórmula (I) se selecciona de entre los siguientes compuestos:



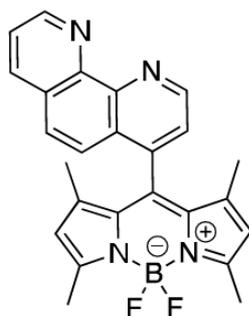
- 15 8. Compuesto de fórmula (II):



(II)

donde A' es un grupo fenantrolina opcionalmente sustituido por al menos un grupo que se selecciona de entre alquilo C1-C6, alqueno C1-C6 o alquino C1-C6.

9. Compuesto según la reivindicación 8 con la siguiente fórmula:



5

10. Kit para la detección en una muestra de una droga que se selecciona de entre escopolamina y/o ketamina y/o cationas que comprende al menos un compuesto de fórmula (I) según se ha definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-9 y una sal de cobre.

10

11. Kit según la reivindicación 10 donde la muestra es una muestra líquida preferiblemente seleccionada de entre saliva, orina, agua, bebidas alcohólicas y no alcohólicas.

15

12. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11 donde la sal de cobre se selecciona de entre nitrato, sales orgánicas como el acetato, haluros o sulfatos.

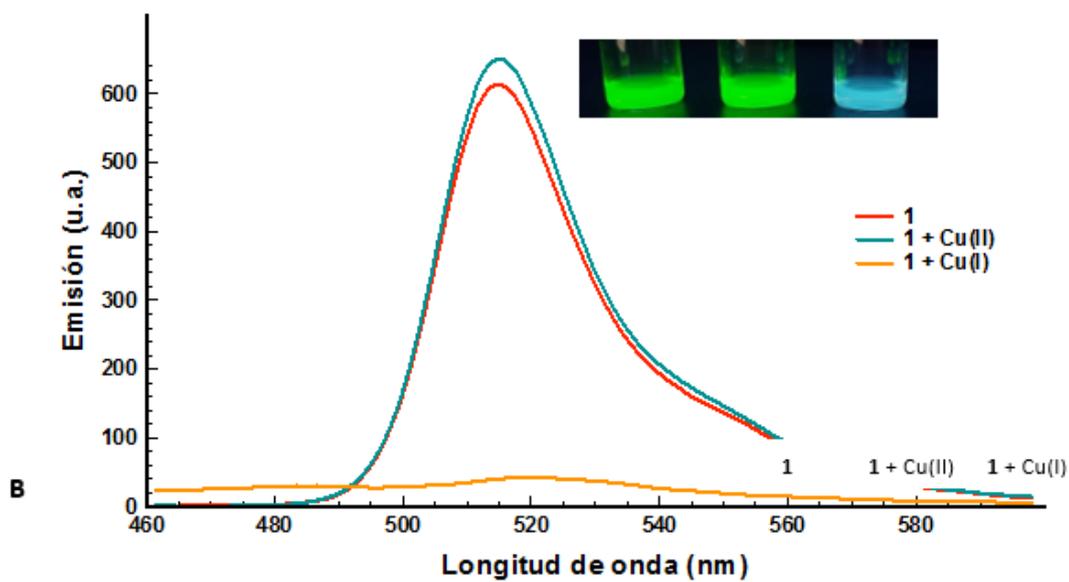
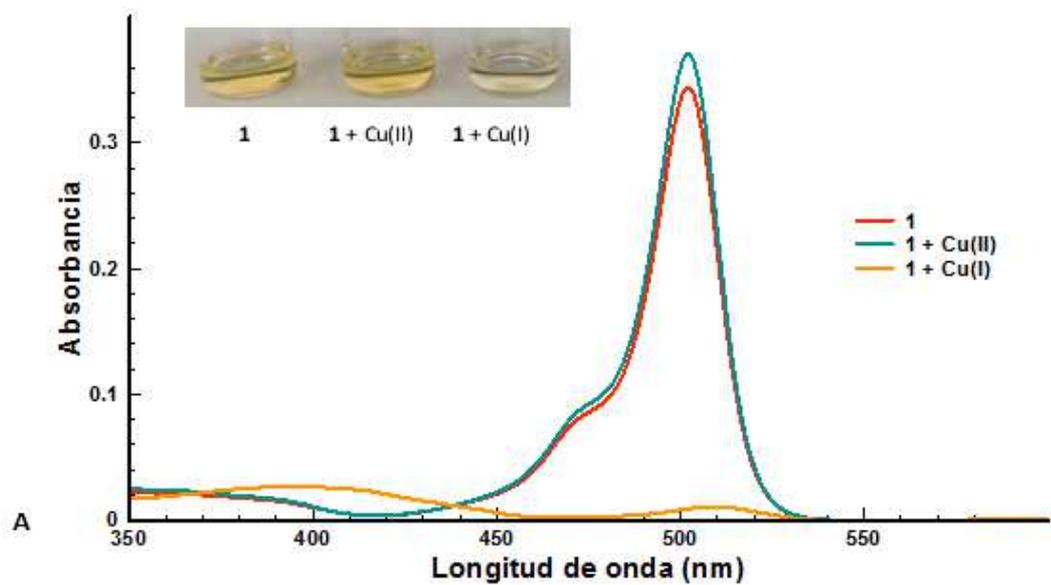


Fig. 1

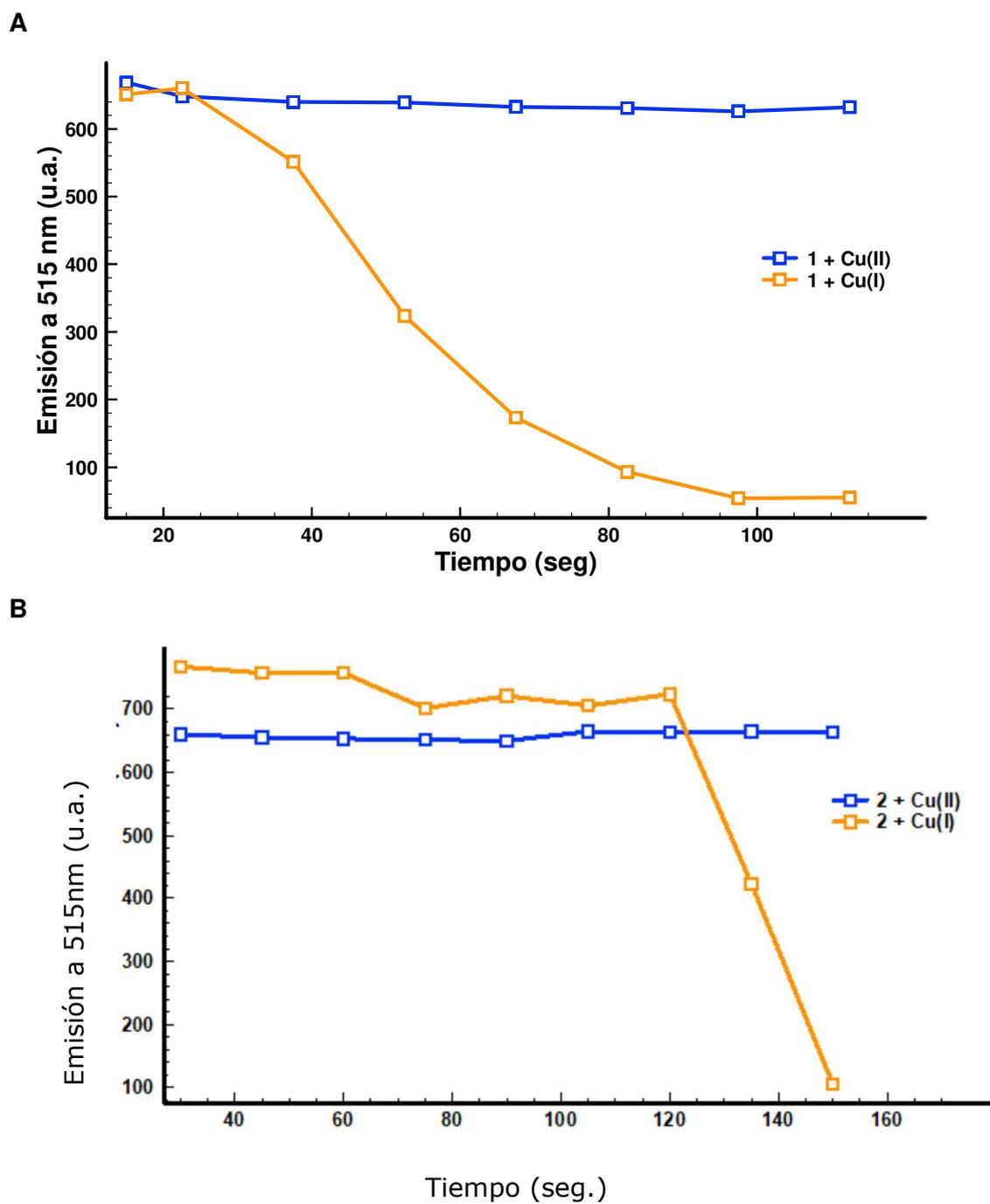


Fig. 2

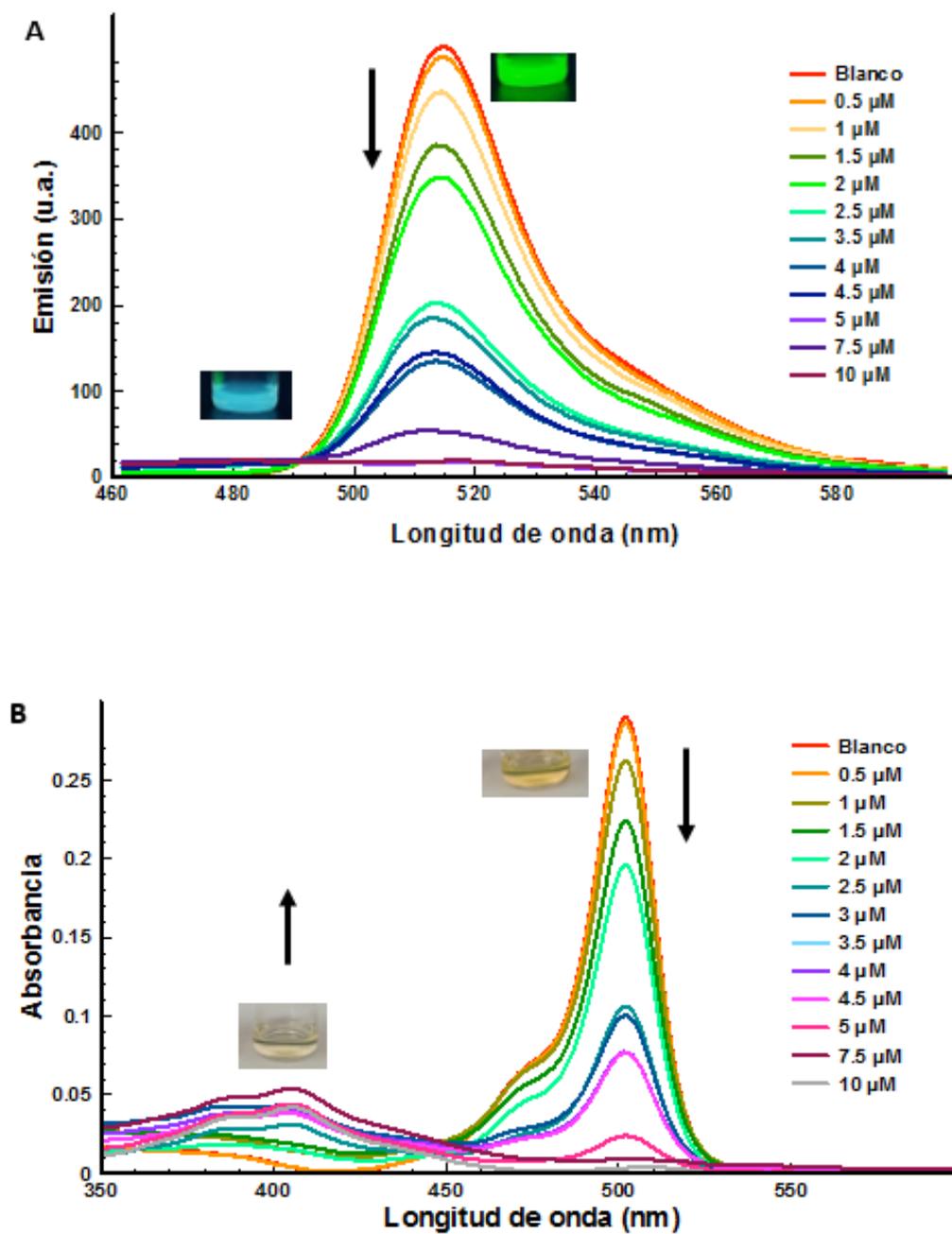


Fig. 3

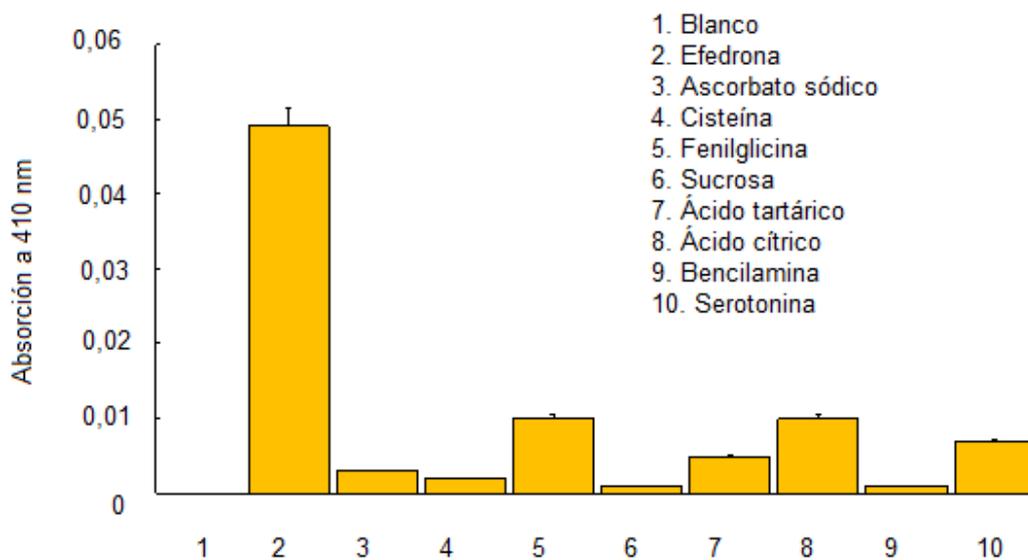


Fig. 4

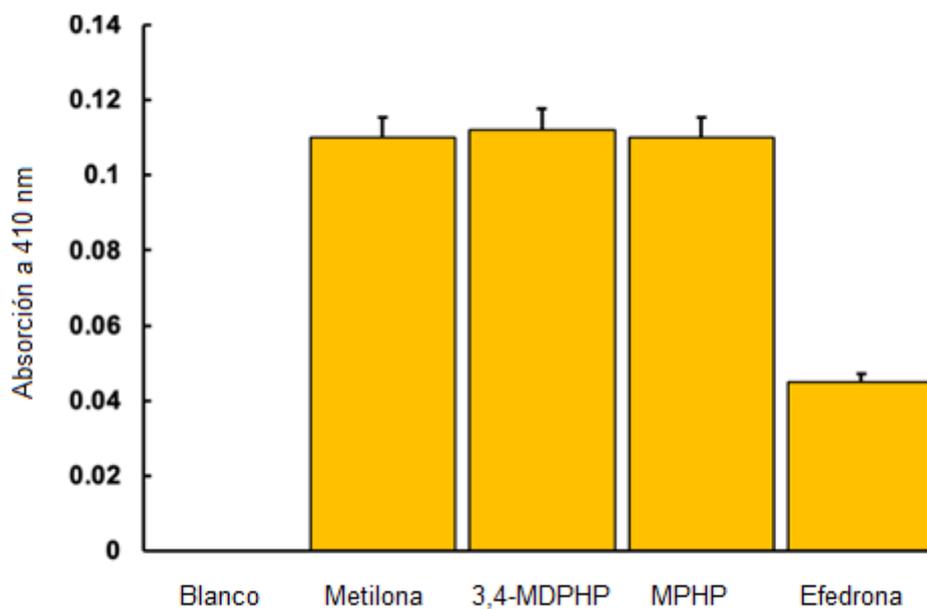


Fig. 5

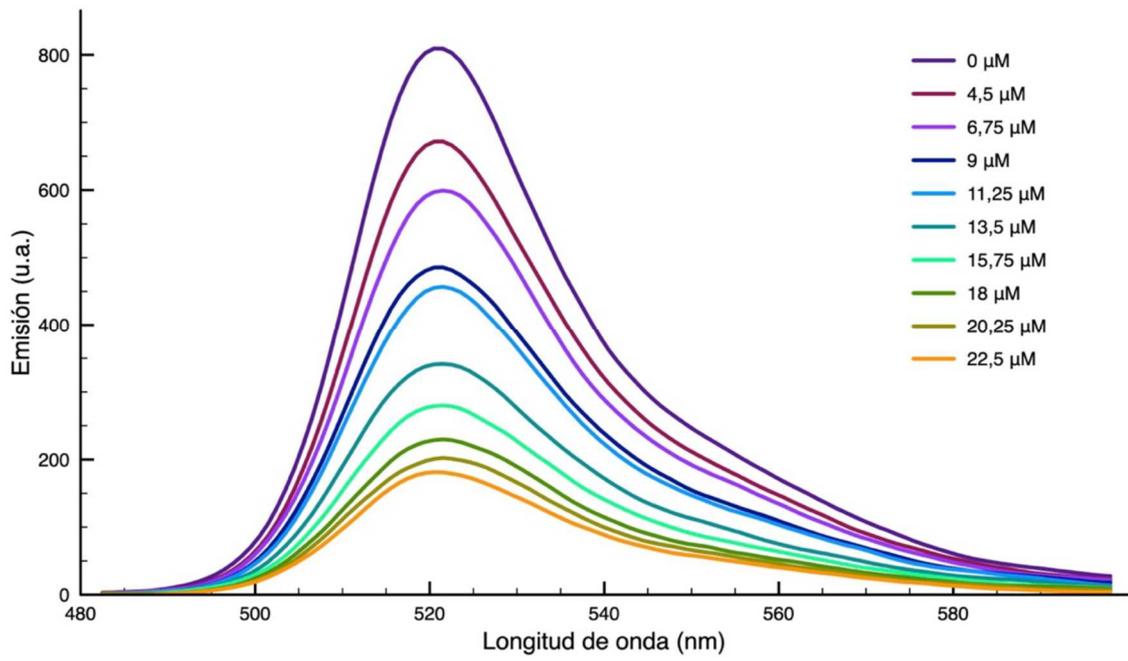


Fig. 6

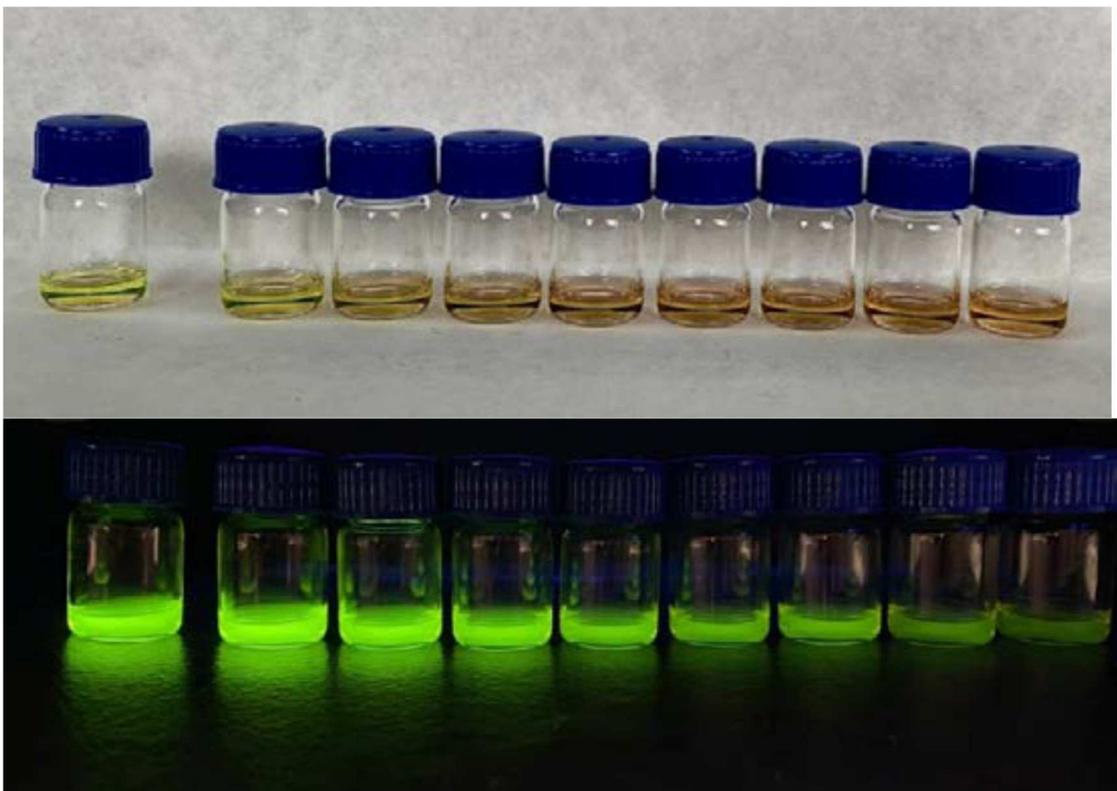


Fig. 7

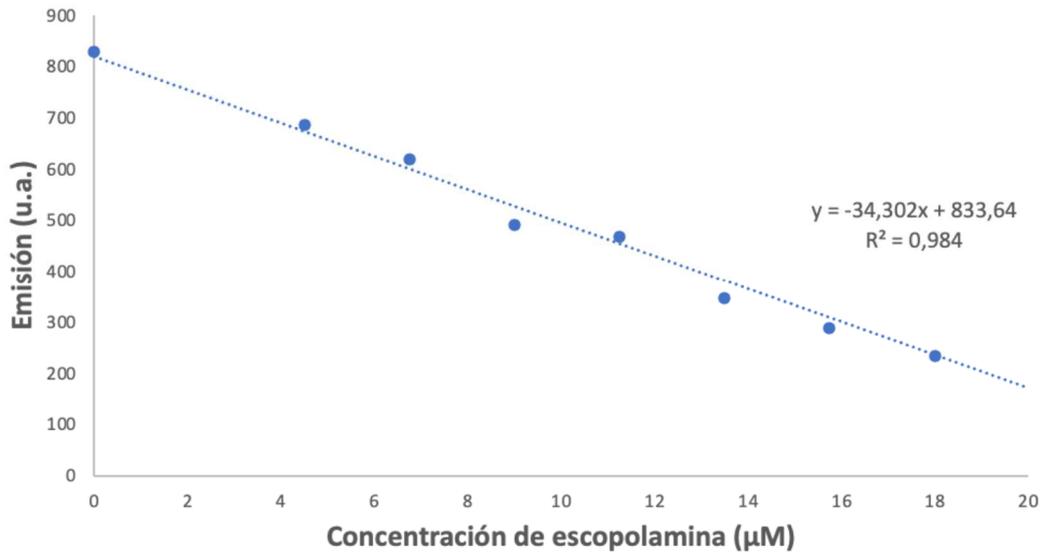


Fig. 8

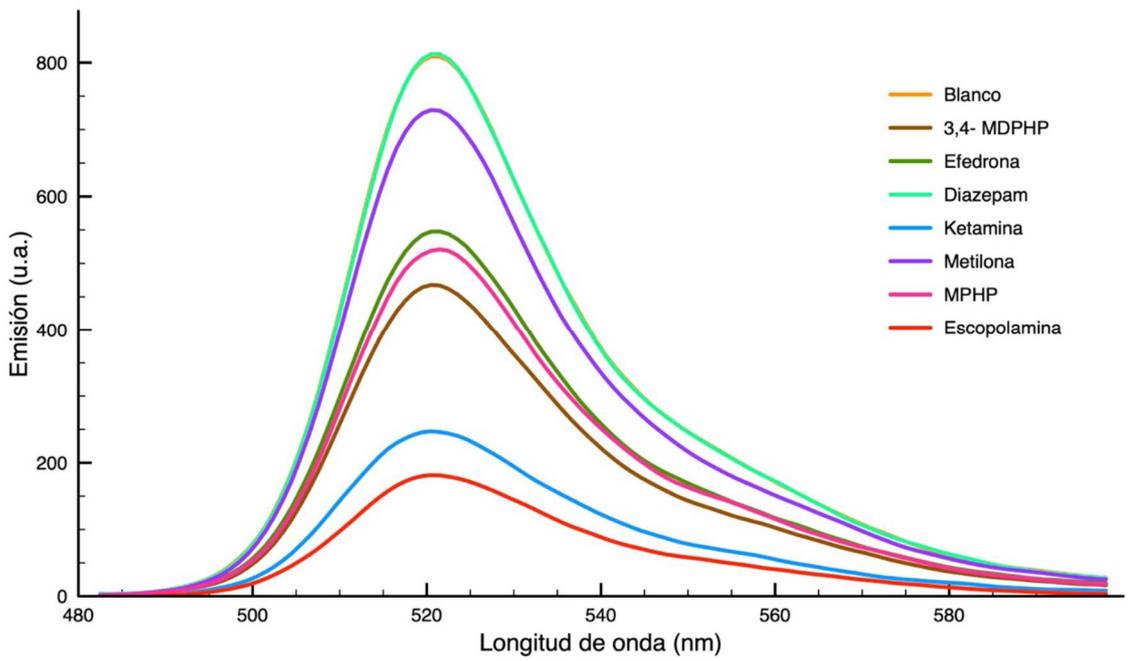


Fig. 9

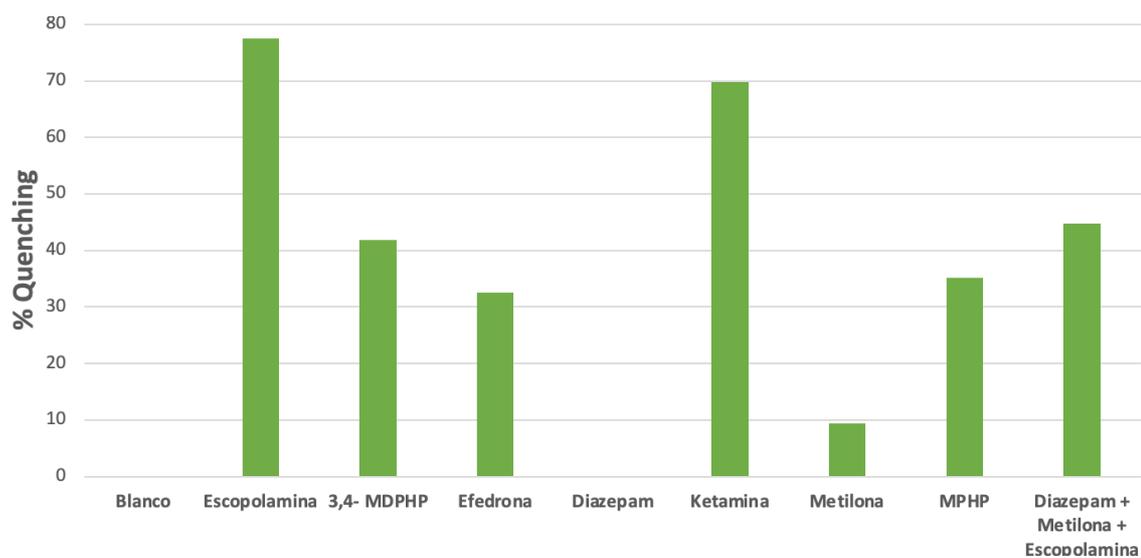


Fig.10

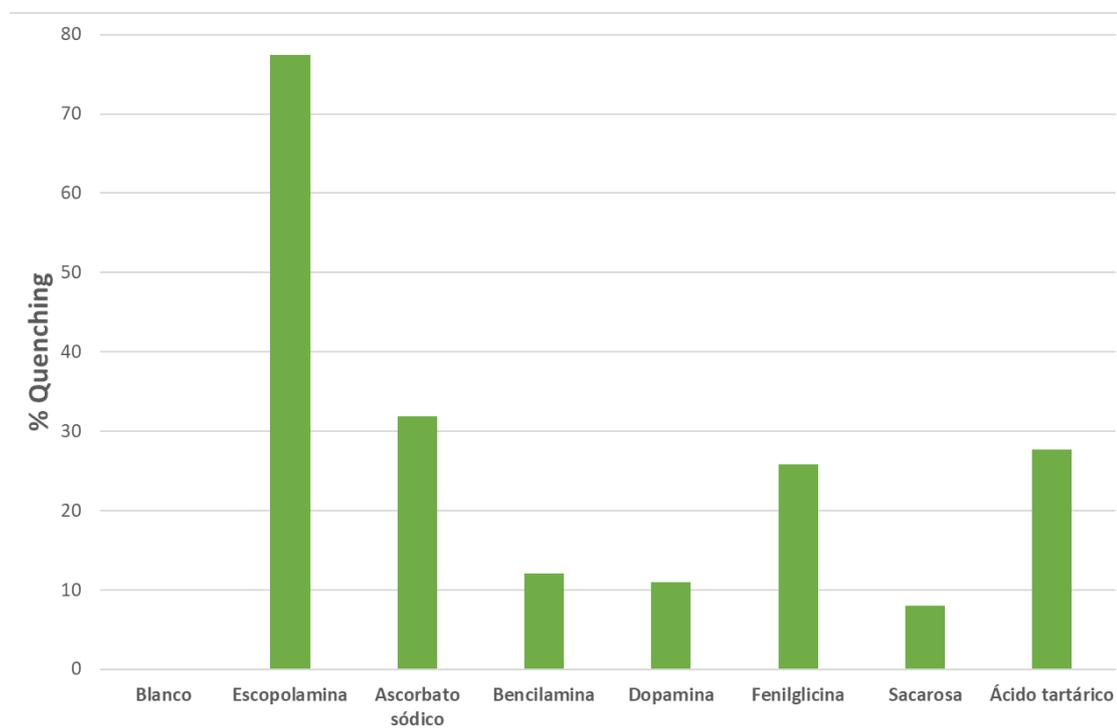


Fig. 11