

Protocolo de tesis de maestría

**Síntesis sustentable de BOSCHIBA
derivadas de aminoácidos,
caracterización química-fotofísica, y
por DFT y aplicación *in vitro***

Pablo E. Alanis González

28 de noviembre de 2023

Universidad Autónoma de Nuevo León, División de
Posgrado

No. de folio	03-97179QMT-23-107
Programa académico	Maestría en Ciencias con Orientación en Química de los Materiales
Línea de Generación y Aplicación del Conocimiento (LGAC)	Materiales moleculares
Lugar de realización	Facultad de Ciencias Químicas, UANL

Dr. Víctor Manuel Jiménez Pérez

Director de tesis

LQI. Pablo Ernesto Alanis
González

Estudiante

Resumen

Se sintetizarán una serie de Bases de Schiff de Boro (*del inglés "Boron Schiff Bases"*) (BOSCHIBA) derivadas de glicina, L-triptófano, L-tirosina y L-fenilalanina. Se caracterizarán por métodos espectroscópicos y se realizarán cálculos *in silico* por medio de Teoría del funcional de la densidad (*del inglés "Density Functional Theory"*) (DFT) y Teoría del funcional de la densidad tiempo-dependiente (*del inglés "Time-Dependant Density Functional Theory"*) (TDDFT) para estudiar las propiedades fotofísicas de los compuestos y comprobar los mecanismos involucrados en el efecto supresor de la luminiscencia en dichos compuestos así como estudios de topológicos sobre los mismos. A su vez, se realizarán estudios de citotoxicidad y tinción *in vitro* para determinar su actividad biológica de los compuestos.

Índice

1	Introducción	1
2	Antecedentes	4
2.1	Análisis crítico de los antecedentes	4
3	Aportación científica	6
4	Hipótesis	7
5	Objetivos y metas	7
5.1	Objetivo general	7
5.2	Objetivos específicos	7
6	Metodología	8
6.1	Materiales	8
6.2	Experimental	8
6.2.1	Síntesis	8
6.2.2	Determinación de propiedades ópticas	9
6.2.3	Determinación de citotoxicidad	9
6.3	Ensayo de tinción celular	9
6.3.1	Modelado molecular	9
6.4	Disposición de residuos	10
6.5	Costos	10
6.5.1	Materiales	11
6.5.2	Reactivos	11
6.5.3	Métodos de caracterización	12
7	Planificación	13

Índice de figuras

1	Diagrama de Gantt de la investigación.	13
---	--	----

Índice de tablas

1	Antecedentes de la investigación.	4
---	---	---

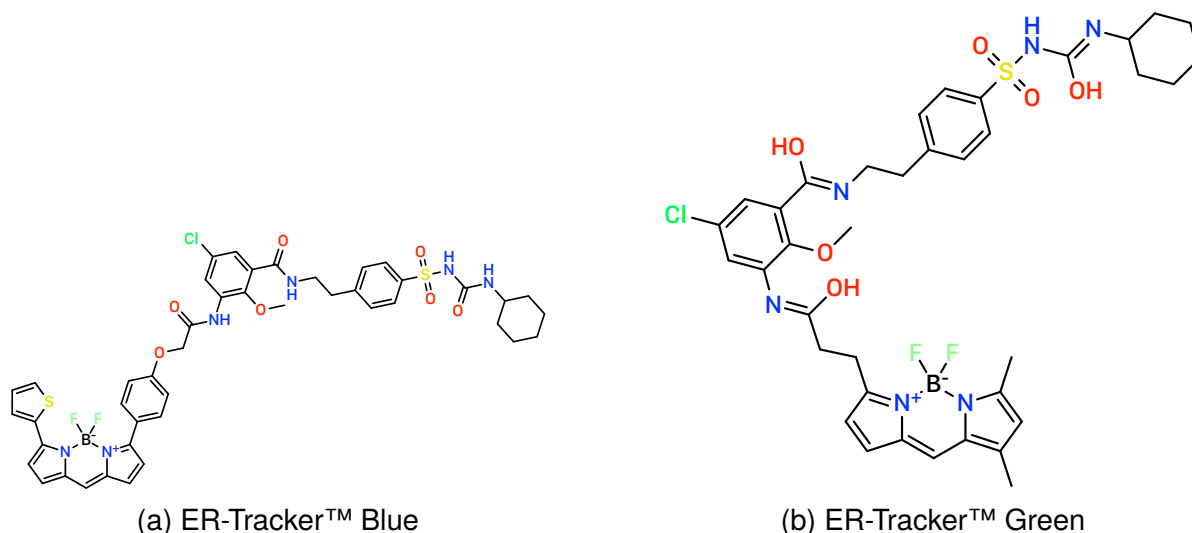
2	Instrumentos de caracterización.	8
3	Residuos.	10
4	Costos de los reactivos.	11
5	Costos de los métodos de cacterización.	12

Índice de esquemas

1	ER-Trackers™	1
2	Compuestos que se sintetizarán en esta investigación.	3
3	Síntesis de las BOSCHIBA por MW	8

1. Introducción

Recientemente, se ha acrecentado el interés por los compuestos fluorescentes de boro debido a su amplio campo de aplicaciones; (1) ya sea en sensores, como en tintas de seguridad, o bien los Dipirrometano de boro *Del inglés “Boron DIPyrromethene”* (BODIPY) comercialmente disponibles utilizados como agentes para la tinción celular, ER-Tracker™ Green y ER-Tracker™ Red (ver esquema 1).



Esquema 1: Los ER-Tracker™ Green y ER-Tracker™ Red de Thermo Fischer Scientific™ son BODIPY comerciales utilizados como agentes para la tinción celular.

Los Rotadores Moleculares Fluorescentes (*Del inglés “Fluorescent Molecular Rotor”*) (FMR) son fluoróforos sensibles a la viscosidad que presentan una rotación libre que se vuelven fluorescentes, o en su defecto, aumentan la fluorescencia solo si su rotación se ve restringida. Algunas interacciones de carácter intramolecular para detener la rotación de los FMR son i. formar interacciones de hidrógeno,(2) ii. a través del impedimento estérico,(3) o iii. por la formación de complejos estables con iones metálicos.(4)

Se ha determinado que la polaridad del solvente y la viscosidad del mismo afectan considerablemente la fluorescencia de los FMR. Esto es porque se limita la tasa de formación del complejo transferencia de carga intramolecular retorcida (*del inglés “twisted intramolecular charge transfer”*) (TICT), el cual se de-exita de forma *no-radiativa*, y se promueve la formación del complejo Local Excitado (*del inglés “locally excited”*) (LE), el cual flúorese. El efecto que tiene la polaridad del solvente, aunque se sabe que es importante, no se ha logrado elucidar de forma aislada a la viscosidad.(5)

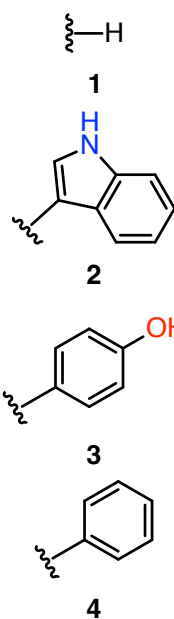
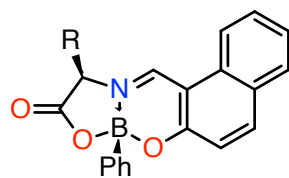
Diferentes estrategias para el diseño de FMR se han propuesto para realizar sensores de viscosidad altamente sensibles, por ejemplo, incorporando grupos rotacionales asimétricos,(6) usando grupos con alta capacidad para rotar,(7) variación de puentes π -conjugados del tipo *push-pull*,(7) la aplicación de rotadores di— o trímeros,(8) y la introducción de dos rotadores distintos con diferentes capacidades rotacionales y electrodonadoras. (9)

Por lo que, obtener tanto una alta eficiencia de fluorescencia como un contraste fluorescente simultáneamente es muy difícil, debido a que, en muchos casos, las moléculas de alto rendimiento cuántico tienen una capacidad de contraste deficiente. El rendimiento cuántico y el contraste de fluorescencia de los FMR están inversamente correlacionados, una relación llamada “intensidad de fluorescencia—contraste”.(10)

En la actualidad existe una amplia variedad de FMR derivados de compuestos de boro, donde los BODIPY y los dioxaborinos son los protagonistas debido a su elevado rendimiento cuántico, sin embargo, muestran algunas desventajas como la síntesis en varias etapas, condiciones de atmósfera anhidra y, en muchas ocasiones, una capacidad de contraste baja, aumentando escasamente el rendimiento cuántico del valor inicial.(7, 11-13)

Recientemente, nuestro grupo de trabajo ha informado sobre la síntesis de BOSCHIBA y su uso como FMR en la detección de viscosidad y la bioimagen de células.(14) Los resultados encontrados indican que los BOSCHIBA pueden aumentar hasta 34 veces su valor de rendimiento cuántico en medios de alta viscosidad, sin embargo, a pesar de teñir selectivamente el citoplasma en las células de melanoma, presentaron un bajo teñido atribuido principalmente a la baja solubilidad de los compuestos.

Con el propósito de mejorar el contraste de fluorescencia y la bioimagen celular, se diseñó una serie de BOSCHIBA derivados de aminoácidos (ver esquema 2). Estas BOSCHIBA están diseñadas de tal manera que presenten una rotación libre a través del anillo fenilborónico, y se espera que los aminoácidos que se incorporarán a la estructura podrían resultar en una mayor permeabilidad de membranas celulares. Los compuestos de boro fluorescentes BO-Gly **1**, BO-Trp **2**, BO-Tyr **3** y BO-Phe **4** se sintetizarán por una reacción multicomponente en Microondas (*del inglés “Microwave”*) (MW) con el objetivo de tener altos rendimientos químicos en un tiempo de reacción corto. Este método resulta más eficiente y rápido en comparación con BOSCHIBA similares reportadas en la literatura, producidos por métodos convencionales.



Esquema 2: Compuestos que se sintetizarán en esta investigación.

2. Antecedentes

Tabla 1: Antecedentes de la investigación.

Investigación	Aportación(es)	Referencia
«Organotin Schiff Bases as Halofluorochromic Dyes: Green Synthesis, Chemio-Photophysical Characterization, DFT, and Their Fluorescent Bioimaging <i>in Vitro</i> »	Síntesis por MW de BOSCHIBA con Sn	(15)
«New Luminescent Organoboron Esters Based on Damnacanthal: One-Pot Multicomponent Synthesis, Optical Behavior, Cytotoxicity, and Selectivity Studies against MDA-MBA-231 Breast Cancer Cells»	Síntesis de BOSCHIBA por reacción <i>one-pot</i> multicomponente (3-MCR)	(16)
«Far-Red and Near-Infrared Boron Schiff Bases (BOSCHIBAs) Dyes Bearing Anionic Boron Clusters»	Síntesis de BOSCHIBA con clusters de boro	(17)
«Organoboron Schiff Bases as Cell-Staining Fluorescent Probes: Synthesis, Chemio-photophysical Characterization, DFT, and X-ray Structures: BOSCHIBAs, Low Cytotoxicity, High Photostability, Bioimaging»	Síntesis de BOSCHIBA y su uso como sondas fluorescentes	(1)
«One-Pot Microwave-Assisted Synthesis of Organotin Schiff Bases: An Optical and Electrochemical Study towards Their Effects in Organic Solar Cells»	Síntesis <i>one-pot</i> de BOSCHIBA	(18)
«Synthesis, Characterization, Photophysical Properties of New Fluorescent Boron Schiff Bases (BOSCHIBAs) and Their Application as Cytoplasm Staining Dyes <i>in Vitro</i> »	Síntesis de BOSCHIBA y su aplicación para teñir citoplasma	(19)

2.1. Análisis crítico de los antecedentes

En la investigación conducida por Corona-López *et al.* (19) se detalla la preparación de BOSCHIBA y su potencial aplicación como agente de tinción citoplasmática *in vitro*; en esta investigación se sintetizó el producto por una reacción de condensación entre 2-hidroxi-1-etil naftaldehído con derivados de anilina. Se encontró en este proyecto que al incorporar sustituyentes voluminosos, mejoraba la estabilidad de las BOSCHIBA.

Ibarra-Rodríguez *et al.* (1) investigaron la aplicación de BOSCHIBA en fluorescencia y bioimagen celular. Por su respuesta a la viscosidad, resultante en un aumento en el rendimiento cuántico, se propuso su uso para detección de células cancerígenas. Los autores mencionan que es importante para diseñar marcadores citoplasmáticos que sean fluorescentes, con propiedades fotofísicas adecuadas, fotoestables, con baja citotoxicidad y solubles en solventes polares para ser usados en biología celular moderna *in vitro* y *in vivo*; en esta investigación se lograron teñir las células cancerígenas

B16F10, sin embargo, el teñido del citoplasma fue bajo, atribuido principalmente a la baja solubilidad de los compuestos; por lo que en esta investigación se propone la síntesis de BOSCHIBA derivada de aminoácidos, con el fin de mejorar la solubilidad de los compuestos y lograr un mejor teñido del citoplasma.

Corona-López *et al.* (17) propone la preparación de BOSCHIBA a partir de la condensación de 2-Hidroxi-1-naftaldehído **5** con la amina correspondiente; en esta investigación obtuvieron buenos rendimientos (85 % a 90 %), sin embargo el tiempo de reacción fue de 48 h, por lo que llevar a cabo esta síntesis por medio de MW en lugar de por reflujo convencional podría resultar en un menor tiempo de reacción.

El estudio realizado por García-López *et al.* (16) detalla la síntesis de BOSCHIBA tetracoordinados vía una reacción de condensación de tres componentes con rendimientos elevados 80 % a 90 % en un tiempo de reacción de 20 min.

En una investigación donde se preparan bases de Schiff basadas en Sn realizada por López-Espejel *et al.* (15) se conduce la reacción por medios convencionales de calentamiento y por MW; el tiempo de reacción se vio drásticamente reducido, de 24 h a 3 min, y los rendimientos mejoraron. En este estudio también se evaluó el uso de bases de Schiff basadas en Sn como agentes de tinción celular y se encontró que tienen baja citotoxicidad y buena capacidad de tinción.

3. Aportación científica

Plantear una metodología para la síntesis de BOSCHIBA fluorescentes, con un alto rendimiento cuántico y un buen contraste de fluorescencia en medios de alta viscosidad, a partir de aminoácidos, así como su aplicación en la tinción celular. También se realizarán estudios *in silico* para determinar las propiedades fotofísicas de los compuestos.

4. Hipótesis

La incorporación de aminoácidos en la estructura de BOSCHIBA sintetizadas a partir de 2-Hidroxi-1-naftaldehído **5** y ácido fenil borónico **6** mejorarán la permeabilidad de dichos compuestos en las membranas celulares a estudiar con propósitos de tinción, y los compuestos presentan un alto rendimiento cuántico de fluorescencia que asimismo será dependiente a la microviscosidad del medio, lo que permitirá su uso como sensores de viscosidad, con aplicación en la determinación de células cancerígenas.

5. Objetivos y metas

5.1. Objetivo general

Realizar la síntesis de una serie de BOSCHIBA con su posible aplicación en tinción celular y estudiar sus propiedades fotofísicas por medio de cálculos *in silico*.

5.2. Objetivos específicos

- **Sintetizar** una serie de BOSCHIBA derivadas de L-triptófano **7**, L-fenilalanina **8**, L-tirosina **9** y glicina **10**;
- **Elucidar** los posibles mecanismos involucrados en el efecto supresor de fluorescencia en BO-Trp **2** por medio de cálculos *in silico* en TDDFT;
- **Determinar** las propiedades ópticas de los compuestos sintetizados en medios de viscosidad variable;
- **Evaluar** la aplicación de las BOSCHIBA sintetizadas en la tinción celular y su posible aplicación en la detección de células cancerígenas;
- **Caracterizar** los compuestos sintetizados por espectrofotometría UV-Vis, espectrofluorimetría, Difracción de Rayos X (*del inglés "X-Ray Diffraction"*) (XRD) y Resonancia Magnética Nuclear (*del inglés "Nuclear Magnetic Resonance"*) (NMR) (^1H -NMR, ^{11}B -NMR, ^{13}C -NMR);

6. Metodología

6.1. Materiales

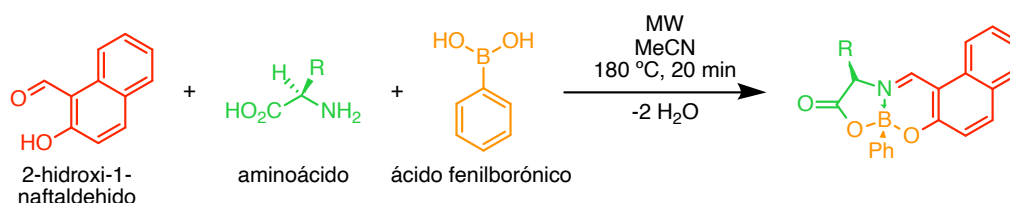
Tabla 2: Equipos que se utilizarán para la caracterización de los compuestos de esta investigación.

Instrumento	Marca y modelo	Locación
Espectrofotómetro	Perkin-Elmer, Lambda 365	FCQ
Espectrofluorímetro	Horriba Scientificm, Fluorolog-3	FCQ
Sistema LC/MS/MS	EMAR, AB Sciex API 2000	CINVESTAV—IPN (DF)
Difractómetro de rayos X	Bruker, SMART APEX CCD	CINVESTAV—IPN (DF)
NMR (^1H -NMR, ^{11}B -NMR, ^{13}C -NMR)	Bruker, Avance DPX 400	Facultad de Medicina, UANL
Microscopio confocal	—	Facultad de Biología, UANL

6.2. Experimental

6.2.1. Síntesis

Se llevará a cabo la síntesis de los compuestos **1-4** (ver esquemas 2 y 3) utilizando condiciones de reacción ecológicas y materiales de partida accesibles. Se optimizarán los parámetros de reacción para obtener rendimientos elevados y selectividad adecuada.



Esquema 3: Método de síntesis para las BOSCHIBA **1-4** por MW.

6.2.2. Determinación de propiedades ópticas

Se determinará el rendimiento cuántico de los compuestos **11**, así como su contraste de fluorescencia en medios de viscosidad variable, controlado por la adición de glicerol en diferentes proporciones.

6.2.3. Determinación de citotoxicidad

Se determinará la citotoxicidad de los compuestos **1-4** en la línea celular de melanoma murino *B16F10* (ATCC® CCL-6475™) derivado de ratón C57BL/6J. Se incubarán las células por 24 h a 37 °C y 5 % de CO₂ en medio de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) con 10 % de suero fetal bovino (FBS) y 1 % de antibiótico/antimicótico (penicilina, estreptomicina y anfotericina B), según las indicaciones del fabricante.

6.3. Ensayo de tinción celular

Se sembrarán las células *B16F10* en placas de cultivo de 96 pozos a una densidad de 1.5×10^5 cell/pozo en 100 µL de medio de cultivo DMEM. Después de incubarse por 24 h a 37 °C y 5 % de CO₂, se retirará el medio de cultivo y se lavarán las células con 100 µL de *PBS* (1 % de EDTA y 0.5 % de BSA en *PBS*). Se añadirá colorante Hoechst según las indicaciones del fabricante. Después las células serán fijadas con 100 µL de PFA al 4 % en *PBS* por 15 min a 37 °C y 5 % de CO₂. Se hará el ensayo por microscopía de fluorescencia.

6.3.1. Modelado molecular

Se realizarán cálculos *in silico* por medio de DFT y TDDFT para estudiar las propiedades fotofísicas de los compuestos y comprobar los mecanismos involucrados en el efecto supresor de la luminiscencia en dichos compuestos así como estudios de topológicos sobre estos.

6.3.1.1. Preoptimización En caso de no contar con datos cristalográficos en el momento del estudio *in silico*, se hará una búsqueda conformacional con ayuda del programa *Conformer-Rotamer Ensemble Sampling Tool* (CREST) (20) para obtener los conformeros más estables de los compuestos.

En caso de que se cuenten con datos cristalográficos, se utilizarán las coordenadas de la estructura cristalográfica para realizar la optimización geométrica en DFT.

6.3.1.2. Optimización geométrica Se hará la optimización geométrica de los compuestos **1-4** empleando el funcional meta-GGA r^2 SCAN-3c¹ (21) hasta llegar a un nivel de teoría de DFT/def2-TZVP, o superior en caso de que sea necesario.

6.3.1.3. Obtención de espectro de emisión Se obtendrá el espectro de emisión de los compuestos **1-4** por medio de cálculos TDDFT con el funcional ω B97X-V y con el fin de aproximarse al límite CBS, se requiere de aumentación con funciones difusas dobles, por lo que se usará el conjunto de funciones base def2-TZVPD o def2-QZVPPD si es necesario obtener estados de Rydberg.

6.4. Disposición de residuos

Tabla 3: Residuos que se generarán derivados de esta investigación.

Residuo	Tipo	Disposición
MeOH, hexano	Solventes orgánicos	C
DCM, Cloroformo	Solventes orgánicos halogenados	C
Sales inorgánicas	Sales	A

6.5. Costos

Se estima un costo aproximado de 70 000.00 MXN para la realización de esta investigación, el cual se desglosa en las cuadros 4 y 5.

¹La selección de este funcional para la optimización geométrica se debe a su desempeño comparable o superior con funcionales híbridos meta-GGA como M06-2X-D3(0)/TZP que costarían más tiempo de cómputo, así como su inclusión de correcciones relativistas como ECP y corrección para dispersión y su buen desempeño con el *benchmark* LMGB35 (Enlaces ligeros del grupo principal) y ROT34 (constantes rotacionales de moléculas orgánicas pequeñas)

6.5.1. Materiales

El costo de los materiales para la preparación de las muestras y para el estudio *in silico* no se incluye en el costo total de la investigación, ya que estos se encuentran disponibles en los laboratorios de la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL y en el CINVESTAV.

6.5.2. Reactivos

Todos los reactivos en la cuadro 4 se adquirirán en la empresa Merck KGaA.

Tabla 4: Costos de los reactivos. (*Costos aproximados*)

Reactivo	CAS	Cantidad	Costo total (MXN)
L-triptófano 7	73-22-3	25 g	1017.00
L-fenilalanina 8	63-91-2	25 g	971.00
L-tirosina 9	60-18-4	50 g	2223.00
glicina 10	56-40-6	500 g	764.00
ácido fenil borónico 6	98-80-6	50 g	2359.00
2-Hidroxi-1-naftaldehido 5	708-06-5	100 g	1769.00
Total			9093.00

6.5.3. Métodos de caracterización

Tabla 5: Costos de los métodos de cacterización. (*Costos aproximados*)

Análisis	Muestras	Costo unitario (MXN)	Costo total (MXN)
XRD	4	800.00	3200.00
NMR	4	2250.00	9000.00
FTIR	4	700.00	2800.00
UV-Vis	4	500.00	2000.00
LC/MC/MS	4	800.00	3200.00
Espectrofluorímetro	4	500.00	2000.00
Total			22 200.00

7. Planificación

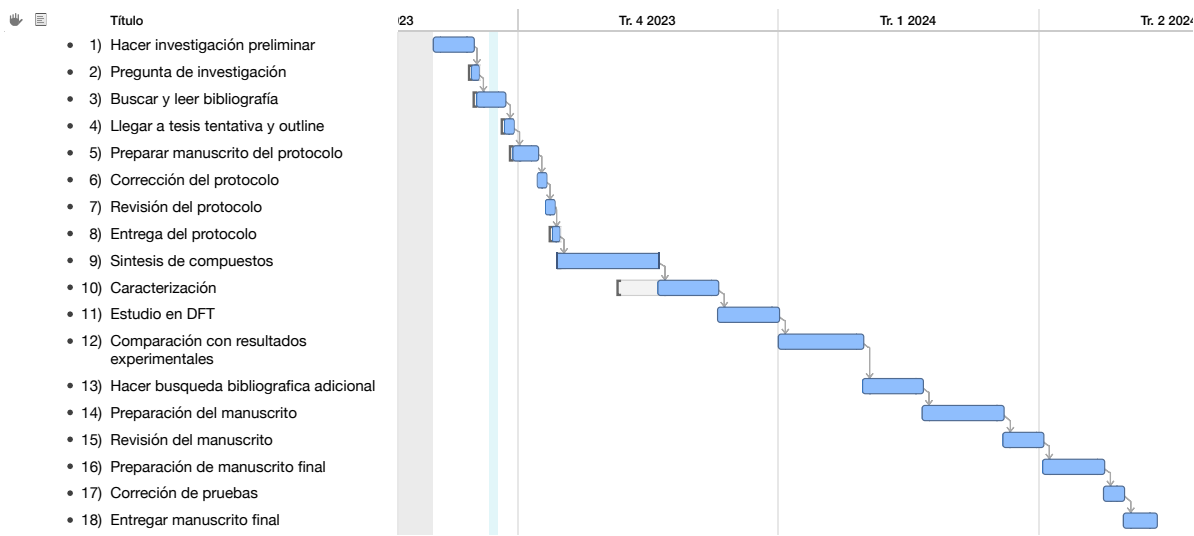


Figura 1: Diagrama de Gantt de la investigación.

- 1 BO-Gly
- 2 BO-Trp
- 3 BO-Tyr
- 4 BO-Phe
- 5 2-Hidroxi-1-naftaldehido
- 6 ácido fenil borónico
- 7 L-triptófano
- 8 L-fenilalanina
- 9 L-tirosina
- 10 glicina
- 11

Glosario

BODIPY Dipirrometano de boro *Del inglés “Boron DIPYrromethene”*. 1, 2

BOSCHIBA Bases de Schiff de Boro *(del inglés “Boron SCHiff Bases”)*. II, 2, 4–8

CREST *Conformer-Rotamer Ensemble Sampling Tool*. 9

DFT Teoría del funcional de la densidad *(del inglés “Density Functional Theory”)*. II, 9

FMR Rotores Moleculares Fluorescentes *(Del inglés “Fluorescent Molecular Rotor”)*. 1, 2

LE Local Excitado *(del inglés “locally excited”)*. 1

MW Microondas *(del inglés “Microwave”)*. 2, 4, 5, 8

NMR Resonancia Magnética Nuclear *(del inglés “Nuclear Magnetic Resonance”)*. 7, 8

TDDFT Teoría del funcional de la densidad tiempo-dependiente *(del inglés “Time-Dependant Density Functional Theory”)*. II, 7, 9, 10

TICT transferencia de carga intramolecular retorcida *(del inglés “twisted intramolecular charge transfer”)*. 1

XRD Difracción de Rayos X *(del inglés “X-Ray Diffraction”)*. 7

Referencias

1. M. Ibarra-Rodríguez *et al.*, *Appl Organometal Chem* **33**, e4718, ISSN: 02682605 (abr. de 2019).
2. Y. Wu *et al.*, *Nat Commun* **9**, 1953, ISSN: 2041-1723 (16 de mayo de 2018).
3. A. Faulkner, T. Van Leeuwen, B. L. Feringa y S. J. Wezenberg, *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 13597-13603, ISSN: 0002-7863, 1520-5126 (19 de oct. de 2016).
4. R. Yadav *et al.*, *New J. Chem.* **43**, 7109-7119, ISSN: 1144-0546, 1369-9261 (2019).
5. M. Haidekker, T. Brady, D. Lichlyter y E. Theodorakis, *Bioorganic Chemistry* **33**, 415-425, ISSN: 00452068 (dic. de 2005).
6. S.-C. Lee *et al.*, *Chem. Commun.* **52**, 13695-13698, ISSN: 1359-7345, 1364-548X (2016).
7. J. Karpenko *et al.*, *J. Mater. Chem. C* **4**, 3002-3009, ISSN: 2050-7526, 2050-7534 (2016).
8. J. D. Kimball *et al.*, *RSC Adv.* **5**, 19508-19511, ISSN: 2046-2069 (2015).
9. S. L. Raut *et al.*, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **18**, 4535-4540, ISSN: 1463-9076, 1463-9084 (2016).
10. S.-C. Lee *et al.*, *Chemistry A European J* **24**, 13688-13688, ISSN: 0947-6539, 1521-3765 (18 de sep. de 2018).
11. N. Gupta *et al.*, *J. Mater. Chem. B* **4**, 1968-1977, ISSN: 2050-750X, 2050-7518 (2016).
12. L.-L. Li *et al.*, *Anal. Chem.* **90**, 5873-5878, ISSN: 0003-2700, 1520-6882 (1 de mayo de 2018).
13. E. Kim *et al.*, *Org. Biomol. Chem.* **14**, 1311-1324, ISSN: 1477-0520, 1477-0539 (2016).
14. M. Ibarra-Rodríguez *et al.*, *J. Org. Chem.* **82**, 2375-2385, ISSN: 0022-3263, 1520-6904 (3 de mar. de 2017).
15. M. López-Espejel *et al.*, *J. Mater. Chem. B* **9**, 7698-7712, ISSN: 2050-750X, 2050-7518 (2021).
16. M. C. García-López *et al.*, *New J. Chem.* **46**, 20138-20145, ISSN: 1144-0546, 1369-9261 (2022).
17. M. M. Corona-López, B. M. Muñoz-Flores, M. Chaari, R. Nuñez y V. M. Jiménez-Pérez, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2021**, 2047-2054, ISSN: 1434-1948, 1099-0682 (7 de jun. de 2021).
18. A. M. Cantón-Díaz *et al.*, *New J. Chem.* **42**, 14586-14596, ISSN: 1144-0546, 1369-9261 (2018).

19. M. M. Corona-López *et al.*, *Journal of Organometallic Chemistry* **852**, 64-73, ISSN: 0022328X (dic. de 2017).
20. P. Pracht, F. Bohle y S. Grimme, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **22**, 7169-7192, ISSN: 1463-9076, 1463-9084 (2020).
21. T. Gasevic, J. B. Stückrath, S. Grimme y M. Bursch, *J. Phys. Chem. A* **126**, 3826-3838, ISSN: 1089-5639, 1520-5215 (16 de jun. de 2022).