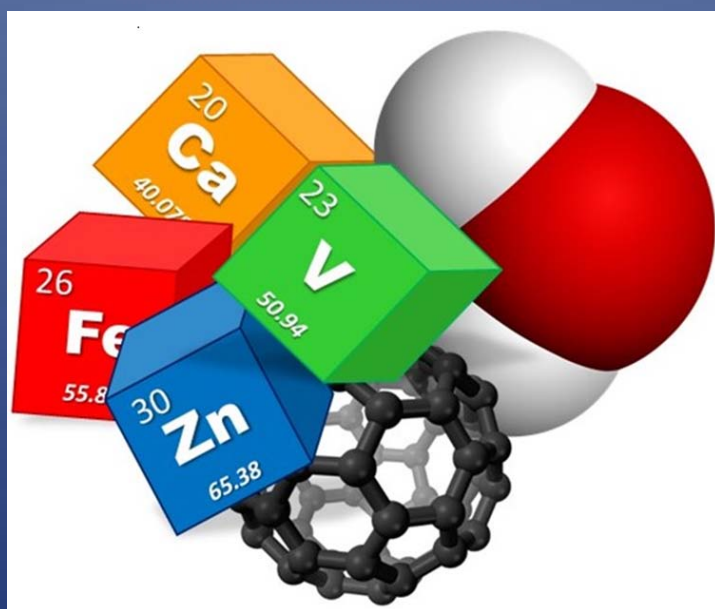


Vol. 110 N° 2



ISSN 2545-8655

# ANALES DE LA ASOCIACIÓN QUÍMICA ARGENTINA



Enero - Diciembre 2023

# Anales de la Asociación Química Argentina

*Editada desde 1913*

**Director:**

Dr. Alberto Lazarowski

**Vicedirectora Ejecutiva**

Dra. Marisa Gabriela Repetto

**Editor:** Dr. Arturo A. Vitale

**Comité Asesor de Dirección  
de la Revista**

Dr. Alan Talevi

Dr. Pablo Duchowicz

**Comité Editorial**

Dra. Alicia Fernández  
Cirelli

Dra. Alicia B. Pomilio

Dr. Ángel Alonso

Dra. Norma B. D'Accorso

Dr. Alberto L. Capparelli

Dr. Arturo A. Vitale

**Comité Académico Asesor**

Dra. Aida Ben Altabef - Universidad Nacional de Tucumán - INQUINOA-CONICET

Dr. Ernesto Calvo – INQUIMAE (UBA-CONICET)

Dr. José Luis Crudo - Jefe Div. Radiofarmacia Básica y aplicada-CNEA

Dr. Carlos O. Della Védova – CEQUINOR (UNLP-CONICET)

Dra. Rosa Erra-Balsells – CIHIDECAR (UBA-CONICET)

Dra. Susana A. Larrondo - UNIDEF-MINDEF-CONICET

Dra. Marta Litter – CNEA–CONICET

Dra. Alicia Penissi – Instituto de Histología y Embriología “Dr. Mario H. Burgos”

Dr. Gustavo Romanelli - Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias  
Aplicadas

Dr. Rolando Spanevello – Instituto de Química de Rosario (UNR-CONICET)

Dra. Noemí E. Walsøe de Reca - UNIDEF-MINDEF-CONICET

Dr. Roberto J. J. Williams – INTEMA (UNMdP-CONICET)

**Comité Científico Internacional**

Prof. Sylvio Canuto - Instituto de Física da Universidade de São Paulo, Brasil

Prof. Juan M. Diez Tascón - Instituto Nacional del Carbón, INCAR-CSIC, Oviedo, España

Prof. José Elguero - Instituto de Química Médica, Cons. Sup. de Inv. Cient., Madrid,

España Prof. Ivan Gutman - Physical Chemistry, University of Kragujevac, Kragujevac,

Serbia Prof. Arsenio Muñoz de la Peña - Universidad de Extremadura, Badajoz, España

Prof. Emeritus Francisco Tomás Vert - University of Valencia,

España Registro de Propiedad Intelectual N° 164.756

**Asociación Química Argentina**

Sánchez de Bustamante 1749, 1425 Buenos Aires, Argentina

Tel./FAX: 54-11-4822-4886

## Contenido

Vol. 110 Nº 2, Julio-Diciembre de 2023

<b>CONTENIDO</b>	<b>Pág.</b>
Editorial..... <i>Alicia Beatriz Pomilio</i>	7 - 7
<i>In Memoriam: Prof. Dr. Eduardo Alberto Castro (1944-2023).....</i> <i>Comisión Directiva de la Asociación Química Argentina</i>	8 - 10
Sobre el Dr. Castro..... <i>Nélida M. Peruchena</i>	11 - 11
Premio “Consagración” AQA “Dr. Juan J. J. Kyle 2023”: Máxima distinción en Química que otorga AQA..... <i>Norma Sbarbati Nudelman</i>	12 - 14
Premio “Consagración” AQA “Dr. Luis Federico Leloir 2023” en Investigación en Química Biológica..... <i>Juana María Pasquini</i>	15 - 17
Premio “Consagración” AQA “Dr. Horacio Damianovich 2023” en Investigación en Química Inorgánica..... <i>Aída Ben Altabef</i>	18 - 22
Desarrollo de modelos teóricos de nanoestructuras bimetalicas para la electrocatálisis del hidrógeno..... <i>Erica Daniela Schulte</i>	23 - 32
Impacto terapéutico en enfermedades mentales y neurodegenerativas de 5-metoxi- <i>N,N</i> -dimetilriptamina (5-MeO-DMT) como agonista natural del receptor <i>sigma</i> 1 a través de la activación mitocondrial .....	33 - 59
<i>Milena Batalla</i>	
Intoxicaciones por ingestión del hongo superior <i>Amanita phalloides</i> que crece en Argentina. Fases clínicas, diagnóstico y tratamiento..... <i>Alicia B. Pomilio, Stella M. Battista, Arturo A. Vitale y Ángel Alonso</i>	60 - 81

Método sencillo y rápido para detección y cuantificación de amanitinas, por electroforesis capilar automatizada de alta resolución en orina.....	<b>82 - 96</b>
<i>Arturo A. Vitale, Stella M. Battista, Ángel Alonso y Alicia B. Pomilio</i>	
Diseño y síntesis de nuevos materiales poliméricos con la incorporación de biocompuestos, para su aplicación como recubrimientos.....	<b>97 - 102</b>
<i>Mariana Allasia</i>	
Desde semillas nutritivas a alimentos complejos: Marcadores de autenticidad y estabilidad de componentes bioactivos a lo largo de la cadena de producción.....	<b>103 - 117</b>
<i>Federico Iván Brigante</i>	
Estudio estructural y espectroscópico de derivados bencénicos nitrogenados y clorados con actividades biológicas antagónicas	<b>118 - 129</b>
<i>María Victoria Elizabeth Castillo Scheuermann</i>	
Estructura y espectroscopía de agregados iónicos entre cationes (protón y metálicos) y moléculas de interés biológico: Espectroscopía de disociación multifotónica IR de agregados iónicos entre las bases del ADN y H <sup>+</sup> , Ag <sup>+</sup> y Ba <sup>2+</sup> .....	<b>130 - 132</b>
<i>Andrés Felipe Cruz Ortiz</i>	
Drogas vegetales empleadas como analgésicas y anti-inflamatorias en la medicina tradicional. Validación científica de su efecto terapéutico	<b>133 - 135</b>
<i>Micaela Paula Del Gaudio</i>	
Estudio térmico y fotoquímico de nuevas sulfonas derivadas de dihidropiridinas.....	<b>136 - 140</b>
<i>Guadalupe Firpo</i>	
Estudio experimental y teórico de sales trifluorborato de potasio.....	<b>141 - 146</b>
<i>Maximiliano Alberto Iramain</i>	
Descubrimiento de nuevos anticonvulsivos que actúan mediante interacciones con canales iónicos.....	<b>147 - 149</b>
<i>Manuel Augusto Llanos</i>	
Revalorización de la chía como fuente de antioxidantes naturales: Utilización sustentable del subproducto generado durante la extracción de su aceite.....	<b>150 - 153</b>
<i>Agustín Lucini Mas</i>	

Nitroxilo (HNO): Complejos biomiméticos de porfirinas de hierro y nuevos métodos de generación .....	<b>154 - 156</b>
<i>Agostina María Mazzeo</i>	
Nanoestructuras plasmónicas como dispositivos para la detección ultrasensible o fotodegradación de moléculas de interés agroalimenticio .....	<b>157 - 161</b>
<i>Pablo Agustín Mercadal</i>	
Síntesis y caracterización de nanomateriales híbridos de carbono con propiedades de reconocimiento molecular: Nuevas plataformas electroanalíticas para la detección de marcadores de relevancia clínica, forense y ambiental.....	<b>162 - 170</b>
<i>Antonella Evelin Montemerlo</i>	
Estudio del efecto de flavonoides naturales sobre la bomba de calcio de membrana plasmática.....	<b>171 - 178</b>
<i>Mallku Qhapaj Ontiveros</i>	
Estudio didáctico epistemológico sobre la enseñanza y el aprendizaje de temas de biología celular y química biológica. Parte A: Estudios con la mediación de un videojuego ambientado en una célula 3D. Parte B: Análisis de obstáculos comunicacionales en el procesamiento de la información de un texto sobre desnaturalización proteica.....	<b>179 - 181</b>
<i>Natalia Ospina Quintero</i>	
Estudio didáctico epistemológico sobre la enseñanza y el aprendizaje de aspectos redox de la respiración celular.....	<b>182 - 186</b>
<i>Martín Sebastián Pérgola</i>	
Biomateriales en la Nanoescala. Síntesis de Moléculas y Polímeros Dendríticos para la Obtención de Nanogeles con Potencial Aplicación en Nanomedicina.....	<b>187 - 189</b>
<i>Anabella Patricia Rosso</i>	
Papeles cerámicos catalíticos basados en cobalto y cerio impregnados con el método de spray húmedo para ser empleados en filtros de partículas diesel.....	<b>190 - 193</b>
<i>Nicolás Alejandro Sacco</i>	
Empleo de catalizadores mesoporosos en la reacción de alquilación de isobutano con butenos.....	<b>194 - 207</b>
<i>Lucas Gabriel Tonutti</i>	

## Contents

Vol. 110 Nº 2, Julio-Diciembre de 2023

<b>CONTENTS</b>	<b>Page</b>
Editorial..... <i>Alicia Beatriz Pomilio</i>	<b>7 - 7</b>
<i>In Memoriam: Prof. Dr. Eduardo Alberto Castro (1944-2023).....</i> <i>Comisión Directiva de la Asociación Química Argentina</i>	<b>8 - 10</b>
About Dr. Castro..... <i>Nélida M. Peruchena</i>	<b>11 - 11</b>
AQA “Consecration” Award “Dr. Juan J. J. Kyle 2023”: Highest distinction in Chemistry awarded by AQA..... <i>Norma Sbarbati Nudelman</i>	<b>12 - 14</b>
AQA “Consecration” Award “Dr. Luis Federico Leloir 2023” in Research in Biological Chemistry ..... <i>Juana María Pasquini</i>	<b>15 - 17</b>
AQA “Consecration” Award “Dr. Horacio Damianovich 2023” in Research in Inorganic Chemistry..... <i>Aída Ben Altabef</i>	<b>18 - 22</b>
Development of theoretical models of bimetallic nanostructures for hydrogen electrocatalysis..... <i>Erica Daniela Schulte</i>	<b>23 - 32</b>
Therapeutic impact in mental and neurodegenerative diseases of natural 5-methoxy- <i>N,N</i> -dimethyltryptamine (5-MeO-DMT), pharmacological <i>sigma</i> -1 receptor agonist through mitochondrial activation..... <i>Milena Batalla</i>	<b>33 - 59</b>
Intoxicaciones por ingestión del hongo superior <i>Amanita phalloides</i> que crece en Argentina. Fases clínicas, diagnóstico y tratamiento.... <i>Alicia B. Pomilio, Stella M. Battista, Arturo A. Vitale y Ángel Alonso</i>	<b>60 - 81</b>

Método sencillo y rápido para detección y cuantificación de amanitinas, por electroforesis capilar automatizada de alta resolución en orina.....	<b>82 - 96</b>
<i>Arturo A. Vitale, Stella M. Battista, Ángel Alonso y Alicia B. Pomilio</i>	
Design and synthesis of new polymeric materials with the incorporation of biocomposites, for their application as coatings.....	<b>97 - 102</b>
<i>Mariana Allasia</i>	
From nutritious seeds to complex foods: Markers of authenticity and stability of bioactive components throughout the production chain.....	<b>103 - 117</b>
<i>Federico Iván Brigante</i>	
Structural and spectroscopic study of nitrogenated and chlorinated benzene derivatives with antagonical biological activities.....	<b>118 - 129</b>
<i>María Victoria Elizabeth Castillo Scheuermann</i>	
Structure and spectroscopy of ionic aggregates between cations (proton and metallic) and molecules of biological interest: IR multiphoton dissociation spectroscopy of ionic aggregates between DNA bases and H <sup>+</sup> , Ag <sup>+</sup> , and Ba <sup>2+</sup> .....	<b>130 - 132</b>
<i>Andrés Felipe Cruz Ortiz</i>	
Plant drugs used as analgesics and anti-inflammatory agents in traditional medicine. Scientific validation of the therapeutic effect...	<b>133 - 135</b>
<i>Micaela Paula Del Gaudio</i>	
Thermal and photochemical study of new sulfones derived from dihydropyridines.....	<b>136 - 140</b>
<i>Guadalupe Firpo</i>	
Experimental and theoretical study of potassium trifluoroborate salts.....	<b>141 - 146</b>
<i>Maximiliano Alberto Iramain</i>	
Discovery of new anticonvulsants that act through interactions with ion channels.....	<b>147 - 149</b>
<i>Manuel Augusto Llanos</i>	
Revaluation of chia as a source of natural antioxidants: sustainable use of the byproduct generated during the oil extraction.....	<b>150 - 153</b>
<i>Agustín Lucini Mas</i>	

Nitroxyl (HNO): biomimetic complexes with iron porphyrins and new generation methods.....	<b>154 - 156</b>
<i>Agostina María Mazzeo</i>	
Plasmonic nanostructures as devices for the ultrasensitive detection or photodegradation of molecules of agri-food interest.....	<b>157 - 161</b>
<i>Pablo Agustín Mercadal</i>	
Synthesis and characterization of hybrid carbon nanomaterials with molecular recognition properties: new electroanalytical platforms for the detection of markers of clinical, forensic and environmental relevance.....	<b>162 - 170</b>
<i>Antonella Evelin Montemerlo</i>	
Study of the effect of natural flavonoids on the plasma membrane calcium pump.....	<b>171 - 178</b>
<i>Mallku Qhapaj Ontiveros</i>	
Epistemological didactic study on teaching and learning topics in cell biology and biological chemistry. Part A: Studies mediated by a video game set in a 3D cell. Part B: Analysis of communication obstacles in the processing of information from a text on protein denaturation.....	<b>179 - 181</b>
<i>Natalia Ospina Quintero</i>	
Epistemological didactic study on teaching and learning redox aspects of cellular respiration.....	<b>182 - 186</b>
<i>Martín Sebastián Pérgola</i>	
Biomaterials at the Nanoscale. Synthesis of Dendritic Molecules and Polymers to Obtain Nanogels with Potential Application in Nanomedicine.....	<b>187- 189</b>
<i>Anabella Patricia Rosso</i>	
Catalytic ceramic papers based on cobalt and cerium impregnated with the wet spray method to be used in diesel particulate filters.....	<b>190 - 193</b>
<i>Nicolás Alejandro Sacco</i>	
Use of mesoporous catalysts in the alkylation reaction of isobutane with butenes.....	<b>194 - 207</b>
<i>Lucas Gabriel Tonutti</i>	

----



## Editorial

*“Los países ricos lo son porque dedican dinero al desarrollo científico-tecnológico y los países pobres lo siguen siendo porque no lo hacen. La Ciencia no es cara, cara es la ignorancia”.* Prof. Dr. Bernardo A. Houssay

Argentina se ha distinguido en toda América Latina por tener cinco premios Nobel:

- **Carlos Saavedra Lamas** (1936), **abogado y diplomático argentino; Premio Nobel de la Paz.**
- **Bernardo A. Houssay** (1947), farmacéutico y médico; Premio Nobel en **Fisiología, Medicina.**
- **Luis Federico Leloir** (1970), médico; **Premio Nobel en Química.**
- **Adolfo Pérez Esquivel** (1980), arquitecto, fundador del Servicio de Paz y Justicia (Serpaj); Premio Nobel de la Paz.
- **César Milstein** (1984), **químico; Premio Nobel en Medicina.**

Es difícil que se le otorgue un Premio Nobel a un científico de un país periférico; para que ello ocurra, tiene que tratarse de un científico que haya desarrollado verdaderos trabajos creativos e innovativos en investigación. Además, para que surja un Premio Nobel, la comunidad científica de ese país tiene que tener una gran producción científica que sea competitiva a nivel internacional.

Así lo ha hecho nuestro país a través de la Historia.

Se dice que, aunque se intente destruir o se destruya un país, siempre resurgirán las bases constitutivas del mismo. Es decir que en Argentina es probable que siempre se reconstituya el sistema científico.

Es importante destacar que la Ciencia junto con las diferentes expresiones del Arte (pintura, escultura, música, cine, teatro y otras) conforman el Patrimonio Cultural de un país, sus comidas, sus costumbres, sus lazos históricos y jurídicos...la bandera, la moneda, el himno... son lo que configuran además esa noción de Patria unida al concepto de Nación.

Avasallar cualquiera de los ítems mencionados, intentar destruirlos, sólo hace que al cabo de un tiempo puedan renacer con más fuerza y se re-establezcan vínculos conocidos y se formen nuevos.

Es inútil, no se puede ir contra las leyes de la Naturaleza y, más concretamente, no se puede ir contra las leyes de la Termodinámica...

Prof. Dra. Alicia B. Pomilio  
Secretaria de AQA

### *In Memoriam*

#### **Prof. Dr. Eduardo Alberto Castro (Avellaneda, 1944 - La Plata, 2023)**



El 29 de abril de 2023, falleció el Prof. Dr. Eduardo Alberto Castro, destacado ex Presidente de la Asociación Química Argentina y de la Sociedad Científica Argentina.

Los que tuvieron la oportunidad de conocerlo reconocen en él la personalidad polifacética como investigador, docente, en la enseñanza de las Ciencias Químicas, amante del tenis y el deporte en general, así como de una destacada capacidad de gestión y disciplina personal para aprovechar las horas del día, por lo que la puntualidad fue una norma que estuvo asociada a su actividad profesional.

El Dr. Castro, finalizados sus estudios secundarios con el título de Técnico Químico (1962), ingresó a la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP) donde, en 1970, se recibió como Licenciado en Ciencias Químicas (Orientación Fisicoquímica). En 1972, alcanza el grado de Doctor en Ciencias Químicas (Orientación Fisicoquímica). Su trabajo de Tesis, *“Aplicación de la teoría de orbitales moleculares al beta-caroteno (a) Comparación de métodos semiempíricos (b) Cálculo del espectro electrónico y fuerza de oscilador”*, la desarrolló bajo la dirección del Prof. Dr. O. M. Sorarrain.

La Actividad Académica del Dr. Castro fue muy amplia al igual que sus intereses en el estudio de los distintos aspectos básicos de la Química y la Fisicoquímica, así como, de la enseñanza de la disciplina y de la Química Teórica. En la enseñanza de la química, volcó su interés y compromiso en la Educación en Ciencias Químicas en todos sus niveles.

Como Investigador del CONICET, alcanzó la jerarquía de Investigador Superior. En la Docencia Universitaria se inició, en 1967, como Docente en el Departamento de Matemática. Desde entonces estuvo activo en el dictado de los Cursos de Química Analítica, Fisicoquímica II y Química Teórica. Formó numerosos Profesionales y Estudiantes de Posgrado no sólo de la UNLP sino de otras Universidades del país y del exterior. Fue

investigador invitado en distintas reuniones científicas y centros universitarios en Canadá, México, España, Chile, Uruguay, Florida-EE.UU., entre otros.

Fue uno de los socios fundadores de la Asociación Argentina de Fisicoquímica, siendo su primer Secretario (1978-1983), impulsó las actividades de Químicos Teóricos de Expresión Latina a través de sus escuelas y congresos y de la difusión de este campo de la Química en el país y en los otros países de Latinoamérica.

En su carrera dirigió más de 40 Tesis Doctorales de egresados de Universidades Nacionales (UNLP, Universidad de Buenos Aires y Universidades Nacionales de Córdoba, Nordeste, Catamarca, La Pampa y San Luis) y regionales (Universidad Mayor de San Andrés, Bolivia). Sus discípulos contribuyeron al desarrollo de la Química Teórica en distintas instituciones, se incorporaron al sistema académico o al sector empresarial en EE.UU. y Canadá. Publicó más de 600 Trabajos de Investigación originales en el campo de la Química Teórica y Fisicomatemáticas en revistas de prestigio internacional, más de 200 Trabajos de Divulgación Científica, así como numerosas presentaciones a Congresos Nacionales e Internacionales. Escribió medio centenar de textos en colaboración cubriendo distintos aspectos de la disciplina.

Más recientemente, el Dr. Castro encaró estudios en el campo de QSAR/QSPR, en los que contribuyó a la formación de investigadores y docentes que continúan actualmente con esta actividad, publicando entre otros artículos, la monografía *Quantitative Structure-Activity Relationships (QSARs) of antimicrobial compounds*, en colaboración con expertos internacionales (F. P. Maguna, N. B. Okulik, E. A. Castro), *Computational Chemistry, Volume 2C*, World Scientific, Singapore, Manoj Shukla, Editor, 2010 y *The Order Theory in QSPR/QSAR Studies*, P. R. Duchowicz & E. A. Castro en la colección *Mathematical Chemistry Monographs*, No.7.

El Dr. Castro, durante sus estudios a nivel secundario, trabajó en distintas empresas del sector químico. No olvidó esta experiencia, razón por la cual, su interés estuvo también dirigido hacia aspectos aplicados a la formación en la Química y el campo de la Ingeniería. En este sentido, una parte de sus actividades, a partir de 2001 se dirigieron hacia el Área de Formación Metodológica Profesional del Departamento de Ingeniería de la Producción y Director de Carrera de Ingeniería Industrial, en la Facultad de Ingeniería, UNLP.

Algunos de sus primeros tesis, que completaron su tesis en Química Teórica fueron capaces de insertarse en el sistema productivo internacional o impulsar emprendimientos en

el diseño de sustancias para distintos tipos de industrias en el exterior, particularmente EE.UU.

Entre sus discípulos, se destacan el Dr. Francisco Marcelo Fernández, Pablo Duchowicz y Andrew Mercader, cuyas actividades académicas, capacidad de formación de recursos humanos y nivel de publicación es apreciada en el campo científico nacional y regional.

El Dr. Castro fue distinguido en distintas oportunidades, pudiéndose mencionar el Premio KONEX (2003) en Ciencia y Tecnología, Premio Dr. Rafael Labriola (1988), Premio Horacio Damianovich (1996), Hans J. Schumacher a la Trayectoria en el campo de la Fisicoquímica otorgado por la Asociación Química Argentina (2007), entre otros. Fue designado Académico Plenario de la Academia Belgraniana de Historia (2002).

Fue miembro de las Comisiones Asesoras en Ciencias Químicas de la CICPBA, CONICET y miembro del Comité Editorial de numerosas revistas nacionales, regionales e internacionales.

Fue Director del INIFTA por concurso entre 2003 y 2009, abocándose a la tarea de incorporar Investigadores jóvenes y desarrollar nuevas áreas de investigación, varias de las cuales siguen vigentes.

Durante su gestión, su preocupación se dirigió a ampliar los espacios y promover la construcción de nuevos laboratorios y apoyar el ingreso de investigadores y becarios jóvenes solamente sobre la base de sus competencias científicas, siguiendo con la tradición del Prof. Dr. Hans H. Schumacher y del Dr. Alejandro J. Arvia.

Su fallecimiento enluta a las Ciencias Químicas desde distintos ángulos, sus amigos le recuerdan con mucho afecto y sus colegas por su gran capacidad de trabajo y dedicación al sistema académico en todas sus facetas.

Comisión Directiva de la Asociación Química Argentina

## **Sobre el Dr. Castro**

Nélida M. Peruchena

Investigadora Principal de CONICET. Directora IQUIBA-NEA (UNNE-CONICET)

Email: [iquibanea@gmail.com](mailto:iquibanea@gmail.com)

Desde la Universidad Nacional del Nordeste, siempre recordaremos con profundo agradecimiento y afecto al Dr. Castro, como siempre lo llamamos.

Fue Profesor de la Licenciatura en Ciencias Químicas de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura de nuestra Universidad, en los inicios de la Carrera de Licenciatura, donde impartía los conceptos de la Química Cuántica, en la asignatura Química Física Ii, que se dictaba con profesores “*que venían de La Plata...*” la mayoría de ellos investigadores del INIFTA...

Varios docentes-investigadores de esta Facultad fuimos sus tesis...realizando nuestras tesis en Química Teórica, varias de las cuales se presentaron en el Doctorado de la UNLP, cuando en el nordeste no teníamos carrera de doctorado...

Fue un trabajador incansable, siempre activo y de buen ánimo, alentando a los jóvenes, acercándonos papers cuando no era tan fácil como ahora acceder a las revistas científicas..., organizando Escuelas de Química Teórica, juntando muchos estudiantes latinoamericanos en los cursos que organizaba en el INIFTA...acercando siempre, dando charlas siempre que se lo pedimos, sin importar los km que tuviera que hacer para darle brillo a las reuniones científicas que aquí organizamos.

Nos dijo una y otra vez que se podía...nos alentó a seguir nuestros sueños... y se pudo!... Hoy aquí hay un Instituto de Química Básica y Aplicada (IQUIBA-NEA) de doble dependencia UNNE-CONICET.

Vayan estas simples palabras como un sentido y sencillo homenaje, desde el NE del país.

**¡Gracias Dr. Castro!**

**Premio “Consagración” AQA “Dr. Juan J. J. Kyle 2023”  
Máxima distinción en Química que otorga AQA**

Norma Sbarbati Nudelman

Académica en la Academia Nacional de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (ANCEFN).  
Experta en Contaminantes Químicos en el Comité de la Convención de Rotterdam (CRC) de  
la UNEP. e-mail: sbarbati04@gmail.com

En primer lugar, agradezco profundamente a la Comisión Directiva de la ASOCIACION QUIMICA ARGENTINA (AQA) y a los Sres. miembros del Jurado por haberme distinguido con este importante Premio, con el cual me siento muy honrada; aprovecho también para agradecerle otros 3 premios anteriores: “*Químico del Año*” (AQA, octubre 2003); “*Enseñanza de la Química*” (AQA, noviembre 2010) y “*Trayectoria en Educación en Química*” (AQA, noviembre 2012).

Quiero también, ante todo, agradecer a los **26 brillantes graduados** que realizaron Tesis de Doctorado *Sobresalientes*, a los becarios, y otros colaboradores que fueron pasando por mi laboratorio en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FCEN) de la Universidad de Buenos Aires (UBA), quienes son los verdaderos merecedores de este premio.

Trataré de resumir brevemente algunos hitos en mi carrera. Terminado el Doctorado en Físico Química Orgánica (FQO) con la dirección del Dr. J. A. Brioux, gané una beca del CONICET para perfeccionamiento en el exterior, con el Dr. George M Whitesides, quien me propuso trabajar en Química Organometálica. Fue un gran esfuerzo, pero logré mi primer paper en el *Journal of the American Chemical Society* y la mayor alegría: *nació Alejandra, nuestra primera hija*. Luego, por invitación del Prof. J. F. Bunnet, estuve un año como Research Fellow en la UCSC, donde instalé uno de los primeros equipos para estudiar reacciones de cinética muy rápida, y publicamos 4 papers en el *Journal of Organic Chemistry*.

Al regresar a BA, por invitación del Dr. Marcelo J. Vernengo, trabajé en el **INFyB (hoy ANMAT)** y, aplicando FQO, desarrollé un método para determinar la fecha de vencimiento de los medicamentos, publiqué varios trabajos y el *primer libro en el mundo* sobre “*Estabilidad de Medicamentos*” (El Ateneo, 1975). En ese lapso, *nacieron nuestros otros hijos Guillermo y Luis*.

Luego, se abrieron concursos para Profesor en la FCEN (UBA), me nombraron Profesor Adjunto, (fui el profesor/a más joven en ese momento), desarrollé 3 líneas de investigación: FQO, Química Organometálica y Estabilidad de Medicamentos. Siguió años muy fructíferos, hasta Profesor Titular Plenario e Investigador Superior del CONICET, **26 Tesis de Doctorado**, que dieron lugar a más de 260 publicaciones originales en revistas internacionales, numerosos congresos y conferencias en distintas ciudades de América, Europa, Asia, Australia y África. En esa época nos visitó el Dr. Katritzky, él me recomendó como Visiting Professor de la Royal Society of Chemistry, donde estuve por 2 meses y participé de la Third Conference on Physical Organic Chemistry. ¡Fue fascinante!, a mi regreso organicé el 1er. Congreso s/ FQO, al cabo del cual sentamos las bases para la creación de la **SAIQO** (Sociedad Argentina de Investigaciones en QO) y pocos años más tarde formamos la **CLAFQO** (Conferencia Latinoamericana de FQO) ambas perduran y han crecido mucho. Me designaron miembro titular en la división de FQO de la IUPAC, por lo cual me invitaban a sus reuniones anuales, allí aprendí mucho, en una de ellas escuché al creador de la "Green Chemistry" (GC) rápidamente comencé a dar cursos y conferencias sobre los principios de la GC, y escribí el primer libro en lengua hispana que llamé "**Química Sustentable**" Por invitación del Dr. S. Patai (editor de la colección más prestigiosa de Química Orgánica (QO)) escribí un capítulo sobre SNA y fui el *primer autor latinoamericano* en dicha Serie, más tarde escribiría otros dos.

La docencia en la FCEN (y en otras universidades del país) también me resultó muy satisfactoria, ofrecí asignaturas novedosas, cambié completamente el curso de QO para estudiantes de Biología y con dos profesores jóvenes del Departamento de QO propusimos un profundo cambio curricular para la Licenciatura en Ciencias Químicas solo dos cursos de QO y uno de Análisis Funcional Orgánico (AFO) que perdura hasta el presente. La matrícula en Química estaba declinando... y para estimular a los jóvenes constituí en 1991 la **OAQ** (*Olimpíada Argentina de Química*), formando un pequeño equipo con jóvenes investigadores. ¡La respuesta de los estudiantes y sus docentes fue sensacional! La organizamos en 4 rondas eliminatorias: colegial, intercolegial, zonal y el Certamen Nacional que se hacía en la FCEN, mientras los estudiantes rendían hacíamos reuniones con los docentes para conocer sus necesidades y dificultades en cada lugar. 4 años después ya competimos en las Olimpíadas Internacionales: la 1. Fue en Beijing (China) donde los 4 estudiantes del equipo ganaron 4 medallas de bronce. En la última competencia que me tuvo como directora: Australia 2000, Argentina fue el *único país del mundo* con **2 estudiantes medallas de oro** en los 10 primeros puestos entre cerca de 100 países.

En el año 2004 ocurrieron 3 hitos importantes en mi carrera: a) me nombraron Académico en la ANCEFEN (Academia Nacional de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales). b) me designaron “Experto en Contaminantes Químicos” en el Comité de la Convención de Rotterdam (CRC) de la UNEP. c) me nombraron Focal Point en IANAS (*Inter American Network of Academies of Sciences*). Como parte de mis actividades en el ítem a) organicé un Programa de educación en ciencias basada en la indagación para docentes de los 3 niveles pre-universitarios que llamé *HaCE* (Haciendo Ciencia en la Escuela). Formé un equipo muy entusiasta con profesores del secundario y jóvenes estudiantes de varios Institutos del Profesorado y, desde abril 2005 a marzo 2020 dimos más de 300 talleres algunos en la ANCEFEN y la mayoría en distintos lugares del país. En el ítem b) participé activamente en las reuniones de la UNEP desde el 2005-2019 (CRC, Stockholm Conv, SAICHEM) y numerosas conferencias y cursos cortos en el país para difundir el “*Uso Sustentable de Agroquímicos*”. c) Intervine apasionadamente en el Programa de Educación de IANAS desde sus inicios, años después fui elegida presidente del IANAS-SEP (*Science Education Program*) por dos periodos consecutivos, organicé varios Congresos, incluido uno en el país sobre “*Strategic Planning*”. También publiqué mi tercer libro “*Educación en Ciencias Basada en la Indagación*” con módulos desarrollados en HaCE para distintos temas de ciencia, en dos versiones: una para los alumnos y otra para los docentes con contenidos muy actualizados y revisados por especialistas de la ANCEFEN.

Durante mi carrera he recibido varios premios nacionales e internacionales, entre ellos, el de “*Investigador Destacado de la Nación*” otorgado en el 2011 por el Ministerio de Ciencia y Tecnología (MINCYT), el más reciente ocurrió en noviembre 2022. Me invitaron a pronunciar la “*Opening Lecture*” en la *15th Latin American Conference on Physical Organic Chemistry (CLAFQO-15)* celebrada en Brasil, al cierre del Congreso me entregaron una conceptuosa placa “*awarded for her loyal dedication, unwavering commitment and outstanding contribution to the Latin American Physical Organic Chemistry*”

Antes de terminar, agradezco muy profundamente a todas las personas que de una u otra manera han colaborado conmigo y muy especialmente a mi querido esposo, Dr. Osmar Nudelman (q.e.p.d.), y a mis tres amados hijos quienes constantemente me han estimulado y acompañado para que yo pueda realizar lo que aquí he relatado brevemente, y fundamentalmente, me han ayudado a crecer como *una persona de bien*.

**Muchas gracias a todos!**



## **Premio “Consagración” AQA “Dr. Luis Federico Leloir 2023” en Investigación en Química Biológica**

Juana María Pasquini

Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.

Miembro correspondiente de la Academia Ciencias Médicas de Córdoba; miembro de número de la Academia de Ciencias Latinoamericana, de la Academia Nacional de Ciencias de Buenos Aires y de la Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica.

e-mail: [juanampasquini@gmail.com](mailto:juanampasquini@gmail.com)

Juana M. Pasquini completó sus estudios de Farmacia y Bioquímica en la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires. En esa institución obtuvo el título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires en 1971, habiendo merecido su tesis de doctorado el premio Facultad de Farmacia y Bioquímica a la mejor Tesis del año. Estuvo dedicada en forma exclusiva a la docencia y la investigación en el campo de la neurobiología. Ingresó a la Carrera del Investigador del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Institución en la que actualmente se desempeña como Investigadora Superior Emérita.

Ocupó todas las posiciones docentes en el Departamento de Química Biológica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA) de la que fue Profesora Titular y Titular Plenaria y hoy Emérita.

Desde sus inicios en el desarrollo científico en la Neuroquímica, Juana Pasquini está aún hoy está comprometida con la docencia de grado y postgrado

Entre los años 1986 y 1990 fue Decana de esa Facultad, siendo la primera Decana mujer de la Universidad de Buenos Aires.

En 1964 comenzó sus trabajos de investigación en neuroquímica bajo la dirección del Dr. Carlos J. Gómez, uno de los pioneros de la Neuroquímica en Argentina y con quien realizó su Tesis Doctoral.

Realizó estudios de posgrado en el Eunice Kennedy Shriver Center, una Institución afiliada a Harvard Medical School, Boston MA, USA y en 1977 se unió al grupo encabezado por el Professor G. Porcellatti en el Departamento de Química Biológica, Universidad de Perugia, Italia.

Junto a Eduardo Soto fueron los primeros en describir que la membrana de la mielina era capaz de sintetizar sus propios fosfolípidos. Sobre la base de sus estudios sobre la mielinogénesis en el sistema nervioso central (SNC), Oscar Bizzozero, (su primer tesista) realizó su Tesis Doctoral, habiendo sido luego docente y más tarde Jefe del Departamento

de Cell Biology en la Universidad de New Mexico, USA, Junto a Oscar y Eduardo Soto, realizó las primeras contribuciones sobre la importancia del proceso de acilación de la Proteína de Proteolípidos (PLP) en la mielina. Ana M. Adamo fue su segunda tesista hoy Profesora Titular de Química Biológica Patológica. El laboratorio de la Dra Pasquini fue pionero en el estudio de los efectos de la hormona tiroidea sobre el desarrollo del SNC. También fue pionero en los estudios relacionados con los efectos de la apo-transferrina sobre la maduración y diferenciación de la célula oligodendroglial durante la mielinogénesis. Laura y Juana Pasquini junto al Dr. Gabriel Rabinovich estudiaron los efectos de la Galectina-3 sobre la maduración de los oligodendrocitos, y con Gabriel investigaron los efectos de la Galectina-1 sobre el crecimiento axonal después de un daño de la médula espinal. Más recientemente comenzó un trabajo en colaboración con el Dr. Jorge Correale, un líder médico regional en el campo de la Esclerosis Múltiple con el objeto de aplicar en este campo clínico su experiencia en el campo de la mielina y por ello en la actualidad estudia los mecanismos de desmielinización-remielinización en modelos de desmielinización asociados a la enfermedad Esclerosis Múltiple.

Ha sido precursora de los estudios de la homeostasis del hierro en el sistema nervioso central y lleva publicados más de 130 trabajos científicos, todos ellos en revistas internacionales de primer nivel, habiendo impartido un número importante de conferencias plenarias, en diferentes ámbitos internacionales y nacionales.

Ha dirigido 20 tesistas ya aprobadas y más de 30 becas y pasantías. Quizá una de sus mayores contribuciones a la ciencia ha sido su incansable dedicación a la formación de investigadores jóvenes ayudando al desarrollo de sus carreras científicas. En el año 2019 y considerando entre otras cosas esta dedicación a los jóvenes, fue la primera mujer en recibir el premio "Marthe Vogt", instituido por la *International Society for Neurochemistry*.

Junto al Dr. Ranwell Caputto y la Dra. Georgina Rodriguez de Lores Arnaiz fue fundadora de la Sociedad Argentina de Neuroquímica en el año 1986, siendo su Presidenta en el año 1995.

Uno de los hechos importante fue el esfuerzo que Juana Pasquini realizó en apoyo a la Neuroquímica en la región y fue la Presidenta del Comité Organizador del Meeting conjunto del *International and American Society for Neurochemistry* en 2001. Es co-organizadora junto a la Dra. Lorena Rela del Club de la GLIA, un importante grupo de investigadores que además de argentinas/os nuclea a grupos de Uruguay y Chile

Es miembro de la Comisión Max-Planck CONICET de evaluación del IBIOBA-Max Planck (Stammkommission).

Es miembro correspondiente de la Academia Ciencias Médicas de Córdoba y miembro de número de la Academia de Ciencias Latinoamericana y de la Academia Nacional de Ciencias de Buenos Aires y recientemente incorporada a la Academia Nacional de Farmacia y Bioquímica.

--

## **Premio “Consagración” AQA “Dr. Horacio Damianovich 2023” en Investigación en Química Inorgánica**

Aída Ben Altabef

Ex Profesora Titular de Fisicoquímica, Instituto de Química Física, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia (FBQyF), Universidad Nacional de Tucumán (UNT). Investigadora Principal Contratada, Instituto de Química del Noroeste Argentino (INQUINOA), UNT CONICET CCT NOA Sur. e-mail: [altabef@fbqf.unt.edu.ar](mailto:altabef@fbqf.unt.edu.ar)

*"Soy de las que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: también es un niño colocado ante fenómenos naturales que lo impresionan como un cuento de hadas". Marie Curie*

Realicé mis estudios primarios en la Escuela Bernardino Rivadavia y luego en la Escuela Normal de Maestras “Clara J. Armstrong” de Catamarca, donde realicé también mis estudios secundarios y de la cual egresé con el título de Maestra Normal Nacional. Una escuela con historia, que fue creada por una de las maestras norteamericanas que trajo Domingo F. Sarmiento al país; y ese espacio fue la base para mi sólida formación, no sólo como maestra, sino también para despertar mi vocación por las Ciencias Químicas. Mis estudios de Licenciatura en Química los llevé a cabo en la Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia (FBQyF) de la Universidad Nacional de Tucumán (UNT).

Mi carrera docente comenzó en 1973, como Auxiliar Docente de 2<sup>da</sup> Categoría por concurso en la Cátedra de Química General e Inorgánica (cuyo Profesor Titular era el doctor Pedro W. Lobo), cargo que ocupé hasta 1977. Posteriormente colaboré en el dictado de las prácticas de laboratorio de la Cátedra de Fisicoquímica II, durante los años 1974 y 1975 y en las prácticas de laboratorio de la Cátedra de Análisis Instrumental, durante el año 1976. Desde ese momento ya desarrollaría mis tareas docentes en el Instituto de Química Física, primero como Auxiliar Docente de 1<sup>ra</sup> Categoría de la Cátedra de Fisicoquímica III y de la Cátedra de Fisicoquímica I, cuyo Profesor Titular era el Lic. Alejandro Sancho Miñano; luego como Jefe de Trabajos Prácticos de ambas cátedras, y después, sucesivamente como Profesora Adjunta de Fisicoquímica I, Profesora Asociada y Profesora Titular de la misma asignatura. En paralelo con las actividades docentes de grado realicé actividades de posgrado: dictado de cursos, integración de los Comités Académicos de las carreras de Doctorados en Ciencias Químicas, en

Bioquímica y en Ciencias Biológicas. Fui también Directora de la Carrera de Doctorado en Ciencias Químicas en tres períodos, continuando hasta la actualidad.

En el año 1978, el doctor Pedro W. Lobo me propuso realizar mi Tesis Doctoral en la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP), bajo la dirección del doctor Pedro J. Aymonino. Fue allí donde inicié mi formación en investigación en Química Inorgánica y Espectroscopía. Culminé mis estudios doctorales el 5 de agosto de 1982 con el Trabajo de Tesis "Estudios espectroscópicos vibracionales de compuestos inorgánicos", cuya defensa se hizo en la FBQyF de la UNT.

Realicé mi Tesis Doctoral gozando de sendas Beca de Estudio de la Comisión de Investigaciones Científicas, Provincia de Buenos Aires (CIC), Beca de Iniciación y Beca de Perfeccionamiento del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). A mi regreso a Tucumán entré a trabajar en el grupo del Dr. Néstor E. Katz (quien había estado antes en La Plata realizando también su Tesis Doctoral con el Dr. Aymonino) y me inicié en la Química de Complejos de Coordinación. Ingresé a la Carrera de Investigador Científico de CONICET en 1985 bajo la dirección del Dr. Pedro J. Aymonino y la codirección del Dr. Néstor E. Katz, carrera en la que llegué a ocupar el cargo de Investigadora Principal.

En el año 1986 realicé una estancia posdoctoral en la Universidad de Bremen, República Federal de Alemania, bajo la dirección del Dr. Rüdiger Mews, con un subsidio otorgado por dicha Universidad. En enero de 1989 fui beneficiada con una beca del Instituto de Cooperación Iberoamericano y me trasladé a Madrid, España, a realizar una estancia post doctoral de un año en el Instituto de Estructura de la Materia (IEM) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), bajo la dirección del Dr. Rafael Escribano. Con el doctor Escribano realicé trabajos de síntesis y estudios espectroscópicos de compuestos con grupo sililo. En 1990 hice una estadía posdoctoral en el Instituto de Óptica "Daza de Valdés" (Madrid, España) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas de España, bajo la dirección de los doctores José Vicente García Ramos y Pedro Carmona. En 1992 integré el Proyecto: "Química en soluciones acuosas de complejos mono y polinucleares formados por centros metálicos en bajos estados de oxidación y ligandos  $\pi$ -aceptores ambidentados" (Directores: Dr. W. Kaim, Universidad de Stuttgart, Alemania y Dr. Néstor E. Katz, Universidad Nacional de Tucumán, R. Argentina), financiado por la Fundación Volkswagen, realizando una estadía en dicha Universidad alemana.

En 1998 fui invitada a realizar tareas de investigación en el Departamento de Química Física y Analítica de la Facultad de Ciencias Experimentales de la Universidad de Jaén (España) en colaboración con los doctores Amparo Navarro, María de la Paz Fernandez Lienres y Juan Jesús López González. Volvería a Jaén en los años 1999, 2000, 2002, 2004 y 2005, con subsidios otorgados por la Universidad de Jaén y la Junta de Andalucía (España).

Respecto a la formación de recursos humanos dirigi 9 Tesis Doctorales.

Los temas de trabajo se fueron diversificando a través de los años; y desde los estudios de síntesis y caracterización espectroscópica en infrarrojo y Raman de compuestos inorgánicos fuimos incorporando nuevas técnicas e incursionando en aplicaciones de compuestos de interés biológico y su interacción con membranas biológicas artificiales.

En esa dirección, en la actualidad hemos iniciado una nueva línea de trabajo sobre el estudio del Impacto ambiental asociado a la oxidación troposférica de compuestos orgánicos polifuncionales emitidos por la quema de biomasa.

Para todas estas investigaciones se contaron con subsidios de UNT, CONICET y ANPCyT. Estoy convencida de la importancia de la transferencia de conocimientos hacia las nuevas generaciones. Transferencia que es recíproca, porque yo he aprendido – y lo sigo haciendo- de cada nueva camada de alumnos. Por ello he dirigido períodos de Adiestramiento Profesional en docencia e investigación de numerosos alumnos de nuestra Facultad, realicé supervisión de Agregados Estudiantiles de la Cátedra a mi cargo, fui Consejera Curricular de estudiantes de la Facultad y miembro de las Comisiones de Supervisión de numerosos Tesistas.

En simultáneo con la docencia y con la investigación, la gestión y la extensión han ocupado un lugar importante en mi paso por la FBQyF de la UNT y por CONICET.

Participé en distintas Comisiones Asesoras de Facultad, Consejos Directivos de Facultad, Consejo Superior de la UNT, Representante de la Universidad Nacional de Tucumán en reuniones de la Comisión de Posgrado del Consejo Interuniversitario Nacional (CIN), Directora del Instituto de Química Física de la Facultad de BQyF, Representante de la FBQyF ante reuniones del FODEQUI, Vice Decana de la Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, UNT (2010- 2014), Miembro del Consejo Directivo del INQUINOA- CONICET (2012-2014). Fui Miembro de la Comisión Organizadora del X Congreso Argentino de Fisicoquímica, San Miguel de Tucumán, 1997 y Presidenta del Comité Organizador del XXI Congreso Argentino de Fisicoquímica y Química Inorgánica, San Miguel de Tucumán, 2019, Integrante del Comité

Científico del XXII Congreso Argentino de Fisicoquímica y Química Inorgánica, La Plata, 2021 e Integrante de las Comisiones organizadoras de Jornadas de Jóvenes Investigadores “Augusto Palavecino”, que se vienen realizando ininterrumpidamente en la Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, U. N. T. desde el año 2000 hasta el presente.

Respecto de las actividades en extensión universitaria, en mi carrera han ocupado un lugar relevante entre mis actividades: en general, en lo que hizo a la difusión de la ciencia; y en particular, de la Química en escuelas primarias y secundarias de la provincia de Tucumán. Todo empezó con mi participación del Programa “Los científicos van a las escuelas” en 2008.

En el Año Internacional de la Química (2011), organizamos “Desde la química nos acercamos a los chicos” en el Centro Cultural E. F. Virla de la UNT. Y a partir de allí formamos parte de las Semanas de la Ciencia y la Tecnología impulsadas por la Secretaría de Planeamiento y Políticas del Ministerio de Ciencia y Tecnología e Innovación Productiva de la Provincia de Tucumán. Esas experiencias se llevaron a cabo en nuestro laboratorio, en escuelas, ferias de ciencia, semanas de la ciencia, Ferias EDUCATEC, Fundaciones.

En 2012 fui invitada a participar de la evaluación del Programa “Los científicos van a las escuelas”, por el Equipo de Evaluación de Programas de la Subsecretaría de Evaluación Institucional del Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva de la Nación, que se llevó a cabo en la Secretaría de Innovación y Desarrollo Tecnológico (SIDETEC) de Tucumán.

En 2014 y a propuesta de la Secretaría de Ciencia, Arte e Innovación de la UNT, fui Coordinadora Científica en Tucumán del Programa “Los Científicos van a las Escuelas” (LCVE), que se desarrolló en el marco del Programa de Popularización de la Ciencia y la Innovación, creado en 2013 por el Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva de la Nación y que se llevó a cabo hasta 2019 en forma ininterrumpida en la Provincia.

Fue una experiencia muy enriquecedora trabajar con los docentes y los alumnos y poder contribuir a su formación, así como algo tan importante como es despertar vocaciones científicas en niños y adolescentes

Creo que mi paso por a Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia de la UNT ha sido fructífero, porque los resultados obtenidos en distintos aspectos así lo muestran; y ello es posible porque el trabajar en equipo es la herramienta principal para obtener los objetivos que nos planteamos en las distintas actividades que se nos presentan en el camino o nos proponemos enfrentar.

Una última mirada por el “espejo retrovisor”: la memoria de mis cuatro décadas CON y EN la ciencia me obliga a cerrar con esta reflexión de Madame Curie con la que arranqué esta historia, que es mía, pero que también es una construcción colectiva: **"Soy de las que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: también es un niño colocado ante fenómenos naturales que lo impresionan como un cuento de hadas"**.



## Desarrollo de modelos teóricos de nanoestructuras bimetálicas para la electrocatálisis del hidrógeno

Erica Daniela Schulte

Tesis de Doctorado para optar al grado académico superior de Doctor en Química – Premio AQA: “Dr. Enrique Herrero Ducloux 2023”. Directora de Tesis: Prof. Dra. Paola M. Quaino. Co-directora: Prof. Dra. Elizabeth Santos.

Instituto de Química Aplicada del Litoral (IQAL), Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral, Ciudad de Santa Fe, Provincia de Santa Fe.  
e-mail: [schulte@ifir-conicet.gov.ar](mailto:schulte@ifir-conicet.gov.ar)

Recibido: 19 de julio de 2023

Aceptado: 9 de agosto de 2023

---

### Resumen

En el presente trabajo de Tesis, en el marco de la Química Teórica y mediante la aplicación de las herramientas de Química Computacional, se han desarrollado modelos racionales de materiales de electrodo. Para esto, se propusieron materiales formados por nanopartículas de Pd y Pt de diferentes composiciones y configuraciones espaciales en 2D (conglomerados y alambres), soportadas sobre un sustrato de Au(III). Para dichas nanoestructuras, se ha estudiado la estabilidad, la geometría, propiedades electrónicas y magnéticas, en fase gaseosa y luego de la deposición. De esta manera, se ha generado evidencia y fundamentos racionales para el diseño de futuros nuevos materiales con performance superior para determinadas reacciones.

A partir de la información obtenida, se ha analizado la actividad electrocatalítica de los materiales propuestos, mediante la aplicación de la Teoría de la Electrocatalisis, utilizando como reacción prototipo la reacción de desprendimiento de hidrógeno (*her*). En este caso, se ha estudiado una de las etapas elementales del mecanismo de la *her* (etapa de Volmer) que incluye una transferencia electrónica. Inicialmente, se ha observado la estabilidad del proceso de adsorción de los intermediarios de reacción (en este caso, el átomo de hidrógeno) sobre todos los sistemas. Luego, mediante cálculos de DFT, DM y los fundamentos de la Teoría de la Electrocatalisis, se ha calculado la energía de activación de la etapa mencionada.

**Palabras clave:** Modelos teóricos; nanoestructuras bimetálicas; electrocatálisis del hidrógeno.

## **Development of theoretical models of bimetallic nanostructures for hydrogen electrocatalysis**

### **Abstract**

In this Ph. D. Thesis, within the framework of Theoretical Chemistry and through the application of Computational Chemistry tools, rational models of electrode materials have been developed. Therefore, materials formed by Pd and Pt nanoparticles of different compositions and 2D spatial configurations (conglomerates and wires), supported on an Au(III) substrate, were proposed. For these nanostructures, the stability, geometry, electronic, and magnetic properties have been studied in the gas phase and after deposition. Evidence and rational foundations have been generated for the design of future new materials with higher performance for certain reactions.

Based on the information obtained, the electrocatalytic activities of the proposed materials have been analyzed, through the application of the Theory of Electrocatalysis, using the hydrogen evolution reaction (*her*) as a prototype reaction. In this case, one of the elementary stages of the *her* mechanism (Volmer stage) has been studied, which includes an electronic transfer. Initially, the stability of the adsorption process of the reaction intermediates (in this case, the hydrogen atom) on all systems has been apperceived. Then, through DFT, DM calculations, and the foundations of the Theory of Electrocatalysis, the activation energy of the aforementioned stage has been calculated.

**Keywords:** *theoretical models; bimetallic nanostructures; hydrogen electrocatalysis.*

### **1. Introducción**

El ser humano ha buscado constantemente formas de aprovechar la energía para mejorar su calidad de vida. Sin embargo, en la actualidad, enfrentamos dos desafíos críticos: la limitación de recursos naturales y el cambio climático. La creciente demanda de energía plantea interrogantes sobre la sostenibilidad de los combustibles fósiles, mientras que las emisiones de gases de efecto invernadero dañan el medio ambiente [1]. Esto subraya la necesidad de una fuente de energía alternativa que reduzca el impacto ambiental.

Entre las tecnologías estudiadas, las celdas de combustible destacan por la producción de electricidad mediante químicos como hidrógeno y oxígeno. Estas celdas constan de compartimentos anódicos, catódicos y un electrolito. Para su desarrollo, se requiere investigar aspectos como las reacciones catódicas y anódicas, el papel de los solventes y la mejora de propiedades catalíticas [2-4]. La complejidad de las interfases electroquímicas exige estudios teóricos que clarifiquen estos procesos.

Se han logrado avances en la comprensión de las reacciones en celdas de combustible,

especialmente en la actividad catalítica de los materiales de electrodo. La elección adecuada de materiales y la comprensión de los mecanismos son fundamentales [5, 6]. Además, se han explorado metales de transición depositados sobre sustratos, que presentan propiedades sorprendentes [7-10]. Estos avances contribuyen a mejorar la eficiencia de las celdas de combustible.

El objetivo principal de este trabajo de Tesis fue desarrollar modelos confiables de materiales de electrodo mediante herramientas de Química Computacional. Se propuso el estudio de nanopartículas bimetálicas de tipo  $A_n-B_m$  con diferentes patrones geométricos, donde A y B son metales de transición como Pd y Pt, soportadas en un sustrato de Au(III). El enfoque se centró en comprender su actividad electrocatalítica, especialmente en la reacción de desprendimiento de hidrógeno (*her*), específicamente la etapa de Volmer. Se ha buscado desarrollar una metodología para aplicar la Teoría de la Electrocatalisis [11, 12] a materiales nanoestructurados y bimetálicos, con énfasis en la adsorción y disociación de especies en la superficie y su influencia en la capacidad de adsorción. Este estudio pretendió aportar información crucial sobre la influencia de la composición química, el tamaño y la disposición geométrica de las nanoestructuras en el diseño de electrocatalizadores.

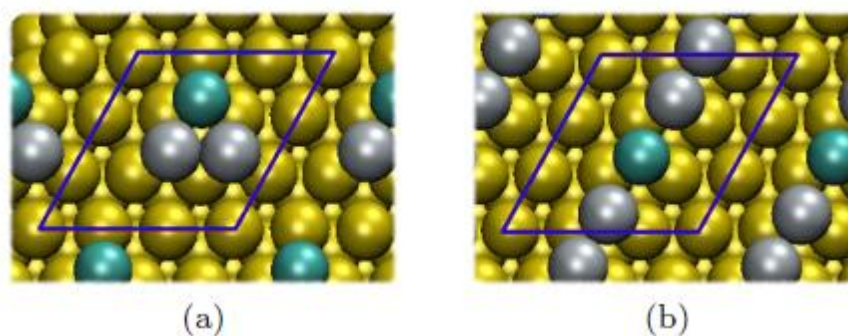
## 2. Detalles técnicos

Todos los cálculos de primeros principios llevados a cabo en el trabajo de Tesis fueron realizados con VASP (*Vienna Ab initio Simulation Package*) [13, 14], un código para modelado de materiales a escala atómica. Los electrones internos se mantuvieron fijos y fueron reemplazados por pseudopotenciales generados mediante el método de ondas planas aumentadas (PAW) [15, 16] con una energía de corte de 500 eV. Los electrones de valencia fueron tratados utilizando la aproximación de gradiente generalizado (GGA) [17-19] en la versión de Perdew, Burke y Ernzerhof (PBE) [17]. Para los materiales de electrodo estudiados, la integración en la zona de Brillouin se llevó a cabo utilizando una grilla Monkhorst-Park de (7 x 7 x 1) puntos k. La precisión energética se consideró alcanzada cuando el cambio en la energía total fue menor a 10 meV. En las relajaciones, el criterio de convergencia se cumplió cuando la fuerza total fue menor a 0,02 eV/Å. La polarización de espín se tuvo en cuenta en todos los cálculos.

### 2.1 Modelado

El estudio de la *her* se realizó sobre diferentes nanoestructuras, que se detallan a continuación: conglomerados en 2D y alambres en 1D constituidos por tres átomos de Pd y/o

Pt de la forma Pd<sub>3</sub>, Pd<sub>2</sub>Pt, PdPt<sub>2</sub>, y Pt<sub>3</sub> depositados sobre la superficie de Au(III). A modo de ejemplo, la **Fig. 1** (a) y (b) muestra un conglomerado y un alambre de composición PdPt<sub>2</sub> depositados sobre una superficie de Au(III) respectivamente, donde el paralelogramo azul corresponde a la celda unidad utilizada en los cálculos.



**Figura 1:** Vista superior de las nanoestructuras tipo (a) conglomerado y (b) alambre, ambos de composición PdPt<sub>2</sub>, depositados en Au(III). Las esferas amarillas corresponden a Au, mientras que las esferas cian y plateadas corresponden a Pd y Pt respectivamente. El paralelogramo azul corresponde a la celda unidad utilizada en los cálculos.

El sustrato de Au(III) se modeló mediante una celda de (3 x 3), con tres capas metálicas y 24 Å de vacío. El recubrimiento ( $\theta$ ) de los nano-arreglos sobre la superficie de Au(III) fue, en todos los casos, igual a 1/3.

Para los sistemas puros sin adsorbatos, las dos capas metálicas de la superficie de Au inferiores se mantuvieron fijas a la distancia de vecinos más cercanos correspondiente al material masivo, mientras que la capa superior y el nano-arreglo (conglomerado o alambre) se relajaron. Las superficies metálicas nanoestructuradas optimizadas en ausencia de intermediarios de reacción se utilizaron como datos de entrada para estudiar posteriormente los diferentes procesos de adsorción y/o disociación de las diferentes especies participantes en la reacción en estudio. Los estudios de los procesos relacionados con la *her* se realizaron mediante diferentes estrategias de cálculo que tienen en cuenta la naturaleza de la etapa de reacción.

### 3 Resultados relevantes

#### 3.1 Nanoestructuras en fase gaseosa

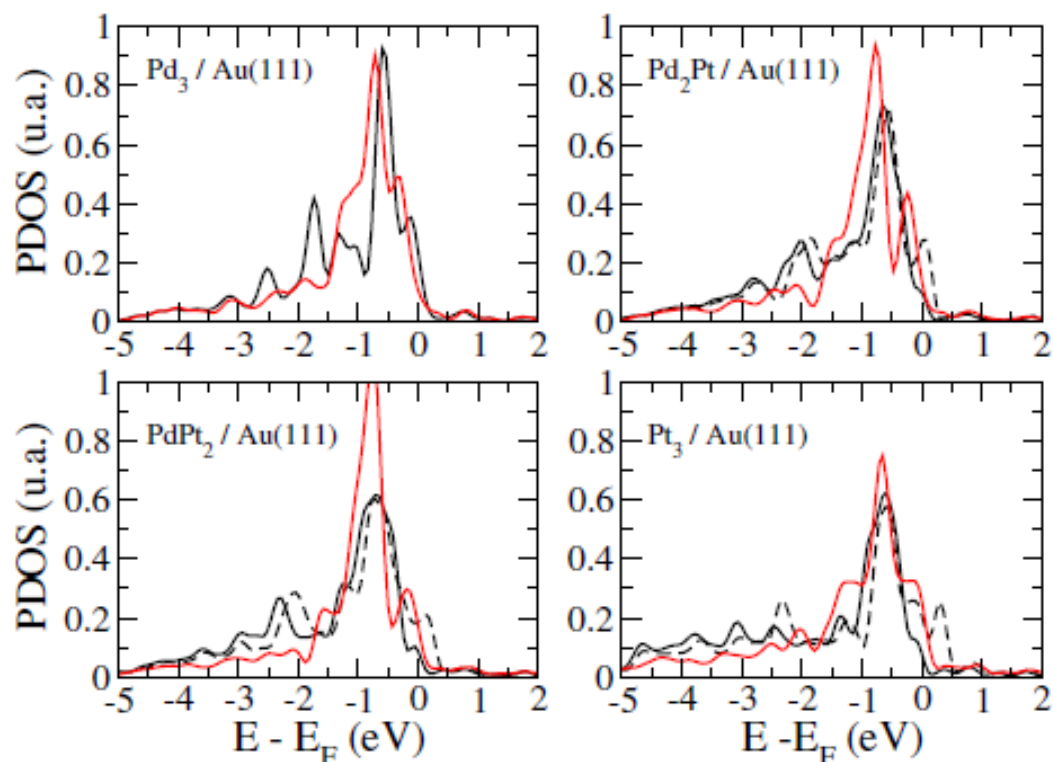
Con el objetivo de contribuir al entendimiento de los aspectos fundamentales que rigen la conducta de conglomerados y alambres de composición Pd<sub>3</sub>, Pd<sub>2</sub>Pt, PdPt<sub>2</sub> y Pt<sub>3</sub> en fase gaseosa se realizó un análisis de estabilidad, mediante el cálculo de la energía de cohesión. Se observó que las nanoestructuras, tipo conglomerado y alambre, puras de Pt fueron las más

estables, mientras que, los nano-arreglos puros de Pd, en ambas conformaciones, han sido los menos estables con energías de cohesión mayores. Adicionalmente, se encontró una relación entre la estabilidad y las distancias intermetálicas registradas. Se observó que una menor distancia entre los metales produce un solapamiento mayor entre los orbitales involucrados en el enlace, lo que provoca una disminución en la energía de cohesión y la consecuente obtención de nanoestructuras más estables.

En el caso de las nanopartículas bimetálicas se observó una estabilidad intermedia a la registrada para las nanopartículas puras. Para ambas conformaciones espaciales se reportó un aumento en la estabilidad a medida que aumentó la proporción de Pt. Al igual que en las nanoestructuras puras, se detectó una correlación entre las distancias intermetálicas obtenidas y la estabilidad de las mismas. De esta manera, se pudo explicar cómo la disposición espacial y la composición química influyen en los valores de energía de cohesión, y por ende, en su estabilidad.

### 3.2. Nanoestructuras depositadas sobre Au(III)

El análisis de la estabilidad de las nanoestructuras luego de la deposición sobre el sustrato Au(III), se ha analizado mediante el cálculo de la energía de enlace, resultando todos estables. Para los conglomerados, el orden decreciente de estabilidad observado fue el siguiente:  $Pt_3 > Pd_3 > PdPt_2 > Pd_2Pt$ ; mientras que en el caso de los alambres, el orden decreciente de estabilidad fue:  $Pd_3 > Pd_2Pt > PdPt_2 > Pt_3$ . Por medio de la racionalización de un modelo simple que explica la formación de enlaces de superficie metal - metal dependiendo del carácter donador o aceptor de los átomos participantes, se pudo entender la tendencia observada en la estabilidad tanto para conglomerados como alambres. A partir del análisis de diferencia de densidad de carga y cargas de Bader, se pudo comprobar que, luego de la deposición la dirección de flujo de la carga electrónica ha sido desde Pd a Au y desde Au a Pt, en los casos que corresponda. Desde el punto de vista geométrico se ha detectado una expansión en las distancias interatómicas respecto de las correspondientes distancias de las nanoestructuras en fase gaseosa, siendo levemente más importante en los alambres. En relación a las propiedades electrónicas, se observaron perfiles de densidad de estado proyectada (PDOS: del inglés: *projected density of states*) de la banda *d* más localizados (**Fig. 2** perfil rojo) sobre los alambres respecto de los correspondientes conglomerados (**Fig. 2** perfil negro), por lo que se esperó que el comportamiento frente a un mismo adsorbato difiera.

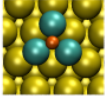
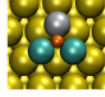
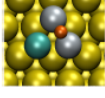
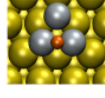


**Figura 2:** Densidad de estados proyectada de la banda  $d$  de las nanoestructuras puras y bimetalicas estudiadas depositadas sobre Au(III). El perfil rojo corresponde a la conformación tipo alambre, mientras que el perfil negro corresponde a la conformación tipo conglomerado (línea completa indica spin up y línea cortada indica spin down)

### 3.3 Adsorción de hidrógeno sobre nanoestructuras depositadas en Au(III)

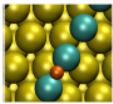
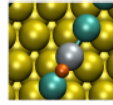
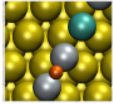
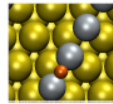
Posterior a la comprensión de los materiales de electrodo propuestos, se ha analizado su reactividad y los procesos que pueden influir, mediante la adsorción de un átomo de hidrógeno (intermediario de la *her*). Todos los nano-arreglos mostraron una mejor performance para la adsorción de H que las correspondientes superficies (III). Dicha variación en la reactividad se puede explicar por los cambios detectados en la estructura electrónica, debido fundamentalmente a los efectos químicos y geométricos del sustrato.

**Tabla 1:** Energía de adsorción, distancias de enlace H - Pd(Pt), distancia de equilibrio ( $z_{eq}$ ) y geometría optimizada (opt.) de la adsorción de un átomo de H sobre nanoestructuras tipo conglomerado depositadas sobre oro en el sitio más estable.

Sistema Nanoestructura/Au + H Tipo	Composición	Sitio	$E_{ads}$ (eV)	Distancia (Å)			Geometría opt.
				H - Pd	H - Pt	$z_{eq}$	
Conglomerado	Pd <sub>3</sub>	G	-0.70	1.80		0.79	
Conglomerado	Pd <sub>2</sub> Pt	G	-0.65	1.85	1.76	0.88	
Conglomerado	PdPt <sub>2</sub>	B	-0.57		1.76	1.13	
Conglomerado	Pt <sub>3</sub>	B	-0.50		1.75	1.11	

Comparando los nano-arreglos, se ha encontrado que la adsorción fue más favorable sobre las nanoestructuras tipo alambre de composición mixta y Pt<sub>3</sub>, que sobre el resto de los sistemas (alambre de Pd<sub>3</sub> y los conglomerados en todas las composiciones - ver **Tabla 1** y **Tabla 2** -), resultando ser excelentes materiales para la adsorción de H. Dicha tendencia se explica por la diferencia en los perfiles de PDOS, donde en el caso de los alambres mencionados, dichos perfiles se mostraron más localizados y desplazados hacia el nivel de Fermi, mejorando su reactividad, respecto de las superficies (III). En los conglomerados, también se observó la misma variación en la estructura electrónica pero fue menos significativa.

**Tabla 2:** Energía de adsorción, distancias de enlace H - Pd(Pt), distancia de equilibrio ( $z_{eq}$ ) y geometría optimizada (opt.) de la adsorción de un átomo de H sobre nanoestructuras tipo alambre depositadas sobre oro en el sitio más estable.

Sistema Nanoestructura/Au + H		Sitio	$E_{ads}$ (eV)	Distancia (Å)			Geometría opt.
Tipo	Composición			H - Pd	H - Pt	$z_{eq}$	
Alambre	Pd <sub>3</sub>	B	-0.60	1.69		0.84	
Alambre	Pd <sub>2</sub> Pt	A	-0.80	1.76	1.67	0.95	
Alambre	PdPt <sub>2</sub>	B	-0.86		1.72	0.93	
Alambre	Pt <sub>3</sub>	B	-0.95		1.74	0.85	

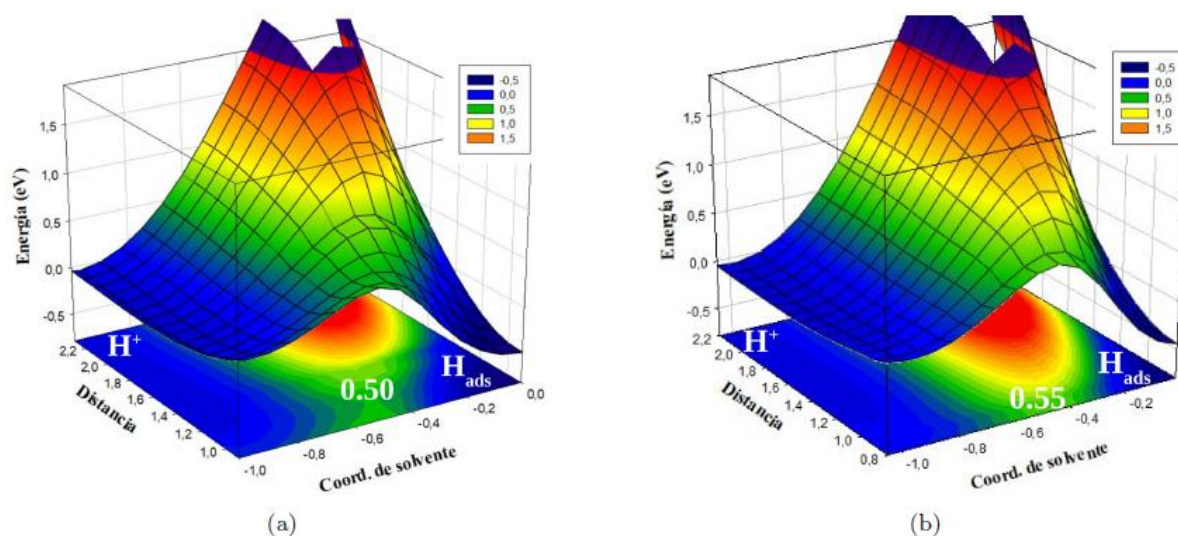
Teniendo en cuenta el principio de Sabatier, el cual establece que un catalizador es bueno cuando la energía libre de adsorción del intermediario es próxima a cero, se puede concluir que las nanoestructuras tipo conglomerado de composición Pd<sub>2</sub>Pt, PdPt<sub>2</sub> y Pt<sub>3</sub> y alambre de Pd<sub>3</sub> depositados sobre Au(III) (con valores de energía libre de adsorción entre -0,30 eV y -0,45 eV) se evidencian como catalizadores prometedores para la reacción de desprendimiento de hidrógeno.

### 3.4 Reacción de Volmer sobre nanoestructuras depositadas sobre Au(III)

La energía de activación ha sido calculada mediante la aplicación de la Teoría de la Electrocatálisis para la etapa de Volmer, sobre los nano-arreglos propuestos que no han presentado magnetización en la adsorción del H (conglomerados de composición Pd<sub>3</sub> y Pd<sub>2</sub>Pt y alambres de composición Pd<sub>3</sub>, Pd<sub>2</sub>Pt y Pt<sub>3</sub>). Para esto se han obtenido diferentes parámetros

de interés como: curvas de energía libre de adsorción en función de la distancia a la nanoestructura, variación de la constante de acoplamiento tanto con la banda *sp* como con la banda *d* de los metales que componen los nano-arreglos, los potenciales de fuerza media (PMFs; del inglés: *potentials of mean force*) y, por ende, la energía de reorganización del solvente alrededor del protón en función de la distancia para cada sistema, entre otros. Todos estos parámetros, sumados a la interacción del orbital *1s* del H en presencia de solvente con la banda *d* de los metales que forman el material, determinaron en mayor o menor medida la barrera energética de la reacción de interés.





**Figura 3:** Superficie de energía potencial para la reacción de Volmer sobre: (a) el conglomerado de composición Pd<sub>2</sub>Pt y (b) el alambre de Pd<sub>3</sub>.

A partir de la información obtenida, se pudo observar que el orden creciente de barrera registrado fue el siguiente: alambre Pt<sub>3</sub> (0,36 eV) < alambre Pd<sub>2</sub>Pt (0,44 eV) < conglomerado Pd<sub>2</sub>Pt (0,50 eV) < conglomerado Pd<sub>3</sub> (0,51 eV) < alambre Pd<sub>3</sub> (0,55 eV). La tendencia observada se pudo explicar a partir del predominio de ciertos parámetros mencionados anteriormente, los cuales dependieron de la geometría y naturaleza de la nanoestructura depositada.

Pese a que los alambres de Pt<sub>3</sub> y Pd<sub>2</sub>Pt presentaron la menor barrera de activación para la etapa de Volmer, previamente, se pudo observar que el proceso de adsorción del átomo de H sobre dicha nanoestructura es muy fuerte, por lo que, teniendo en cuenta el principio de Sabatier no resultan favorables como material catalítico.

Siguiendo en esta línea de razonamiento, los catalizadores que podrían poseer una buena performance para la reacción son las nanoestructuras tipo conglomerado de composición Pd<sub>2</sub>Pt y tipo alambre de composición Pd<sub>3</sub>, debido a que la barrera para la adsorción del protón es viable (0,55 eV y 0,50 eV respectivamente - ver **Fig. 3**) y luego de la adsorción, las energías libres son las más próximas a cero, por lo que el H no se encuentra fuertemente adsorbido.

#### 4. Conclusión general

Este trabajo de Tesis se enfocó en la reacción de desprendimiento de hidrógeno sobre electrodos formados por nanoestructuras de Pd y/o Pt de diferente disposición espacial en 1D (alambres) y 2D (conglomerados) soportadas en Au(III), como reacción prototipo para comprender el fenómeno de la Electrocatalisis. Esta reacción es de primordial importancia en los procesos de obtención de energía a partir de fuentes renovables. El problema se abordó desde el punto de vista teórico para una comprensión fundamental de los fenómenos involucrados. Para esto nos hemos basado en diferentes Teorías y métodos computacionales, sumado a una interpretación racional de los resultados obtenidos.

### **Referencias**

1. Montzka S.A., Dlugokencky E.J., Butler J.H. *Nature* 2011; 476: 43.
2. Ertl G. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2008; 47: 3524.
3. Groß A. *Surf. Sci.* 2002; 500: 347.
4. Kohn W. *Rev. Mod. Phys.* 1999; 71: 1253.
5. Van Santen R.A., Neurick N. *Molecular Heterogeneous Catalysis*. Wiley -VCH, 2006.
6. Santos E., Schmickler W. *Catalysis in Electrochemistry. From fundamentals to Strategies for Fuel Cell Development*. Wiley - VCH, 2011.
7. Baldauf M.M., Kolb D.M. *Electrochim. Acta* 1993; 38: 2145.
8. Baldauf M.M., Kolb D.M. *J. Phys. Chem.* 1996; 100: 11375.
9. Kibler L.A., El-Aziz A.M., Kolb D.M. *J. Mol. Catal. A* 2003; 199: 57.
10. Kibler L.A., Hoyer R., Kolb D.M. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2005; 44: 2080.
11. Santos E., Schmickler W. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2007; 46: 8262.
12. Santos E., Schmickler W. *J. Chem. Phys.* 2007; 127: 39.
13. Kresse G., Hafner J. *Phys. Rev. B* 1993; 47: 558.
14. Kresse G., Furthmuller J. *Comput. Mater. Sci.* 1996; 6: 15.
15. Bloch P.E. *Phys. Rev. B* 1994; 50: 17953.
16. Kresse G., Hafner J. *J. Phys.: Condens. Matter* 1994; 6: 8245.
17. Perdew J.P., Burke K., Ernzerhof M. *Phys. Rev. Lett.* 1996; 77: 3865.
18. Becke A.D. *Phys. Rev. A* 1988; 38: 3098.
19. Lee C., Yang W., Parr R. *Phys. Rev. B* 1988; 37: 785.

## **Impacto terapéutico en enfermedades mentales y neurodegenerativas de 5-metoxi-*N,N*-dimetiltriptamina (5-MeO-DMT) natural, agonista farmacológico del receptor *sigma*-1 a través de la activación mitocondrial**

Milena Batalla

Panarum S.A.S., Argentina. [milenabatalla369@gmail.com](mailto:milenabatalla369@gmail.com)

Recibido: 17 de octubre de 2023

Aceptado: 23 de diciembre de 2023

---

### **Resumen**

El receptor *sigma*-1 (S1R) es una chaperona que reside principalmente en las membranas del retículo endoplasmático (RE) asociadas a la mitocondria (MAM) y se lo considera un "modulador pluripotente" que desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis neuronal. Dada su localización específica en el MAM, S1R juega un papel importante en la regulación de la función mitocondrial y es un blanco terapéutico en enfermedades mentales y neurodegenerativas, incluida la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson. *N,N*-dimetiltriptamina (DMT), es el agonista endógeno del S1R, en tanto 5-metoxi-*N,N*-dimetiltriptamina (5-MeO-DMT) es un agonista farmacológico del S1R que produce altos niveles de disolución del ego también definida como "inmensidad oceánica", índices más altos de satisfacción con la vida y calificaciones más bajas de depresión y estrés. *In vitro*, 5-MeO-DMT muestra una fuerte modulación de la plasticidad sináptica y celular en las neuronas. 5-MeO-DMT natural es agonista neurofarmacológico del S1R, está implicado en la activación bioenergética celular, y en la regulación epigenética de mecanismos antiapoptóticos y de la función mitocondrial. S1R ha sido considerado como un controlador de la supervivencia y diferenciación celular en las neuronas. Los beneficios del uso farmacológico de 5-MeO-DMT totalmente natural están actualmente en investigación. Esta revisión destaca los mecanismos moleculares clave de los S1R en las funciones mitocondriales y las modificaciones epigenéticas involucradas en el desarrollo del fenotipo de la salud y la enfermedad, y describe el posible uso farmacológico del 5-MeO-DMT totalmente natural para "rescatar" a los pacientes del fenotipo de la enfermedad a través de la activación mitocondrial. Nos enfocamos en el compuesto 5-MeO-DMT totalmente natural, sus implicaciones terapéuticas clínicas benefician los efectos a largo plazo sobre la salud mental y el bienestar del paciente, posiblemente reprogramando y remodelando el epigenoma, considerando su aplicación particularmente en enfermedades mentales y neurodegenerativas.

**Palabras clave:** Receptor Sigma 1; mitocondrias; energía; desregulación; estrés; ROS; epigenética; enfermedad; 5MeO-DMT natural; terapia.

## **All-natural 5-MeO-DMT is an agonist of the *sigma-1* receptor. Its possible therapeutic impact on mental and neurodegenerative diseases**

### **Abstract**

The *Sigma-1* S1R receptor is a chaperone that resides mainly in the MAMs of the ER membrane of the endoplasmic reticulum associated with the mitochondria, a "pluripotent modulator" is Dynamic pluripotent modulator in living systems. S1R plays an important role in the regulatory of the mitochondrial function, it is the therapeutic target receptor in mental, and neurodegenerative diseases, Alzheimer's and Parkinson's. *N,N*-dimethyltryptamine, DMT, is the endogenous agonist of *Sigma 1* and here we review the 5-methoxy-*N,N*-dimethyltryptamine 5-MeO-DMT. Oceanic infinity, higher indices of satisfaction with life and the lowest qualifications of depression and stress. *In vitro*, the 5-MeO-DMT shows a modulation of the strength of the synaptic and cellular plasticity in the neurons. The neuropharmacological agonist of S1R, 5-MeO-DMT, is involved in cell bioenergetic activation, antiapoptotic and mitochondrial regulation of the epigenetically landscape. S1R has been considered as a survival controller and cell difference in neurons. The pharmacological benefits of the all-natural 5-MeO-DMT are under investigation. We review the key molecular mechanisms of the S1R in mitochondrial functions and epigenetic modifications involved in the development of the health and cooling phenotype. We focus on 5-MeO-DMT totally natural, its clinical therapeutic implications with long-term benefits and effects on the mental health and well-being of the patient, possibly through mitochondrial activation reprogramming and remodeling the epigenome, considering its application particularly to mental and neurodegenerative diseases.

**Keywords:** *Sigma-1* receptor; mitochondria; energy; dysregulation; stress; ROS; epigenetic; disease; all-natural 5-MeO-DMT; therapy.

### **1. Introducción**

Cientos de millones de personas en todo el mundo se ven afectadas por la pandemia de enfermedades mentales [1] y neurodegenerativas [2]. Dada la localización específica del receptor *sigma 1* (S1R) en el MAM (del inglés: *mitochondrion-associated endoplasmic*

*reticulum membrane*), se han explorado muchos reguladores de S1R en enfermedades mentales y neurodegenerativas, incluyendo la enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad de Parkinson (EP), entre otras [3]. La disfunción mitocondrial es un factor común en enfermedades crónicas mentales y neurodegenerativas. Los ligandos S1R son fundamentales en la función mitocondrial. DMT es el agonista endógeno del receptor *sigma* 1 y, revisamos en particular, el papel de 5-MeO-DMT totalmente natural, agonista farmacológico del receptor *Sigma* 1 [4].

La 5-metoxi-*N,N*-dimetiltriptamina totalmente natural, en lo sucesivo denominada 5-MeO-DMT totalmente natural, es una sustancia enteógena que se encuentra en la secreción de las glándulas paratiroides del sapo *Bufo alvarius* y es agonista del receptor *Sigma* 1. Actualmente se investiga la 5-MeO-DMT totalmente natural administrada en humanos en entornos naturalistas en el tratamiento de problemas de salud mental y medio para la exploración espiritual. Numerosas patentes y estudios clínicos que describen los beneficios farmacológicos de 5-MeO-DMT están en curso [5].

Las mitocondrias son la central eléctrica que proporciona la energía necesaria para los procesos que sustentan la vida [6]. Las mitocondrias realizan diversas funciones interconectadas, produciendo ATP y muchos intermediarios biosintéticos al mismo tiempo que contribuyen a las respuestas de estrés celular como la autofagia, la apoptosis y la regulación epigenética [7]. Las mitocondrias forman una red dinámica e interconectada que está íntimamente integrada con otros compartimentos celulares. Además, las funciones mitocondriales se extienden más allá de los límites de la influencia celular y la fisiología del organismo al regular la comunicación entre células y tejidos. Se demostró que la función mitocondrial y el metabolismo energético desempeñan un papel importante en la regulación de los comportamientos sociales [8].

Las mitocondrias son componentes fundamentales de nuestras células especialmente en las neuronas [9]. La disfunción mitocondrial ha surgido como un factor clave de los trastornos mentales [10] y neurodegenerativos [11]. En esta revisión nos enfocamos en la regulación de las funciones celulares a través de las vías de regulación mitocondrial bioenergética, señalización, antiapoptótica y epigenética. Proporcionamos una perspectiva innovadora en la que destacamos los avances en los mecanismos moleculares clave en el S1R sobre las funciones mitocondriales y la regulación epigenética sobre la salud y la enfermedad, con

especial atención a las enfermedades mentales y neurodegenerativas y las implicaciones clínicas del 5-MeO-DMT totalmente natural agonista del 5-HT<sub>1A</sub>.

## **2. Mitocondrias fundamentales en la salud y en la enfermedad**

Las mitocondrias son fundamentales para la función de las células y los órganos; Las mitocondrias desempeñan un papel clave en la homeostasis metabólica, debido a su función central en la producción de energía, el control de los niveles citosólicos de Ca<sup>2+</sup> (iones de calcio), la homeostasis de los lípidos, la síntesis de esteroides, la generación de centros de Fe-S (hierro-azufre), la síntesis de hemo [12], la innata respuesta inmunitaria y señalización celular metabólica [13–17]. La disfunción mitocondrial se asocia con algunas enfermedades más comunes, incluyendo cánceres, enfermedades mentales, neurodegenerativas [13, 14]. Las mitocondrias son el principal regulador de la supervivencia/muerte celular, así como de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS).

Las mitocondrias producen ATP a través de la fosforilación oxidativa (OXPHOS). En la matriz, las enzimas del ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) generan transportadores de electrones (NADH y FADH<sub>2</sub>), que donan electrones a la cadena de transporte de electrones (ETC) localizada en IM y también generan ROS que pueden dañar componentes clave de las células, incluidos lípidos, ácidos nucleicos y proteínas [16]. Se ha sugerido que las ROS contribuyen a las enfermedades asociadas con la disfunción mitocondrial, incluida la neurodegeneración.

Los cambios en los estados redox influyen en la metilación del ADN porque la oxidación de 5-metilcitosina a 5-hidroximetilcitosina en las CpG puede perturbar el reconocimiento por parte de las proteínas de unión a metilo y, posteriormente, alterar los patrones de metilación y la regulación epigenética [7, 16].

La epigenética metabólica se considera a las alteraciones nucleares de la cromatina y otros factores que regulan la expresión génica como resultado de cambios en la producción de energía y el metabolismo mitocondrial. Los metabolitos resultantes, a su vez, median cambios en la expresión génica que controlan los procesos celulares, incluida la homeostasis energética [17]. Por lo tanto, el estado energético y el metabolismo pueden modular la programación epigenética a través de cambios y dinámicas estructurales de la cromatina, metilación del ADN, modificaciones de histonas y expresión de ARN no codificante. Los modificadores epigenéticos incluyen ADN metiltransferasas, histona acetil transferasas, histona

desacetilasas, sirtuinas (SIRT), histona lisina desmetilasas, poli (ADP-ribose) polimerasas y otros que funcionan coordinadamente para regular la expresión génica. La reprogramación del metabolismo energético se ha identificado como el sello distintivo del cáncer [18] y el control epigenético [19, 20].

La distribución y la dinámica mitocondrial están influenciadas por la interacción física entre la membrana externa mitocondrial y diversas membranas intracelulares, como la membrana plasmática, peroxisomas, retículo endoplasmático (RE), autofagosomas y lisosomas, denominadas membranas del RE asociadas a mitocondrias (MAM). Los MAM crean entornos o plataformas únicos para la localización y la actividad de los componentes que funcionan en funciones interorgánicas compartidas, como la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  y la biosíntesis de lípidos [21-23]. MAM es fundamental para mantener la homeostasis neuronal. Así, dada la localización específica del S1R en el MAM, destacamos que la regulación directa o indirecta del S1R sobre las disfunciones mitocondriales interviene en las enfermedades mentales y neurodegenerativas [3]. Las neuronas y las células musculares contienen altos niveles de mitocondrias debido a una alta demanda de energía. El Sistema Nervioso Central (SNC) tiene una alta tasa de metabolismo porque las neuronas participan facilitando la neurotransmisión y extendiendo axones y dendritas a las células vecinas para la transmisión de impulsos [24]. Las neuronas exhiben plasticidad, morfologías complejas y experimentan constitutivamente modulaciones sinápticas cuando son estimuladas. Por lo tanto, la disfunción mitocondrial es perjudicial para las neuronas y ha sido ampliamente discutida en la neurodegeneración [25].

### **3. La función de los receptores *Sigma 1* en las mitocondrias**

El S1R es una chaperona pequeña de 28 kDa, altamente conservada, que reside principalmente en la membrana del retículo endoplásmico (RE) asociado a la mitocondria MAM y es un modulador pluripotente dinámico en sistemas vivos [26]. Se sabe que S1R desempeña un papel en la regulación de la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  entre el RE y las mitocondrias y en el mantenimiento de la integridad estructural de MAM [26]. El MAM sirve como puente entre el RE y las mitocondrias regulando múltiples funciones como la transferencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , el intercambio de energía, la síntesis y el transporte de lípidos y el plegamiento de proteínas que son fundamentales para la supervivencia y la defensa celular. Por lo tanto, el S1R [27] sirve como un comunicador que une estos dos orgánulos y juega un papel fundamental en las funciones mitocondriales [28].

Curiosamente, el porcentaje de proteínas recién sintetizadas que se pliegan correctamente y, por lo tanto, pueden salir del RE suele ser inferior al 10 %. Debido a que la acción de las chaperonas es fundamental para la célula, las chaperonas están implicadas en muchas enfermedades, incluida la enfermedad de Huntington [29], el parkinsonismo [30] y los trastornos de estrés [31]. En condiciones patológicas, el S1R es un receptor chaperón esencial para la señalización del receptor metabotrópico y para la supervivencia frente al estrés celular. Al perder su homeostasis global de  $\text{Ca}^{2+}$ , el S1R se transloca y contrarresta la apoptosis que surge [32].

El receptor S1R tiene un perfil farmacológico único y versátil [27], los ligandos de S1R tienen usos terapéuticos en la regulación de la estabilidad de los receptores IP3, la señalización de  $\text{Ca}^{2+}$  interorgánulo asociada desde el RE hasta la mitocondria en condiciones normales o patológicas [33-36]. S1R se une con gran afinidad a varias clases de ligandos no relacionados químicamente: los neuroesteroides [37], los neurolépticos, los dextrobenzomorfanos [DEX] y varios psicoestimulantes como la cocaína [37], la metanfetamina [METH] [37, 38], la metilendioximetanfetamina [MDMA] [39] y la metacatinona [37, 40]. En consecuencia, se cree que el RS1 puede mediar los efectos inmunosupresores, antipsicóticos [41] y neuroprotectores de muchos fármacos [42]. Los S1R regulan varios sistemas de neurotransmisores, incluidos el glutamatérgico [Glu], dopaminérgico [DA], serotoninérgico [5HT], noradrenérgico [NE] y sistemas colinérgicos [Ch]. Dado que estos transmisores, que interactúan con los S1R, están implicados en muchos trastornos neuropsiquiátricos, se ha evaluado su papel en varios de estos trastornos [43]. De hecho, varias líneas de investigación han demostrado que S1R juega un papel en la fisiopatología de trastornos neuropsiquiátricos como el estado de ánimo [44], los trastornos de ansiedad [41] y la esquizofrenia [28, 46].

Las acciones agudas de S1R incluyen la modulación de canales iónicos (p. ej., canal de  $\text{K}^+$ ), receptores de *N*-metil-*D*-aspartato (NMDAR) [47], IP3R y translocación de S1R. S1R participa en la remodelación de la membrana y la diferenciación celular en la reconstitución del sistema nervioso en el cerebro implicado en el abuso de drogas [48].

El S1R es influencia en el metabolismo de la glucosa cerebral, ya que la utilización de glucosa se ve afectada por ligandos en áreas del cerebro que muestran altas densidades de S1Rs [49]. S1R tiene una actividad biológica constitutiva, y los ligandos de S1R funcionarían



siendo moduladores de la actividad innata de esta proteína. La falta de desarrollo posnatal de S1R en el SNC y el hecho de que los sitios S1R sean mucho más densos en órganos periféricos, como el hígado [49], tejidos inmunitarios y endocrinos [50, 51], sugieren un papel universal para los S1R en la función celular.

#### **4. Receptor *sigma* 1 y su control mitocondrial en enfermedades neurodegenerativas**

Las enfermedades neurodegenerativas con distintas etiologías genéticas y fenotipos patológicos parecen compartir mecanismos comunes de disfunción celular neuronal, que incluyen excitotoxicidad, desregulación del calcio, daño oxidativo, estrés del RE y disfunción mitocondrial [52-54].

La liberación sostenida de glutamato provoca la activación persistente de los NMDAR que conducen a la excitotoxicidad neuronal. Esta toxicidad resulta de la activación de la apertura del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial desencadenada por la captación de calcio dependiente del potencial de membrana en la matriz mitocondrial [53, 54], lo que contribuye a la neurodegeneración en enfermedades agudas y crónicas del SNC, incluidas la ELA, la EA y la enfermedad de Parkinson [55-57]. Uno de los principales mecanismos por los que los ligandos S1R confieren neuroprotección es a través de la regulación de la homeostasis del calcio intracelular [58].

La mejor evidencia de que las ROS son una causa subyacente de la neurodegeneración es la fuerte asociación entre la detección de una mayor producción de ROS y el aumento del daño oxidativo observado en trastornos del SNC como la EP, la EA y la ELA [59, 60]. La activación de S1R también mitiga la acumulación de ROS, a través de la modulación de proteínas neutralizantes de ROS. Además, el knockout o knockdown de S1R aumenta el daño oxidativo [61].

La agregación de proteínas ocurre bajo la desregulación del calcio, el estrés oxidativo o el envejecimiento, lo que altera la función del RE y conduce a la acumulación de proteínas desplegadas o mal plegadas dentro de la luz del RE. El fracaso de la homeostasis por proteínas mal plegadas es un mecanismo común para muchas enfermedades neurodegenerativas AD, PD y HD [62-64].

La fisión y fusión mitocondrial son parte del mantenimiento organelar normal y son particularmente importantes en los axones, en los que las mitocondrias pueden tener que viajar largas distancias. Un trabajo reciente ha identificado que la proteína 1 relacionada con la dinamina (Drp1) se recluta en los sitios de contacto del RE-mitocondrias y media la fisión y

se ha demostrado que la desactivación homocigota de Drp1 es letal [65], mientras que las mitocondrias fragmentadas y Drp1 elevado o modificado (es decir, aumento de la fisiónc actividad) están asociados con AD, PD y HD [66]. La desregulación de las mitocondrias-MAM se ha propuesto como la causa subyacente de AD [67] y puede contribuir a la pérdida neuronal en otros contextos de enfermedades [68].

Los S1R también influyen en la expresión de señales antiapoptóticas y proapoptóticas que se dirigen a las mitocondrias. La actividad de S1R regula positivamente la expresión de Bcl-2, posiblemente a través del factor nuclear *kappa* B (NF- $\kappa$ B) y/o las vías de la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK) [68, 69]. Dado que también se ha demostrado que Bcl-2 interactúa con los IP3R y mejora su actividad [69], esta regulación positiva del nivel de Bcl-2 es otro mecanismo por el cual la actividad de *sigma* 1 aumenta la captación de calcio mitocondrial mediada por IP3R y la producción de ATP, además de la interacción S1R y IP3R descrita anteriormente. La activación de S1R también disminuye la expresión de Bax y las caspasas asociadas a la apoptosis, lo que promueve aún más la supervivencia celular [3, 70, 71].

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad compleja y multifactorial caracterizada por un deterioro cognitivo severo y pérdida de memoria. Se observaron niveles reducidos de proteína S1R en el tejido cerebral *post-mortem* cortical y vivo humano [72, 73] y se encontraron resultados similares en estudios de tomografía por emisión de positrones, en los que las expresiones de S1R fueron más bajas en el cerebro de pacientes con EA temprana [74]. La expresión de S1R puede estar involucrada en el efecto terapéutico del inhibidor de HDAC6 en la patología de EA [75]. Las evidencias preclínicas sugieren que los agonistas de S1R son útiles en el tratamiento de la EA, el 5-MeO-DMT [4] totalmente natural agonista del receptor *sigma* 1 tiene ventajas a considerar en la aplicación en clínica.

La enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno de progresión lenta que provoca funciones motoras deterioradas, como bradicinesia o temblor, y otras complicaciones no motoras. La característica patológica de la EP es la muerte masiva de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra pars compacta (SNpc) y el depósito de cuerpos de Lewy compuestos por  $\alpha$ -sinucleína, ubiquitina y neurofilamentos. Las expresiones de S1R fueron más bajas en el putamen de los pacientes con EP, como lo demuestran los estudios de PET [76]. S1R también atenúa la toxicidad de la dopamina (DA) involucrada en la etiología de PD

[61]. Se descubrió que los agonistas de S1R reducen el estrés oxidativo a través de varias vías de señalización [77]. Los S1R endógenos inhiben tónicamente la activación de NF-κB inducida por DA, que protege a las células de la muerte. Por lo tanto, los ligandos S1R pueden representar nuevos objetivos terapéuticos para EP [3]. Los S1R son uno de los sustratos endógenos que contrarrestan la citotoxicidad de la dopamina que, de otro modo, provocaría la apoptosis [61].

### **5. DMT endógeno y el 5-MeO-DMT natural son agonistas del receptor *sigma* 1**

La DMT endógena es un agonista del receptor *Sigma* 1, una molécula sintetizada, almacenada, liberada y agonista de S1R [78] en las células del sistema nervioso periférico y del sistema nervioso central [79]. La DMT es considerada un posible neurotransmisor del SNC implicado en la percepción sensorial [80]. La enzima indoletilamina-*N*-metiltransferasa (INMT), es la responsable de la síntesis de DMT [81]. La INMT se expresa ampliamente en el cuerpo, principalmente en tejidos periféricos como los pulmones, la tiroides y las glándulas suprarrenales, el músculo esquelético, el corazón, el intestino delgado, el estómago, la retina, el páncreas, los ganglios linfáticos y la sangre [81]. Se localiza densamente en el asta anterior de la médula espinal [81–87]. La actividad de INMT más alta se ha encontrado dentro del cerebro en las siguientes áreas: uncus, médula, amígdala, corteza frontal [83], lóbulos frontal-parietal y temporal [86, 87], glándula pineal [86] y placenta [87]. La DMT se ha medido en varios fluidos corporales humanos, incluida la sangre [81], la orina y el líquido cefalorraquídeo. La DMT endógena es agonista receptores *sigma*-1 y la mitad de la concentración efectiva máxima ( $EC_{50}$ ) es 14  $\mu$ M. INMT colocaliza con el receptor *sigma* 1 en los terminales C de las neuronas motoras [88]. Sólo una pequeña fracción de DMT endógena se libera en el torrente sanguíneo [89]. La DMT tiene un proceso de transporte [90] logrado a través de la absorción dependiente de ATP similar a la prioridad biológica de la glucosa y los aminoácidos, lo que demuestra el papel universal de DMT en los procesos biológicos. Cozzi *et al.* describen el proceso de tres pasos mediante el cual se transporta, almacena y libera DMT en las neuronas [91]. Una vez que se ha completado la captación y el almacenamiento de DMT, ha permanecido almacenada en vesículas durante al menos 1 semana para ser liberada bajo los estímulos apropiados [92]. A través de estos tres pasos, la síntesis periférica de DMT, el consumo de materia vegetal que contiene DMT o la administración sistémica de DMT influyen en las funciones del SNC [93].

DMT agonista del S1R [78] es neuroprotectora a través de varios mecanismos. DMT y también 5-MeO-DMT redujeron la inflamación a través de S1R e indujeron plasticidad neuronal [94], en un proceso regenerativo a largo plazo que va más allá de la neuroprotección [95]. DMT y 5-MeO-DMT modulan las respuestas inflamatorias innatas y adaptativas a través del S1R de células dendríticas derivadas de monocitos humanos [96].

La actividad de S1R mediada por DMT induce cambios en la plasticidad neuronal en los recién nacidos [95]. La DMT exógena estimula la diferenciación *in vitro* de progenitores neuronales hacia un fenotipo neuronal a través de S1R. La acción *in vivo* de DMT mediada por S1R mejoró el rendimiento en tareas de aprendizaje que se ha relacionado con la neurogénesis del hipocampo. Además, estudios previos realizados en humanos [97], utilizando la medicina tradicional de los pueblos originarios de América del Sur Ayahuasca cuyo componente principal en la infusión es DMT [98] tiene actividad antidepresiva, efecto terapéutico generalmente ligado a la neurogénesis del hipocampo [99].

La 5-MeO-DMT totalmente natural se encuentra como un extracto natural de las secreciones de la glándula del sapo *Bufo alvarius* del desierto de Sonora y se considera una medicina amerindia Seris, un grupo aborigen del estado de Sonora, en México [5]. Algunos reportes sugieren que la secreción del sapo *Bufo alvarius* ha sido utilizada históricamente por pueblos originarios del territorio suroeste de Estados Unidos y norte de México [100]. Este agonista enteogénico del receptor *sigma* 1 se ha asociado recientemente con ganancias cognitivas, efectos antidepresivos y cambios en áreas del cerebro relacionadas con la atención y la regeneración neuronal [15]. La 5-MeO-DMT es una sustancia neuroreguladora, el receptor *sigma*-1 [4] es su diana neurofarmacológica. 5-MeO-DMT es el agente enteógeno más potente con una fuerte disolución del ego [101], influencia en la percepción [5], activación bioenergética celular, antiapoptótico [4] y activador mitocondrial epigenético. El mecanismo de acción de 5-MeO-DMT está mediado por la vía de señalización S1R, un "modulador pluripotente" en los sistemas vivos, controlador de la supervivencia y diferenciación celular [26, 58]. El S1R es el principal objetivo molecular farmacológico para 5-MeO-DMT y la activación mitocondrial posiblemente juegue un papel primordial en la disolución de los síntomas de algunos trastornos psiquiátricos y neurodegenerativos [90] mediante la regulación epigenética. Posiblemente, 5-MeO-DMT sea un fármaco que arroja luz en la terapia de recuperación de la salud de pacientes con enfermedades mentales y enfermedades neurodegenerativas.

Se han realizado estudios farmacológicos *in vivo* de 5-MeO-DMT [92] en ratones, ratas, jerbos, hámsteres, cobayos, conejos, peces dorados, gatos, perros, ovejas, cerdos y primates. Se ha estudiado la farmacocinética de 5-MeO-DMT: la concentración máxima ( $C_{\text{máx}}$ ) en plasma se alcanza después de 5 a 6 minutos después de una inyección intraperitoneal (IP), la vida media terminal ( $t_{1/2}$ ) es de 12 a 19 minutos en ratones y  $C_{\text{máx}} = 5\text{--}10$  min y  $t_{1/2} = 6\text{--}16$  min en ratas. 5-MeO-DMT presenta un comportamiento hidrofóbico (coeficiente de partición aceite/agua de 3,3) y cruza fácilmente la barrera hematoencefálica (BBB). 5-MeO-DMT se distribuye al hígado, los riñones y el cerebro. Las concentraciones cerebrales de 5-MeO-DMT en la rata fueron 1,7 veces más altas en comparación con el plasma después de la inyección IP, con concentraciones más altas en la corteza, el tálamo, el hipocampo, los ganglios basales, la médula, la protuberancia y el cerebelo. En el cerebro del ratón, 5-MeO-DMT se distribuye a la corteza, el hipocampo, el hipotálamo y el cuerpo estriado después de la administración intraperitoneal [4, 92]. Se ha demostrado que la farmacocinética de 5-MeO-DMT sigue un patrón no lineal para la administración tanto IP como intravenosa (IV) de dosis altas en ratones. Esta no linealidad también se refleja en los aumentos correspondientes en la concentración cerebral de 5-MeO-DMT.

La potenciación a largo plazo (LTP) es un fortalecimiento persistente de la sinapsis basado en patrones recientes de actividad. Estos son patrones de actividad sináptica que producen un aumento duradero en la transmisión de señales entre dos neuronas [102]. Lo opuesto a la LTP es la depresión a largo plazo, que produce una disminución duradera de la fuerza sináptica. Específicamente, 5-MeO-DMT modula proteínas asociadas con la potenciación a largo plazo. Las proteínas que se encuentran reguladas al alza por 5-MeO-DMT son NMDAR, CaMK2 ( $\text{Ca}^{2+}$ /proteína quinasa dependiente de calmodulina) y CREB (proteína de unión a elementos sensibles al AMP cíclico) [21].

5-MeO-DMT es un inhibidor débil de la recaptación de 5-HT pero no tiene efectos apreciables sobre la liberación de monoaminas ni sobre la noradrenalina o la dopamina. S1R contribuye a los efectos de plasticidad cerebral de 5-MeO-DMT. S1R es un regulador endógeno de la morfología de las espinas dendríticas y del crecimiento de neuronas [103, 104]. 5-MeO-DMT es un mediador molecular directo de la plasticidad, que tiene efectos sobre la superficie celular y las proteínas extracelulares involucradas en la regulación de la arquitectura sináptica. Se observó una regulación positiva de integrinas [4], netrin receptor, plexinas y semaforinas en organoides tratados con 5-MeO-DMT; también se encontró en pacientes con trastorno depresivo mayor que respondieron bien a los antidepresivos, lo que

sugiere la importancia de esta clase de proteínas en la plasticidad cerebral [105]. Los agonistas de S1R ejercen efectos neuroprotectores al regular los niveles de calcio intracelular [106], previenen la expresión de genes proapoptóticos [70] y protegen el ARNm contra genes antiapoptóticos como Bcl-23. Los posibles efectos psicológicos, como cambios en la percepción y el pensamiento, renovada sensación de novedad, inefabilidad y asombro [107], se derivan directamente de la fuerte modulación de la plasticidad sináptica y celular promovida por 5-MeO-DMT.

## **6. Cambios epigenéticos dirigidos por mitocondrias y el papel de 5-MeO-DMT**

Las células responden a los estresores ambientales a través de varias vías clave, que incluyen respuesta a ROS, detección de nutrientes y ATP, respuesta al daño del ADN y alteraciones epigenéticas. Las mitocondrias desempeñan un papel central en estas vías a través de la energía, la producción de ATP, los metabolitos generados en el ciclo TCA, también a través de la señalización nuclear mitocondrial relacionada con la morfología mitocondrial, la biogénesis, la fisión/fusión, la mitofagia, la apoptosis y la regulación epigenética [108].

Posiblemente, los efectos neuroprotectores, de neuroregeneración, antiapoptosis y neuroplasticidad [109] del agonista S1R de 5-MeO-DMT estén mediados a través de la vía de regulación epigenética mitocondrial. Cada neurona contiene hasta 2 millones de mitocondrias [110]. El cerebro hambriento de energía es especialmente vulnerable a los problemas de la central eléctrica durante el daño mitocondrial [111]. La regulación mitocondrial de las alteraciones del paisaje epigenético es reversible, los procesos epigenéticos tempranos en la vida podrían desempeñar un papel en la definición de las trayectorias interindividuales del comportamiento humano y los mecanismos epigenéticos contribuyen a la disfunción y enfermedad neurológica de aparición tardía [20]. Algunos objetivos de enfermedades epigenéticas con muerte neuronal significativa y disfunción neurológica incluyen la enfermedad de Alzheimer (AD), la enfermedad de Parkinson (EP), la enfermedad de Huntington (HD), la epilepsia, el accidente cerebrovascular y la lesión cerebral traumática (TBI) [112]. Las alteraciones del gen S1R se han asociado con trastornos neurodegenerativos graves [25].

El daño del mtDNA se ha asociado con un punto de control de daño mitocondrial “mitocheckpoint” [113]. El defecto OXPHOS es un mecanismo de punto de control inducido por la inestabilidad del genoma nuclear [114]. El mitocheckpoint coordina y mantiene el

equilibrio adecuado entre las señales apoptóticas y antiapoptóticas. Tras el daño a las mitocondrias, el punto de control mitocondrial se activa para ayudar a reparar el daño a las mitocondrias, restaurar la función mitocondrial normal, evitar la inducción de células defectuosas en las mitocondrias e inducir cambios en el epigenoma nuclear [115]. La conversación cruzada entre el núcleo y las mitocondrias de las células individuales puede dar lugar en respuesta al daño mitocondrial. Si las mitocondrias están severamente dañadas, tal evento desencadenará la apoptosis. Si el daño a las mitocondrias es persistente y las mitocondrias defectuosas se acumulan en la célula, conduciría a la inestabilidad del genoma nuclear [112].

La metilación del ADN es una importante modificación epigenética de la expresión génica del ADN, posiblemente regulada por las mitocondrias [71]. Las modificaciones epigenéticas dentro del genoma nuclear de los mamíferos incluyen la metilación del ADN (5-mC) o la hidroximetilación (5-hmC) [116, 117]. Recientemente se ha identificado que las mitocondrias de mamíferos tienen actividad de ADN mitocondrial metiltransferasa 1 (mtDNMT1), 5-mC y 5-hmC. La translocación identificada de DNMT1 nuclear a la matriz mitocondrial está regulada por la expresión de una secuencia dirigida a las mitocondrias conservada, aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen dentro del gen codificado nuclear [115]. Las alteraciones en mtDNMT1 afectan directamente la transcripción de las hebras ligeras y pesadas de mtDNA, lo que sugiere una correlación entre la regulación transcripcional mediada por 5-hmC y 5-mC de mtDNA por un gen codificado nuclear. Estos hallazgos proporcionan nueva evidencia que implica la regulación epigenética del genoma mitocondrial por mtDNMT1 translocado codificado nuclearmente en relación con la disfunción mitocondrial [119–121]. Los niveles reducidos de cofactores debido al deterioro/disfunción mitocondrial podrían tener efectos significativos en la regulación del genoma nuclear. Las disfunciones mitocondriales invocan respuestas retrógradas de mitocondrias a núcleo en células humanas [122].

La variante de transcripción de DNMT1 dirigida por la vía mitocondrial (mtDNMT1) comprende alrededor del 1-2 % de las transcripciones de DNMT1 totales y está regulada positivamente por los factores de transcripción sensibles a la hipoxia, el receptor *gamma* activado por el proliferador de peroxisomas, el coactivador 1 *alfa* (PGC1a) y el factor respiratorio nuclear 1 (NRF1) y a través de la liberación de p53 del promotor DNMT1 [123]. Este hallazgo sugiere que mtDNMT1 juega un papel regulador durante el estrés oxidativo, lo que confirma el vínculo entre el estrés oxidativo y la función mitocondrial. Capacidades

similares para mtDNMT1 y su contraparte nuclear fueron indicadas por el hallazgo de que mtDNMT1 muestra claras interacciones de mtDNA dependientes de CpG proporcionales a la cantidad de CpG en los amplicones objetivo [124]. La metilación reducida del mtDNA es el resultado o una consecuencia de esta disfunción mitocondrial. La activación de la metilación del ADNmt estaría implicada en la biogénesis mitocondrial (LSP, HSP1) y el mantenimiento de la cadena de transporte de electrones (HSP2) [125].

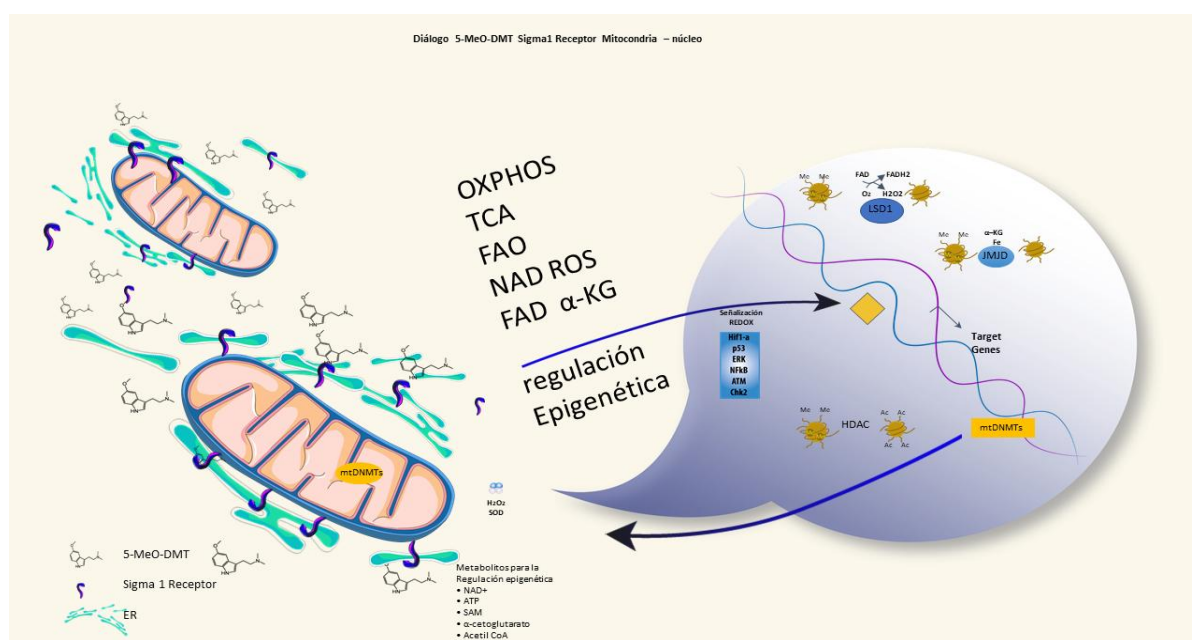
La impronta mitocondrial materna y la impronta cromosómica de los patrones de los padres representan una memoria biológica de lo que experimentaron los padres [126]: la transmisión es causada por factores ambientales y el comportamiento de crianza de los padres [127]. Que estos efectos transgeneracionales también se han transmitido epigenéticamente a sus hijos. Al integrar factores hereditarios y ambientales a lo largo de la vida, la epigenética agrega una nueva y más completa transmisión transgeneracional de trauma [128], pesadillas [129], trastorno de estrés postraumático PTSD [130], síntomas de enfermedades mentales y neurodegeneración. Además, la transmisión puede continuar más allá de la segunda generación y también incluir a los nietos, bisnietos y quizás también a otros. Este proceso de transmisión transgeneracional del trauma (TTT) ha sido descrito en continuidad en la literatura académica durante más de medio siglo [129]. Las marcas epigenéticas afectan los patrones de expresión génica en el sistema nervioso y la disfunción mitocondrial y el desequilibrio epigenético parecen influir en la progresión de muchos trastornos mentales y neurológicos [126]. Posiblemente, 5-MeO-DMT [5] agonista de S1R [4] regula mediante la activación de la vía mitocondrial reversible la restauración de funciones celulares saludables al restaurar el paisaje epigenético.

La enfermedad de Alzheimer familiar de aparición temprana (EA) es más probable en individuos que provienen de madres diagnosticadas con EA que de padres diagnosticados con EA. Estudios en modelos animales han demostrado que la impronta materna en el óvulo conduce a alteraciones genéticas y epigenéticas en el ADN nuclear y mitocondrial. Estas modificaciones que se transmiten a los nuevos seres vivos afectan más a las proteínas mitocondriales y, por tanto, la función mitocondrial puede verse afectada en la edad adulta por tendencias presentes desde el óvulo [131].

En nuestra perspectiva, es posible la activación del mecanismo epigenético [7] a través de S1-R y la función mitocondrial en enfermedades mentales y neurodegenerativas, cuya restauración por el agonista 5-MeO-DMT promueve la activación de las vías mitocondriales,



la función bioenergética mitocondrial [132–135], la respiración oxidativa mitocondrial [137] y la regulación epigenética mitocondrial; restauró la actividad nuclear mtDNMT, aumentando los niveles mitocondriales FAD y cofactores  $\alpha$ -KG que tienen efectos significativos en la regulación del genoma nuclear. 5-MeO-DMT modula las proteínas involucradas en la potenciación a largo plazo (LTP), la morfogénesis y maduración de las espinas dendríticas, al tiempo que inhibe la neurodegeneración y la apoptosis. 5-MeO-DMT activa la puntuación para la columna dendrítica y la formación de protuberancias celulares, microtúbulos y organización del citoesqueleto. Las funciones biológicas como la neurodegeneración, la apoptosis y la lesión neuronal son inhibidas por 5-MeO-DMT [4] a través de la vía S1R-mitocondria.



**Figura 1. Diálogo entre mitocondrias y núcleo.** Regulación epigenética nuclear/modificación de cromatina del agonista 5-MeO-DMT del receptor *Sigma 1*, a través de mitocondrias, a través de sirtuinas que requieren acetil-CoA del ciclo TCA; detección de nutrientes a través de la detección de  $\text{NAD}^+$ / $\text{NADH}$  y  $\text{ATP}/\text{AMP}$ ; catálisis de H3K4me2 y H3K27me3, desmetilación mediada por LSD1 y la familia de proteínas JMJD, catalizada usando cofactores FAD y  $\alpha$ -cetoglutarato sintetizados en mitocondrias. Reparación del ADN y vías de señalización redox. Las mtDNMT están asociadas con mitocondrias sanas. La reducción de la metilación del mtDNA es el resultado de la disfunción mitocondrial. mtDNMT1 del núcleo se transloca en la disfunción mitocondrial.

## 7. Impacto terapéutico de 5-MeO-DMT natural

La 5-MeO-DMT natural [137] es un agente enteógeno con efectos de alta potencia, de inicio ultrarrápido y de corta duración, es un agonista del receptor *sigma 1*. Los pueblos originarios de América del Norte, Central y del Sur, incluida la región amazónica de América,

posiblemente utilizaron la medicina ancestral en milenarios rituales sagrados con fines de curación y evolución de la consciencia según su cosmovisión. 5-MeO-DMT totalmente natural produce un profundo estado alterado de conciencia y disolución del ego, incluidas experiencias místicas como experiencias internas que implican un desvanecimiento intensamente sentido del sentido del yo y/o sentimientos de mayor conexión, hasta e incluyendo el sentido de completa unidad [138]. Este tipo de sentimientos va mucho más allá de nuestro sentido normal del día a día de la autoconsciencia. En la consciencia ordinaria, generalmente existe la impresión de que hay un yo por un lado y luego, por otro lado, todo lo demás. Sin embargo, en algunas circunstancias, durante esos momentos, el sentido de uno mismo puede desvanecerse y convertirse en parte de todo lo demás, en lugar de estar separado de él [138], con efectos beneficiosos a largo plazo sobre la salud mental y el bienestar del paciente [137].

En el uso medicinal naturalista de la secreción de sapo que contiene 5-MeO-DMT, se informó que la intensidad de la experiencia está asociada con mejoras en las medidas de satisfacción con la vida y la reducción de la angustia psicológica en participantes sin una condición de salud mental subyacente [139]. Los efectos que siguen a la administración natural de 5-MeO-DMT son alteración en la percepción auditiva y del tiempo, amplificación de los estados emocionales y fuerte disolución del ego y de corta duración, e induce una experiencia espiritual mística "pico" [139] confiable considerado un estado predictor central de la eficacia del enteógeno totalmente natural 5-MeO-DMT [137]. 5-MeO-DMT causa reducciones rápidas y sostenidas en los síntomas de depresión, ansiedad y estrés. 5-MeO-DMT también estimula la función neuroendocrina y la inmunorregulación [92].

Las formulaciones de interés son para fumar, vapear, intramuscular (IM), intranasal e intravenosa por su alta biodisponibilidad de 5-MeO-DMT porque evitan el metabolismo de primer paso. La administración fumada y vaporizada proporciona un inicio rápido de experiencias subjetivas de alta intensidad y corta duración. En la actualidad, las empresas biofarmacéuticas interesadas en la 5-MeO-DMT sintética están explorando y desarrollando formulaciones vaporizadas, intranasales, IM e intravenosas para administrar 5-MeO-DMT [139, 140]. En un ensayo clínico de Fase I de rango de dosis para evaluar la seguridad y los efectos psicoactivos de 5-MeO-DMT, se demostró la seguridad de la dosificación vaporizada de hasta 18 mg para la administración por inhalación. Es importante destacar que el inicio rápido y la corta duración de la experiencia de 13 a 18 minutos aproximadamente con 5-MeO-

DMT la hacen más adecuada para las estrategias individuales de estudios de dosis en comparación con los psicodélicos de acción más prolongada [141].

La implicación clínica en dosis o microdosis del agonista de la 5-MeO-DMT natural del receptor *sigma* y su papel en la activación mitocondrial es posible que se aplique a la terapia de trastornos psiquiátricos graves en esquizofrenia (SCZ), trastorno depresivo mayor (MDD) y trastorno límite de la personalidad (TLP) enfermedades con diferente rango de síntomas debilitantes y pronóstico, y muestran alteraciones similares en los procesos del metabolismo energético [142]. Los datos proteómicos muestran que SCZ y BPD comparten 32 proteínas alteradas, en su mayoría relacionadas con el transporte de electrones mitocondrial, la respuesta a ROS y la glucólisis. Comparten algunos rasgos fisiopatológicos y el análisis de datos reveló siete proteínas alteradas tanto en BPD como en MDD, mientras que cinco de ellas son subunidades diferentes del complejo NADH deshidrogenasa en la cadena de transporte de electrones [143]. Esto es consistente con informes previos sobre el funcionamiento deficiente de los complejos OXPHOS en MDD [142, 143] y la disminución de la expresión nuclear de genes que codifican los mecanismos respiratorios mitocondriales en BPD [144], los cuales conducen a una producción de energía mitocondrial reducida. La depresión mayor se ha descrito como el síntoma inicial de la enfermedad mitocondrial en una muestra grande de pacientes adultos [145]. Tal como se mencionó al inicio, se demostró que la función mitocondrial y el metabolismo energético desempeñan un papel importante en la regulación de los comportamientos sociales [8]. La producción limitada de energía afecta la capacidad neuronal adaptativa y contribuye al desarrollo de psicopatologías como SCZ, BPD y MDD bajo estímulos estresantes [146].

La composición patentada de 5-MeO-DMT totalmente natural comprende su posible uso en la terapia ante enfermedades mentales y neurodegenerativas [137]. Uno de los usos beneficiosos más importantes de 5-MeO-DMT totalmente natural informado es la recuperación del paciente de la adicción provocada por la cocaína [5]. La cocaína mediada por S1R tiene una interacción dependiente de la dosis entre la histona desacetilasa (HDAC)1, HDAC3 y HDAC3 y, por lo tanto, afecta la compactación de la cromatina y la expresión génica [146]. 5-MeO-DMT completamente natural a través de la activación de S1R desencadena la recuperación de los síntomas de los pacientes con mejoras persistentes en la satisfacción con la vida y los síntomas psicopatológicos [137, 139, 147-149].

Una dosis única, un tratamiento de 24 horas con 5-MeO-DMT, mostró una importante regulación a la baja de mGluR5 después del tratamiento con 5-MeO-DMT. mGluR5 tiene un papel en los efectos gratificantes de varias drogas de abuso. Se demostró que los ratones que carecen del gen mGluR5 no se autoadministran cocaína y no muestran hiperactividad inducida por la cocaína [150]. También han atenuado los signos somáticos de abstinencia de la nicotina y han reducido el comportamiento de consumo de etanol [151], lo que sugiere que mGluR5 está involucrado en la adicción [4, 152].

5-MeO-DMT natural, agonista del receptor *sigma* 1, está involucrado en la recuperación y curación informada de recuerdos traumáticos [137, 153]: “Las modificaciones epigenéticas, como la metilación del ADN, ocurren en respuesta a las influencias ambientales para alterar la expresión funcional de los genes en un estado duradero y transmisible intergeneracionalmente. Como tales, explican la variación interindividual, así como los efectos duraderos de la exposición al trauma” [130]. La reconsolidación y la extinción del miedo de los recuerdos traumáticos requieren la participación de mecanismos epigenéticos. Varios países donde la 5-MeO-DMT no está regulada ofrecen retiros y programas de tratamiento [154]. Una encuesta de 51 veteranos de las Fuerzas de Operaciones Especiales de EE. UU. de uno de esos retiros, con tratamientos combinados de 5-MeO-DMT natural proveniente de *Bufo alvarius* e ibogaína, indicó que la experiencia fue terapéutica para sus experiencias traumáticas, ideación suicida, depresión y ansiedad [152, 154]. En una encuesta de 20 personas del mismo centro de retiro, el 75% reportó una 'experiencia mística completa', medida por MEQ-30 [152, 155].

Las características notables de la 5-MeO-DMT natural son las altas tasas informadas de disolución del ego y experiencias místicas, con resultados terapéuticos positivos a largo plazo que requieren una farmacognosia y una investigación clínica y farmacológica consistente [155]. Algunos de los beneficios relacionados con la 5-MeO-DMT natural mediada por S1R es la activación mitocondrial para mitigar los síntomas de algunos trastornos psiquiátricos y neurodegenerativos, los cuales están relacionados posiblemente con modificaciones epigenéticas producidas por la vía epigenética mitocondrial de 5-MeO-DMT-S1R. Por esta razón, el ligando 5-MeO-DMT de S1R, totalmente natural, es de gran interés como posible agente terapéutico en pacientes con enfermedades mentales [145] y neurodegenerativas.

## 8. Conclusión

Las enfermedades mentales [156] y neurodegenerativas [157] son los posibles productos complejos de regulación epigenética del estrés ambiental o de herencia epigenética manifestados y controlados por S1R-MAM-disfunción mitocondrial con un alto grado de variación dependiendo del tipo neuronal afectado. La DMT endógena y exógena es agonista del receptor *sigma* 1 y regula la neurogénesis adulta *in vitro* e *in vivo* con beneficios para la salud mental y efectos antidepresivos en pacientes [97-99]. Hemos revisado exhaustivamente una posible reprogramación neurobiológica más fuerte con el novedoso agonista farmacológico del receptor *sigma* 1, una curación ancestral totalmente natural, 5-MeO-DMT [137] a través de la activación mitocondrial S1R-MAM. S1R es un chaperón residente de ER, cuya presencia está altamente enriquecida en los MAM, que controla el flujo de Ca<sup>2+</sup> de las mitocondrias, las respuestas bioenergéticas, oxidativas y de estrés y la regulación epigenética mitocondrial en neuronas. Las implicaciones terapéuticas del agonista de S1R farmacológico 5-MeO-DMT en enfermedades mentales y neurodegenerativas, como el Alzheimer y el Parkinson, impulsarán los recursos más importantes para la expansión de la terapia legal exitosa con 5-MeO-DMT completamente natural.

## Referencias

1. Ferrari A.J., Santomauro D.F., Herrera A.M.M., *et al.* Global, regional, and national burden of 12 mental disorders in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet Psychiatry* 2022; 9: 137–150.
2. Carroll W.M. The global burden of neurological disorders. *Lancet Neurol.* 2019; 18: 418-419.
3. Nguyen L., Lucke-Wold B.P., Mookerjee S.A., *et al.* Role of *sigma*-1 receptors in neurodegenerative diseases. *J. Pharmacol. Sci.* 2015; 127: 17–29.
4. Dakic V., Minardi Nascimento J., Costa Sartore R., *et al.* Short-term changes in the proteome of human cerebral organoids induced by 5-MeO-DMT. *Sci. Rep.* 2017; 7: 12863.
5. Ermakova A.O., Dunbar F., Rucker J., *et al.* A narrative synthesis of research with 5-MeO-DMT. *J. Psychopharmacol.* 2022; 36: 273–294.
6. Nunnari J., Suomalainen A. Mitochondria: in sickness and in health. *Cell* 2012; 148: 1145–1159.
7. Minocherhomji S., Tollefsbol T.O., Singh K.K. Mitochondrial regulation of epigenetics and its role in human diseases. *Epigenetics* 2012; 7: 326–334.
8. Hollis F., van der Kooij M.A., Zanoletti O., *et al.* Mitochondrial function in the brain links anxiety with social subordination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2015; 112: 15486–15491.
9. Cardanho-Ramos C., Morais V.A. Mitochondrial biogenesis in neurons: how and where. *Int. J. Mol. Sci.* 2021; 22: 13059.
10. Jou S.-H., Chiu N.-Y., Liu C.-S. Mitochondrial dysfunction and psychiatric disorders. *Chang Gung Med. J.* 2009; 32: 370-379.
11. Murali Mahadevan H., Hashemiaghdam A., Ashrafi G., *et al.* Mitochondria in neuronal health: from energy metabolism to Parkinson's disease. *Adv. Biology* 2021; 5: e2100663.

12. Kalainayakan S.P., FitzGerald K.E., Konduri P.C., *et al.* Essential roles of mitochondrial and heme function in lung cancer bioenergetics and tumorigenesis. *Cell Biosci.* 2018; 8: 56.
13. Fariss M.W. Role of mitochondria in toxic oxidative stress. *Mol. Interv.* 2005; 5: 94–111.
14. Van Houten B., Woshner V., Santos J.H. Role of mitochondrial DNA in toxic responses to oxidative stress. *DNA Repair* 2006; 5: 145–152.
15. Murphy M.P. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* 2009; 417: 1–13.
16. Hitchler M.J., Domann F.E. Redox regulation of the epigenetic landscape in cancer: a role for metabolic reprogramming in remodeling the epigenome. *Free Radic. Biol. Med.* 2012; 53: 2178–2187.
17. Wallace D.C., Fan W., Procaccio V. Mitochondrial energetics and therapeutics. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 2010; 5: 297–348.
18. Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144: 646–674.
19. Nakajima E.C., Van Houten B. Metabolic symbiosis in cancer: refocusing the Warburg lens. *Mol. Carcinog.* 2013; 52: 329–337.
20. Allis C.D., Jenuwein T. The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nat. Rev. Genet.* 2016; 17: 487–500.
21. Hayashi T., Rizzuto R., Hajnoczky G., *et al.* MAM: more than just a housekeeper. *Trends Cell Biol.* 2009; 19: 81–88.
22. Rizzuto R., Pozzan T. Microdomains of intracellular Ca<sup>2+</sup>: molecular determinants and functional consequences. *Physiol. Rev.* 2006; 86: 369–408.
23. Voelker D.R. Genetic and biochemical analysis of non-vesicular lipid traffic. *Annu. Rev. Biochem.* 2009; 78: 827–856.
24. Chamberlain K.A., Sheng Z.-H. Mechanisms for the maintenance and regulation of axonal energy supply. *J. Neurosci. Res.* 2019; 97: 897–913.
25. Weng T.-Y., Tsai S.-Y.A., Su T.-P. Roles of *sigma*-1 receptors on mitochondrial functions relevant to neurodegenerative diseases. *J. Biomed. Sci.* 2017; 24: 74.
26. Mori T., Hayashi T., Hayashi E., *et al.* *Sigma*-1 receptor chaperone at the ER-mitochondrion interface mediates the mitochondrion-ER-nucleus signaling for cellular survival. *PLoS ONE* 2013; 8: e76941.
27. Hayashi T. The *sigma*-1 receptor in cellular stress signaling. *Front. Neurosci.* 2019; 13: 733.
28. Rousseaux C.G., Greene S.F. *Sigma* receptors [ $\sigma$  Rs]: biology in normal and diseased states. *J. Recept. Signal Transduct.* 2015; 1–62.
29. Carmichael J., Chatellier J., Woolfson A., *et al.* Bacterial and yeast chaperones reduce both aggregate formation and cell death in mammalian cell models of Huntington’s disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2000; 97: 9701–9705.
30. Kabuta T., Wada K. Insights into links between familial and sporadic Parkinson’s disease: Physical relationship between UCH-L1 variants and chaperone-mediated autophagy. *Autophagy* 2008; 4: 827–829.
31. Caamaño C.A., Morano M.I., Akil H. Corticosteroid receptors: a dynamic interplay between protein folding and homeostatic control. Possible implications in psychiatric disorders. *Psychopharmacol. Bull.* 2001; 35: 6–23.
32. Tsai S.-Y., Hayashi T., Mori T., *et al.* *Sigma*-1 receptor chaperones and diseases. *Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem.* 2009; 9: 184–189.
33. Su T.-P., Hayashi T., Maurice T., *et al.* The *sigma*-1 receptor chaperone as an inter-organelle signaling modulator. *Trends Pharmacol. Sci.* 2010; 31: 557–566.

34. Su T.-P., Su T.-C., Nakamura Y., *et al.* The *sigma*-1 receptor as a pluripotent modulator in living systems. *Trends Pharmacol. Sci.* 2016; 37: 262–278.
35. Yano H., Bonifazi A., Xu M., *et al.* Pharmacological profiling of *sigma* 1 receptor ligands by novel receptor homomer assays. *Neuropharmacology* 2018; 133: 264–275.
36. Mishra A.K., Mavlyutov T., Singh D.R., *et al.* The *sigma*-1 receptors are present in monomeric and oligomeric forms in living cells in the presence and absence of ligands. *Biochem. J.* 2015; 466: 263–271.
37. Bastianetto S., Ramassamy C., Poirier J., *et al.* Dehydroepiandrosterone (DHEA) protects hippocampal cells from oxidative stress-induced damage. *Mol. Brain Res.* 1999; 66: 35–41.
38. Kaushal N., R. Matsumoto R. Role of *sigma* receptors in methamphetamine-induced neurotoxicity. *Curr. Neuropharmacol.* 2011; 9: 54–57.
39. Kaushal N., Seminerio M.J., Shaikh J., *et al.* CM156, a high affinity *sigma* ligand, attenuates the stimulant and neurotoxic effects of methamphetamine in mice. *Neuropharmacology* 2011; 61: 992–1000.
40. Brammer M.K., Gilmore D.L., Matsumoto R.R. Interactions between 3,4-methylenedioxymethamphetamine and  $\sigma$ 1 receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 2006; 553: 141–145.
41. Meririnne E., Kankaanpää A., Lillsunde P., *et al.* The effects of diazepam and zolpidem on cocaine- and amphetamine-induced place preference. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1999; 62: 159–164.
42. Cormaci G., Mori T., Hayashi T., *et al.* Protein kinase a activation down-regulates, whereas extracellular signal-regulated kinase activation up-regulates  $\sigma$ -1 receptors in B-104 cells: implication for neuroplasticity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2007; 320: 202–210.
43. Cobos E., Entrena J., Nieto F., *et al.* Pharmacology and therapeutic potential of *sigma*1 receptor ligands. *Curr. Neuropharmacol.* 2008; 6: 344–366.
44. Paschos K.A., Veletza S., Chatzaki E. Neuropeptide and *sigma* receptors as novel therapeutic targets for the pharmacotherapy of depression. *CNS Drugs* 2009; 23: 755–772.
45. Kulkarni S.K., Dhir A.  $\sigma$ -1 Receptors in major depression and anxiety. *Expert Rev. Neurother.* 2009; 9: 1021–1034.
46. Su T.-P., Hayashi T., Vaupel D.B. When the endogenous hallucinogenic trace amine *N,N*-dimethyltryptamine meets the *sigma*-1 receptor. *Sci. Signal.* 2009; 2: pe12.
47. Nguyen L., Lucke-Wold B.P., Mookerjee S., *et al.* *Sigma*-1 receptors and neurodegenerative diseases: towards a hypothesis of *sigma*-1 receptors as amplifiers of neurodegeneration and neuroprotection. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2017; 964: 133–152.
48. Hayashi T., Su T.-P. The potential role of *sigma*-1 receptors in lipid transport and lipid raft reconstitution in the brain: implication for drug abuse. *Life Sci.* 2005; 77: 1612–1624.
49. Gill S.S., Pulido O.M. Review Article: Glutamate receptors in peripheral tissues: current knowledge, future research, and implications for toxicology. *Toxicol. Pathol.* 2001; 29: 208–223.
50. Wolfe S.A., Culp S.G., De Souza E.B.  $\sigma$ -Receptors in endocrine organs: identification, characterization, and autoradiographic localization in rat pituitary, adrenal, testis, and ovary. *Endocrinology* 1989; 124: 1160–1172.
51. Wolfe S.A., Kulsakdinun C., Battaglia G., *et al.* Initial identification and characterization of *sigma* receptors on human peripheral blood leukocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1988; 247: 1114–1119.
52. Narayanan S., Mesangeau C., Poupaert J.H., *et al.* *Sigma* receptors and cocaine abuse. *Curr. Top. Med. Chem.* 2011; 11: 1128–1150.
53. Al-Saif A., Al-Mohanna F., Bohlega S. A mutation in *sigma*-1 receptor causes juvenile amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 2011; 70: 913–919.

54. Luty A.A., Kwok J.B., Dobson-Stone C., *et al.* *Sigma* nonopioid intracellular receptor 1 mutations cause frontotemporal lobar degeneration-motor neuron disease. *Ann. Neurol.* 2010; 68: 639–649.
55. Lau A., Tymianski M. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflüg. Arch. - Eur. J. Physiol.* 2010; 460: 525–542.
56. Hazell A. Excitotoxic mechanisms in stroke: An update of concepts and treatment strategies. *Neurochem. Int.* 2007; 50: 941–953.
57. Mancuso R., Oliván S., Rando A., *et al.* *Sigma*-1R agonist improves motor function and motoneuron survival in ALS mice. *Neurotherapeutics* 2012; 9: 814–826.
58. Hayashi T., Su T.-P. *Sigma*-1 receptor chaperones at the er- mitochondrion interface regulate Ca<sup>2+</sup> signaling and cell survival. *Cell* 2007; 131: 596–610.
59. Reynolds A., Laurie C., Mosley R.L., *et al.* Oxidative stress and the pathogenesis of neurodegenerative disorders. *Int. Rev. Neurobiol.* 2007; 82: 297–325.
60. Lin M.T., Beal M.F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 2006; 443: 787–795.
61. Mori T., Hayashi T., Su T.-P. Compromising  $\sigma$ -1 receptors at the endoplasmic reticulum render cytotoxicity to physiologically relevant concentrations of dopamine in a Nuclear Factor- $\kappa$ B/Bcl-2-dependent mechanism: potential relevance to Parkinson's disease. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2012; 341: 663–671.
62. Hetz C., Mollereau B. Disturbance of endoplasmic reticulum proteostasis in neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Neurosci.* 2014; 15: 233–249.
63. Pal A., Fontanilla D., Gopalakrishnan A., *et al.* The *sigma*-1 receptor protects against cellular oxidative stress and activates antioxidant response elements. *Eur. J. Pharmacol.* 2012; 682: 12–20.
64. Halliday M., Mallucci G.R. Targeting the unfolded protein response in neurodegeneration: a new approach to therapy. *Neuropharmacology* 2014; 76: 169–174.
65. Ishihara N., Nomura M., Jofuku A., *et al.* Mitochondrial fission factor Drp1 is essential for embryonic development and synapse formation in mice. *Nat. Cell Biol.* 2009; 11: 958–966.
66. Chaturvedi R.K., Flint Beal M. Mitochondrial diseases of the brain. *Free Radic. Biol. Med.* 2013; 63: 1–29.
67. Schon E.A., Area-Gomez E. Mitochondria-associated ER membranes in Alzheimer disease. *Mol. Cell. Neurosci.* 2013; 55: 26–36.
68. Vance J.E. MAM (mitochondria-associated membranes) in mammalian cells: lipids and beyond. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* 2014; 1841: 595–609.
69. Rizzuto R., Marchi S., Bonora M., *et al.* Ca<sup>2+</sup> transfer from the ER to mitochondria: when, how and why. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 2009; 1787: 1342–1351.
70. Tchedre K.T., Yorio T.  $\sigma$ -1 Receptors protect RGC-5 cells from apoptosis by regulating intracellular calcium, Bax levels, and Caspase-3 activation. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* 2008; 49: 2577.
71. Smiraglia D., Kulawiec M., Bistulfi G.L., *et al.* A novel role for mitochondria in regulating epigenetic modifications in the nucleus. *Cancer Biol. Ther.* 2008; 7: 1182–1190.
72. Hedskog L., Pinho C.M., Filadi R., *et al.* Modulation of the endoplasmic reticulum-mitochondria interface in AD and related models. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2013; 110:7916e7921.
73. Jansen K.L., Faull R.L., Storey P., *et al.* Loss of *sigma* binding sites in the CA1 area of the anterior hippocampus in AD correlates with CA1 pyramidal cell loss. *Brain Res.* 1993; 623: 299-302.



74. Mishina M., Ohyama M., Ishii K., *et al.* Low density of *sigma*1 receptors in early Alzheimer's disease. *Ann. Nucl. Med.* 2008; 22: 151-156.
75. Iwamoto M., Nakamura Y., Takemura M., *et al.* TLR4-TAK1-p38 MAPK pathway and HDAC6 regulate the expression of *sigma*-1 receptors in rat primary cultured microglia. *J. Pharmacol. Sci.* 2020; 144: 23-29.
76. Mishina M., Ishiwata K., Ishii K., *et al.* Function of *sigma*1 receptors in Parkinson's disease. *Acta Neurol. Scand.* 2005; 112: 103-107.
77. Pal A., Fontanilla D., Gopalakrishnan A., *et al.* The *sigma*-1 receptor protects against cellular oxidative stress and activates antioxidant response elements. *Eur. J. Pharmacol.* 2012; 682: 12-20.
78. Fontanilla D., Johannessen M., Hajipour A.R., *et al.* The hallucinogen *N,N*-dimethyltryptamine (DMT) is an endogenous *sigma*-1 receptor regulator. *Science* 2009; 323: 934-937.
79. Carbonaro T.M., Gatch M.B. Neuropharmacology of *N,N*-dimethyltryptamine. *Brain Res. Bull.* 2016; 126: 74-88.
80. Wallach J.V. Endogenous hallucinogens as ligands of the trace amine receptors: a possible role in sensory perception. *Med. Hypotheses* 2009; 72: 91-94.
81. Barker S.A., Monti J.A., Christian S.T. *N,N*-Dimethyltryptamine: an endogenous hallucinogen. *Int. Rev. Neurobiol.* 1981; 22: 83-110.
82. Wyatt R.J., Saavedra J.M., Axelrod J. A dimethyltryptamine-forming enzyme in human blood. *Am. J. Psychiatry* 1973; 130: 754-760.
83. Mandell A.J., Morgan M. Indole(ethyl)amine *N*-methyltransferase in human brain. *Nat. New Biol.* 1971; 230: 85-87.
84. Mavlyutov T.A., Epstein M.L., Liu P., *et al.* Development of the *sigma*-1 receptor in C-terminals of motoneurons and colocalization with the *N,N'*-dimethyltryptamine forming enzyme, indole-*N*-methyl transferase. *Neuroscience* 2012; 206: 60-68.
85. Thompson M.A., Weinshilboum R.M. Rabbit lung indolethylamine *N*-methyltransferase. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 34502-34510.
86. Morgan M., Mandell A.J. Indole(ethyl)amine *N*-methyltransferase in the brain. *Science* 1969; 165: 492-493.
87. Nichols D.E. *N,N* -Dimethyltryptamine and the pineal gland: separating fact from myth. *J. Psychopharmacol. (Oxf.)* 2018; 32: 30-36.
88. Jiménez J.H., Bouso J.C. Significance of mammalian *N,N*-dimethyltryptamine (DMT): a 60-year-old debate. *J. Psychopharmacol. (Oxf.)* 2022; 36: 905-919.
89. Vitale A.A., Pomilio A.B., Cañellas C.O., *et al.* *In vivo* long-term kinetics of radiolabeled *N,N*-dimethyltryptamine and tryptamine. *J. Nucl. Med.* 2011; 52: 970-977.
90. Frecska E., Szabo A., Winkelman M.J., *et al.* A possibly *sigma*-1 receptor mediated role of dimethyltryptamine in tissue protection, regeneration, and immunity. *J. Neural Transm.* 2013; 120: 1295-1303.
91. Cozzi N.V., Gopalakrishnan A., Anderson L.L., *et al.* Dimethyltryptamine and other hallucinogenic tryptamines exhibit substrate behavior at the serotonin uptake transporter and the vesicle monoamine transporter. *J. Neural Transm.* 2009; 116: 1591-1599.
92. Sitaram B.R., Lockett L., Talomsin R., *et al.* *In vivo* metabolism of 5-methoxy-*N,N*-dimethyltryptamine and *N,N*-dimethyltryptamine in the rat. *Biochem. Pharmacol.* 1987; 36: 1509-1512.
93. Ryskamp D.A., Korban S., Zhemkov V., *et al.* Neuronal *sigma*-1 receptors: signaling functions and protective roles in neurodegenerative diseases. *Front. Neurosci.* 2019; 13: 862.
94. Kourrich S., Su T.-P., Fujimoto M., *et al.* The *sigma*-1 receptor: roles in neuronal plasticity and disease. *Trends Neurosci.* 2012; 35: 762-771.

95. Ruscher K., Shamloo M., Rickhag M., *et al.* The *sigma*-1 receptor enhances brain plasticity and functional recovery after experimental stroke. *Brain* 2011; 134: 732–746.
96. Szabo A., Kovacs A., Frecska E., *et al.* Psychedelic *N,N*-dimethyltryptamine and 5-methoxy-*N,N*-dimethyltryptamine modulate innate and adaptive inflammatory responses through the *sigma*-1 receptor of human monocyte-derived dendritic cells. *PLoS ONE* 2014; 9: e106533.
97. Osório F. de L., Sanches R.F., Macedo L.R., *et al.* Antidepressant effects of a single dose of ayahuasca in patients with recurrent depression: a preliminary report. *Braz. J. Psychiatry (Rev. Bras. Psiquiatria)* 2015; 37: 13–20.
98. Uthaug M.V., Mason N.L., Toennes S.W., *et al.* A placebo-controlled study of the effects of ayahuasca, set and setting on mental health of participants in ayahuasca group retreats. *Psychopharmacology (Berl.)* 2021; 238: 1899–1910.
99. Morales-Garcia J.A., Calleja-Conde J., Lopez-Moreno J.A., *et al.* *N,N*-Dimethyltryptamine compound found in the hallucinogenic tea ayahuasca, regulates adult neurogenesis *in vitro* and *in vivo*. *Transl. Psychiatry* 2020; 10: 331.
100. Weil A.T., Davis W. *Bufo alvarius*: a potent hallucinogen of animal origin. *J. Ethnopharmacol.* 1994; 41: 1–8.
101. Sleight F.G., Lynn S.J., Mattson R.E., *et al.* A novel ego dissolution scale: a construct validation study. *Conscious. Cogn.* 2023; 109: 103474.
102. Cooke S.F., Bliss T.V.P. Plasticity in the human central nervous system. *Brain* 2006; 129: 1659–1673.
103. Ruscher K., Shamloo M., Rickhag M., *et al.* The *sigma*-1 receptor enhances brain plasticity and functional recovery after experimental stroke. *Brain* 2011; 134: 732–746.
104. Tsai S.-Y., Hayashi T., Harvey B.K., *et al.* *Sigma*-1 receptors regulate hippocampal dendritic spine formation via a free radical-sensitive mechanism involving Rac1xGTP pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2009; 106: 22468–22473.
105. Endris V., Wogatzky B., Leimer U., *et al.* The novel Rho-GTPase activating gene MEGAP / srGAP3 has a putative role in severe mental retardation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2002; 99: 11754–11759.
106. Mueller B.H. 2nd, Park Y., Daudt D.R. 3rd, *et al.* *Sigma*-1 receptor stimulation attenuates calcium influx through activated L-type Voltage Gated Calcium Channels in purified retinal ganglion cells. *Exp. Eye Res.* 2013; 107: 21–31.
107. Griffiths R.R., Richards W.A., McCann U., *et al.* Psilocybin can occasion mystical-type experiences having substantial and sustained personal meaning and spiritual significance. *Psychopharmacology (Berl.)* 2006; 187: 268–283; discussion 284–292.
108. Shaughnessy D.T., McAllister K., Worth L., *et al.* Mitochondria, energetics, epigenetics, and cellular responses to stress. *Environ. Health Perspect.* 2014; 122: 1271–1278.
109. Kourrich S., Su T.-P., Fujimoto M., *et al.* The *sigma*-1 receptor: roles in neuronal plasticity and disease. *Trends Neurosci.* 2012; 35: 762–771.
110. Misgeld T., Schwarz T.L. Mitostasis in neurons: maintaining mitochondria in an extended cellular architecture. *Neuron* 2017; 96: 651–666.
111. Daniels T.E., Olsen E.M., Tyrka A.R. Stress and psychiatric disorders: the role of mitochondria. *Annu. Rev. Clin. Psychol.* 2020; 16: 165–186.
112. Bertogliati M.J., Morris-Blanco K.C., Vemuganti R. Epigenetic mechanisms of neurodegenerative diseases and acute brain injury. *Neurochem. Int.* 2020; 133: 104642.
113. Feinberg A.P. Epigenetics at the epicenter of modern medicine. *JAMA* 2008; 299: 1345–1350.
114. Chandra D., Singh K.K. Genetic insights into OXPHOS defect and its role in cancer. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 2011; 1807: 620–625.
115. Szulwach K.E., Jin P. Integrating DNA methylation dynamics into a framework for understanding epigenetic codes. *BioEssays* 2014; 36: 107–117.

116. Kriaucionis S., Heintz N. The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. *Science* 2009; 324: 929–930.
117. Tahiliani M., Koh K.P., Shen Y., *et al.* Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL Partner TET1. *Science* 2009; 324: 930–935.
118. Shock L.S., Thakkar P.V., Peterson E.J., *et al.* DNA methyltransferase 1, cytosine methylation, and cytosine hydroxymethylation in mammalian mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2011; 108: 3630–3635.
119. Barile M., Brizio C., Valenti D., *et al.* The riboflavin/FAD cycle in rat liver mitochondria: Riboflavin/FAD cycle in RLM. *Eur. J. Biochem.* 2000; 267: 4888–4900.
120. Berkich D.A., Xu Y., LaNoue K.F., *et al.* Evaluation of brain mitochondrial glutamate and alpha-ketoglutarate transport under physiologic conditions. *J. Neurosci. Res.* 2005; 79: 106–113.
121. Gibson G.E., Starkov A., Blass J.P., *et al.* Cause and consequence: mitochondrial dysfunction initiates and propagates neuronal dysfunction, neuronal death and behavioral abnormalities in age-associated neurodegenerative diseases. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 2010; 1802: 122–134.
122. Singh K. Mitochondria damage checkpoint in apoptosis and genome stability. *FEMS Yeast Res.* 2004; 5: 127–132.
123. Balinang J. The regulation of mitochondrial DNMT1 during oxidative stress. *Theses/Dissertations*. First Advisor: Taylor S.; Virginia Commonwealth University; 2012.
124. Dostal V., Churchill M.E.A. Cytosine methylation of mitochondrial DNA at CpG sequences impacts transcription factor A DNA binding and transcription. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Regul. Mech.* 2019; 1862: 598–607.
125. Van der Wijst M.G.P., Rots M.G. Mitochondrial epigenetics: an overlooked layer of regulation? *Trends Genet.* 2015; 31: 353–356.
126. Fagiolini M., Jensen C.L., Champagne F.A. Epigenetic influences on brain development and plasticity. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2009; 19: 207–212.
127. Jawaid A., Roszkowski M., Mansuy I.M. Transgenerational epigenetics of traumatic stress. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 2018; 158: 273–298.
128. Costa D.L., Yetter N., DeSomer H. Intergenerational transmission of paternal trauma among US Civil War ex-POWs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2018; 115: 11215–11220.
129. Kellermann N.P. Epigenetic transmission of Holocaust trauma: can nightmares be inherited? *Isr. J. Psychiatry Relat. Sci.* 2013; 50: 33–39.
130. Yehuda R., Bierer L.M. The relevance of epigenetics to PTSD: implications for the DSM-V. *J. Trauma. Stress* 2009; 22: 427–434.
131. Pérez-Mediavilla A., Zamarbide M. Maternal imprinting, mitochondrial DNA, nuclear DNA and Alzheimer's disease. *Explor. Neuroprot. Ther.* 2021; 1: 121–126.
132. Bai Q., Burton E.A. Zebrafish models of Tauopathy. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* (2011) 1812, 353–363.
133. Das S., Rajanikant G.K. Huntington disease: Can a zebrafish trail leave more than a ripple? *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2014; 45: 258–261.
134. Laird A.S., Mackovski N., Rinkwitz S., *et al.* Tissue-specific models of spinal muscular atrophy confirm a critical role of SMN in motor neurons from embryonic to adult stages. *Hum. Mol. Genet.* 2016; 25: 1728–1738.
135. Crouzier L., Denus M., Richard E.M., *et al.* Sigma-1 receptor is critical for mitochondrial activity and unfolded protein response in larval zebrafish. *Int. J. Mol. Sci.* 2021; 22: 11049.

136. Gogvadze N., Zhuravliova E., Morin D., *et al.* *Sigma-1* Receptor Agonists Induce Oxidative Stress in Mitochondria and Enhance Complex I Activity in Physiological Condition but Protect Against Pathological Oxidative Stress. *Neurotox. Res.* 2019; 35: 1–18.
137. Batalla M. Therapeutic uses of all-natural 5-MeO-DMT enrichment from glandular secretion of *Bufo alvarius* toad from the Sonoran Desert. USPTO priority application number US63/415407; 2022.
138. Yaden D.B., Newberg A.B. Mystical Experiences: Unity and Ego-Dissolution. Chapter 12. En: *The Varieties of Spiritual Experience: 21st Century Research and Perspectives*. Yaden D.B., Newberg A.B., Oxford University Press, págs. 224–C12.P140; 2022.
139. Reckweg J.T., Uthaug M.V., Szabo A., *et al.* The clinical pharmacology and potential therapeutic applications of 5-methoxy-*N,N*-dimethyltryptamine (5-MeO-DMT). *J. Neurochem.* 2022; 162: 128–146.
140. Lancelotta R.L., Davis A.K. Use of benefit enhancement strategies among 5-methoxy-*N,N*-dimethyltryptamine (5-MeO-DMT) users: associations with mystical, challenging, and enduring effects. *J. Psychoactive Drugs* 2020; 52: 273-281.
141. Reckweg J., Mason N.L., van Leeuwen C., *et al.* A phase 1, dose-ranging study to assess safety and psychoactive effects of a vaporized 5-methoxy-*N,N*-dimethyltryptamine formulation (GH001) in healthy volunteers. *Front. Pharmacol.* 2021; 12: 760671.
142. Moylan S., Maes M., Wray N.R., *et al.* The neuroprogressive nature of major depressive disorder: pathways to disease evolution and resistance, and therapeutic implications. *Mol. Psychiatry* 2013; 18: 595–606.
143. Konradi C., Eaton M., MacDonald M.L., *et al.* Molecular evidence for mitochondrial dysfunction in bipolar disorder. *Arch. Gen. Psychiatry* 2004; 61: 300-308.
144. Fattal O., Link J., Quinn K., *et al.* Psychiatric comorbidity in 36 adults with mitochondrial cytopathies. *CNS Spectr.* 2007; 12: 429–438.
145. Zuccoli G.S., Saia-Cereda V.M., Nascimento J.M., *et al.* The energy metabolism dysfunction in psychiatric disorders postmortem brains: focus on proteomic evidence. *Front. Neurosci.* 2017; 11: 493.
146. Tsai S.-Y.A., Chuang J.Y., Tsai M.S., *et al.* *Sigma-1* receptor mediates cocaine-induced transcriptional regulation by recruiting chromatin-remodeling factors at the nuclear envelope. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2015; 112: E6562-E6570.
147. Sha S., Qu W.J., Li L., *et al.* *Sigma-1* receptor knockout impairs neurogenesis in dentate gyrus of adult hippocampus via down-regulation of NMDA receptors. *CNS Neurosci. Ther.* 2013; 19: 705–713.
148. Uthaug M.V., Lancelotta R., van Oorsouw K., *et al.* A single inhalation of vapor from dried toad secretion containing 5-methoxy-*N,N*-dimethyltryptamine (5-MeO-DMT) in a naturalistic setting is related to sustained enhancement of satisfaction with life, mindfulness-related capacities, and a decrement of psychopathological symptoms. *Psychopharmacology (Berl.)* 2019; 236: 2653–2666.
149. Davis A.K., Barsuglia J.P., Lancelotta R., *et al.* The epidemiology of 5-methoxy- *N,N*-dimethyltryptamine (5-MeO-DMT) use: Benefits, consequences, patterns of use, subjective effects, and reasons for consumption. *J. Psychopharmacol. (Oxf.)* 2018; 32: 779–792.
150. Chiamulera C., Epping-Jordan M.P., Zocchi A., *et al.* Reinforcing and locomotor stimulant effects of cocaine are absent in mGluR5 null mutant mice. *Nat. Neurosci.* 2001; 4: 873–874.
151. Bird M.K., Kirchoff J., Djouma E., *et al.* Metabotropic glutamate 5 receptors regulate sensitivity to ethanol in mice. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2008; 11: 765-774.

152. Barsuglia J.P., Polanco M., Palmer R., *et al.* A case report SPECT study and theoretical rationale for the sequential administration of ibogaine and 5-MeO-DMT in the treatment of alcohol use disorder. *Prog. Brain Res.* 2018; 242: 121–158.
153. Inserra A. Hypothesis: the psychedelic Ayahuasca heals traumatic memories via a *sigma* 1 receptor-mediated epigenetic-mnemonic process. *Front. Pharmacol.* 2018; 9: 330.
154. Davis A.K., Averill L.A., Sepeda N.D., *et al.* Psychedelic treatment for trauma-related psychological and cognitive impairment among US Special Operations Forces Veterans. *Chronic Stress (Thousand Oaks)* 2020; 4: 247054702093956.
155. Kourrich S., Su T.-P., Fujimoto M., *et al.* The *sigma*-1 receptor: roles in neuronal plasticity and disease. *Trends Neurosci.* 2012; 35: 762–771.
156. Ben-Shachar D., Karry R. Neuroanatomical pattern of mitochondrial complex I pathology varies between schizophrenia, bipolar disorder and major depression. *PLoS ONE* 2008; 3: e3676.
157. Tsai S.-Y.A., Pokrass M.J., Klauer N.R., *et al.* *Sigma*-1 receptor chaperones in neurodegenerative and psychiatric disorders. *Expert Opin. Ther. Targets* 2014; 18: 1461-1476.

**Declaración de conflicto de intereses:** La autora es la inventora de la aplicación de patente que describe los usos terapéuticos de 5-MeO-DMT totalmente natural.

**Cita reciente:** Batalla M. All-natural 5-MeO-DMT *sigma* receptor 1 agonist and its therapeutic impact in mental and neurodegenerative diseases through mitochondrial activation. *Science Reviews – Biology* 2023; 2 (2): 1-20. <https://doi.org/10.57098/SciRevs.Biology.2.2.1>

## INTOXICACIONES POR INGESTIÓN DEL HONGO SUPERIOR *AMANITA PHALLOIDES* QUE CRECE EN ARGENTINA. FASES CLÍNICAS, DIAGNÓSTICO y TRATAMIENTO

Alicia B. Pomilio <sup>1\*</sup>, Stella M. Battista <sup>1,2</sup>, Arturo A. Vitale <sup>1</sup> y Ángel Alonso <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Bioquímica Clínica, Área Hematología, Hospital de Clínicas “José de San Martín”, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. [aavitale@sinectis.com.ar](mailto:aavitale@sinectis.com.ar); [avitale@ffyb.uba.ar](mailto:avitale@ffyb.uba.ar); [abpomilio@sinectis.com.ar](mailto:abpomilio@sinectis.com.ar); [pomilio@ffyb.uba.ar](mailto:pomilio@ffyb.uba.ar).

<sup>2</sup> División Alergia e Inmunología, Hospital de Clínicas “José de San Martín”, Universidad de Buenos Aires, Av. Córdoba 2351, C1120AAF Buenos Aires, Argentina. [aalonsomed@gmail.com](mailto:aalonsomed@gmail.com).

\*Prof. Dra. Alicia B. Pomilio. [abpomilio@sinectis.com.ar](mailto:abpomilio@sinectis.com.ar); [pomilio@ffyb.uba.ar](mailto:pomilio@ffyb.uba.ar)

Recibido: 11 de julio de 2023

Aceptado: 16 de agosto de 2023

---

### Resumen

El presente trabajo aborda el micetismo por *Amanita phalloides*, que crece en Argentina, desde su diagnóstico, confirmación del tóxico por detección de *alfa-* y *beta-*amanitinas en el paciente, incluyendo el tratamiento y seguimiento del mismo por análisis clínicos. Se determinaron las distintas fases del micetismo y, según criterios internacionales, la necesidad del trasplante hepático, después de haberse agotado el tratamiento farmacológico adecuado. Se evidenció la importancia clave de la fase de latencia de las aproximadamente primeras 6 horas, durante la cual se orientará la búsqueda del tóxico en sangre o en orina según el tiempo de permanencia en ellos. La electroforesis capilar automatizada de alta resolución demostró ser un método rápido y sencillo para la determinación de estos ciclopéptidos en orina. Se evita el desarrollo del cuadro mediante la aplicación de dispositivos extracorpóreos de asistencia hepática, como el sistema de recirculación molecular adsorbente (MARS™: *Molecular Adsorbent Recirculating System*) en las primeras horas cuando los compuestos tóxicos están presentes en el plasma. Para limpieza de las toxinas endógenas producidas por falla hepática y renal se puede utilizar Prometheus® para la remoción de compuestos tóxicos solubles en agua y unidos a proteínas. En cuanto al tratamiento farmacológico, la silimarina y el lúpulo han demostrado su eficacia en el tiempo.

**Palabras Clave:** *Amanita phalloides* que crece en Argentina; micetismo; ciclopéptidos; *alfa-* y *beta-*amanitinas; fases clínicas; diagnóstico; tratamiento; criterios para trasplante hepático.

## **Intoxications due to ingestion of the higher fungus *Amanita phalloides*, which grows in Argentina. Clinical phases, diagnosis, and treatment.**

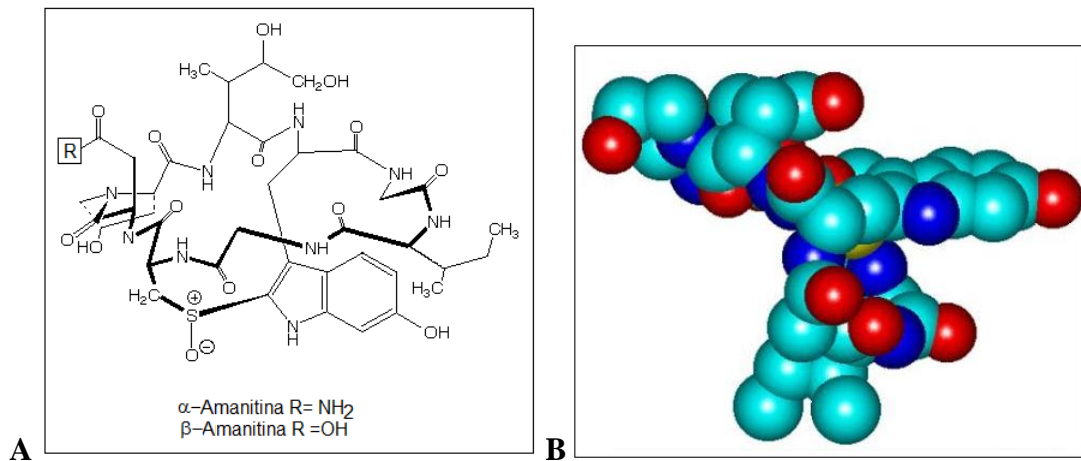
### **Abstract**

The present work addresses the mycetism by *Amanita phalloides*, which grows in Argentina, from its diagnosis, confirmation of the toxic compounds by detection of *alpha*- and *beta*-amanitins in the patient, including treatment and follow-up by clinical analysis. The different phases of the mycetism were determined and, according to international criteria, the need for liver transplantation, after having exhausted the appropriate pharmacological treatment. The key importance of the latency phase of approximately the first 6 hours was evident, during which the search for the toxicant in the blood or urine will be guided according to the time it remains in them. High-resolution automated capillary electrophoresis proved to be a rapid and simple method for the determination of these cyclopeptides in urine. The development of the condition is prevented by the application of extracorporeal liver assistance devices, such as the molecular adsorbent recirculating system (MARST<sup>TM</sup>) in the first hours when the toxic compounds are present in plasma. To cleanse endogenous toxins produced by liver and kidney failure, Prometheus® can be used to remove water-soluble and protein-bound toxic compounds. Regarding pharmacological treatment, silymarin and hops have proven effective over time.

**Keywords:** *Amanita phalloides* that grows in Argentina; mycetism; cyclopeptides; *alpha*- and *beta*-amanitins; clinical phases; diagnosis; treatment; criteria for liver transplantation.

### **1. Introducción**

Durante el otoño, después de las lluvias, suelen crecer los carpóforos de hongos superiores, como *Amanita phalloides* (Vaill. ex Fr.) Secr. que es un hongo Basidiomicete de elevada toxicidad que crece en el Parque Pereyra Iraola, en Argentina. La llamativa apariencia de estos hongos tóxicos hace que varios recolectores *amateurs* los consuman y ofrezcan a familiares y conocidos. Algo similar ocurre en primavera. La situación se agrava porque ni la cocción ni el congelamiento destruyen a los dos tipos de toxinas ciclopeptídicas que contienen los carpóforos, es decir las amatoxinas y las falotoxinas, como se confirma en algunos casos analizados por este grupo de investigación [1]. La intoxicación por *Amanita phalloides* se produce por la entrada de las amatoxinas (y falotoxinas) al organismo, ya sea por ingestión, inyección o inhalación, pero no por vía percutánea como se demostrara previamente [2]. Recordemos que sólo las amatoxinas son tóxicas y letales por vía oral [1].  $\alpha$ - y  $\beta$ -Amanitinas (**Figura 1**) son las amatoxinas mayoritarias.



**Figura 1:** Estructuras químicas de  $\alpha$ - y  $\beta$ -amanitinas. **A:** Estructura primaria. **B:** Estructura 3D con la estereoquímica.

Las intoxicaciones así producidas, dan lugar al ingreso a Centros de Emergencias ante la presentación de los primeros síntomas. Varios de esos casos los hemos registrado, incluyendo el manejo de la intoxicación y el tratamiento elegido, observando la evolución de los pacientes hacia una recuperación total, o un trasplante hepático, o bien, un desenlace fatal. Los pacientes provenían del Centro de Asesoramiento y Asistencia Toxicológica, Hospital Interzonal de Agudos "Sor María Ludovica" de La Plata, Provincia de Buenos Aires, dada la cercanía con el Parque Pereyra Iraola, donde se registraron las intoxicaciones mencionadas.

En base a la observación de los pacientes intoxicados, nuestro grupo de investigación pudo establecer que este micetismo presenta cuatro fases bien distintivas en el desarrollo del mismo hasta el desenlace final, si bien la mayoría de los autores indican tres fases [3,4].

A continuación presentamos las fases clínicas de este micetismo, el tipo de evolución que sufren los pacientes y la importancia de los parámetros bioquímicos para seguir el curso de la intoxicación y del tratamiento.

## 2. FASES CLÍNICAS DEL MICETISMO EN PACIENTES. Sintomatología y Órganos Afectados

**Fase 1:** Primera etapa asintomática de **0-6 horas**.

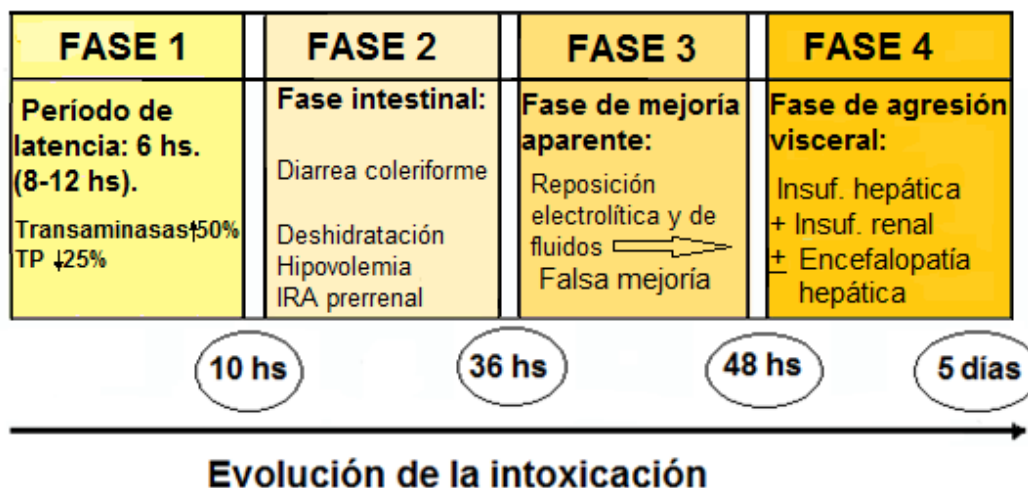
**Fase 2:** Las toxinas producen síntomas que aparecen entre las **6 y 24 horas** (normalmente 12 horas) después de haber ingerido los hongos.

**Fase 3:** Los pacientes tienen un período intermedio de **1-7 días** de falsa recuperación por resolución de los síntomas gastrointestinales, pero con hepatotoxicidad progresiva, coagulopatía e insuficiencia renal.



**Fase 4:** Después de la fase anterior, los pacientes manifiestan signos y síntomas de insuficiencia hepatorenal, con resolución si el paciente sobrevive (> 7 días) [5,6] (**Figura 2**).

### **Fases clínicas del micetismo por *Amanita phalloides***



**Figura 2:** Fases del micetismo provocado por ingestión de *Amanita phalloides*.

La ingestión de *A. phalloides* resulta generalmente letal, actualmente con un 20% estimado de tasa de mortalidad [7], debido a la detección tardía de la intoxicación con la consiguiente ineficacia del tratamiento.

En detalle, las manifestaciones clínicas de la intoxicación por especies de *Amanita*, como *Amanita phalloides*, pasan por **cuatro períodos evolutivos** consecutivos (a veces se solapan):

**1) Período de latencia o Fase de incubación tras la ingestión (superior a 6 horas):** Período asintomático 6-12 horas (puede extenderse hasta 15 o 18 horas), típico de la intoxicación, por lo que se incluye en todas las descripciones clínicas. La ingestión de ejemplares de diferentes especies del género *Amanita*, sección *Phalloideae*, puede modificar este intervalo asintomático; así, por ejemplo, en los casos de micetismo por *Amanita verna* suele producirse en más de 15 horas. Datos de laboratorio: Aumento de transaminasas en un 50%; disminución del tiempo de protrombina en un 25%.

**2) Período gastrointestinal o Fase intestinal o coleriforme:** La mayoría de los intoxicados acude a un servicio de emergencias cuando se encuentra en esta fase.

Como su nombre lo indica, se caracteriza por un cuadro severo de gastroenteritis que aparece a las 10 horas después de su ingestión, si bien existen casos con esta fase tras 6 y 24 horas de la ingestión. El primer día se presenta un cuadro coleriforme: El paciente sufre un fuerte dolor abdominal, náuseas, frecuentes vómitos copiosos y diarrea severa abundante, con

importante deshidratación. El paciente puede presentar cefalea y vértigo. Los trastornos hidroelectrolíticos pueden ocasionar un shock hipovolémico. El cuadro de deshidratación es más o menos importante debido a la pérdida de líquidos y electrolitos, además de la propia acción de la toxina sobre el epitelio del túbulo contorneado proximal y del distal; culmina en insuficiencia renal aguda (IRA) (15% de los casos) prerrenal y renal (unas 36 horas después de la ingesta).

**Datos de laboratorio en esta fase coleriforme:** Aumento de hematocrito, de urea y de creatinina (por la deshidratación). Disminuye la actividad de protrombina en un 25% (por la insuficiencia hepática).

Hay alteración de las transaminasas (40-60%).

En este período se pueden producir: Hepatomegalia; hepatalgia; ictericia; insuficiencia hepática; ardor epigástrico; tenesmo; espasmos de los gemelos; diaforesis; convulsiones; oliguria; cianosis; albuminuria; anuria; bradicardia; hipotensión; muerte.

**3) Período de mejoría aparente o Fase de remisión aparente y engañosa de síntomas:** Aparece a las 48 horas de la ingesta, con resolución del cuadro de gastroenteritis y de la sintomatología digestiva, debida en parte al tratamiento de rehidratación. Se establece una mejoría clínica progresiva, pero continúa la agresión hepática, por lo que puede haber alteración del perfil hepático. Por lo tanto, durante este período de unos 3 días puede apreciarse un empeoramiento analítico de las funciones hepática y renal.

**4) Período de afectación o Fase de agresión visceral (2 a 3 días tras la ingesta; en algunos casos, hasta 6 días postingestión):** Las características de esta fase generalmente aparecen a los 3 días postingesta y pueden durar hasta el quinto día postingesta: Insuficiencia hepática + insuficiencia renal  $\pm$  encefalopatía hepática. Súbito empeoramiento por insuficiencia hepatorenal. Esta fase hepática es la más grave de todas, las toxinas atacan el hígado, con ictericia o tinte amarillo, y como consecuencia provocan una hepatitis tóxica.

Se afectan los riñones, con imposibilidad de orinar (anuria).

Frecuentemente, la muerte ocurre entre los 5 y los 8 días. Los casos más graves desarrollan un cuadro de hepatitis tóxica de gran afectación del estado general, ictericia progresiva y hepatomegalia. Algunos pacientes evolucionan con necrosis hepática masiva, aparición de encefalopatía, ascitis, fracaso renal, síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA) [8], coagulopatía severa y muerte casi siempre por edema cerebral [9,10].

En esta Fase 4 se desarrolla falla hepatorenal e insuficiencia pancreática. Pueden manifestarse claramente las insuficiencias hepática o renal agudas. Se observa: Ictericia,

hepatomegalia blanda y dolorosa, dolor en el hipocondrio derecho, mal estado general, diátesis hemorrágica → Insuficiencia hepática severa con citólisis (hipertransaminasemia, hiperbilirrubinemia, coagulopatía, hipoglucemia). Aumento de transaminasas y disminución de la actividad de protrombina.

En muchos casos se observa: Deterioro neurológico, alteraciones del comportamiento, agitación, euforia, parálisis a diferentes niveles, convulsiones, coma y muerte.

La rápida progresión de la insuficiencia hepática aguda conduce a la insuficiencia multiorgánica y a la muerte en una semana, si el intoxicado no se trata. Por consiguiente, tanto el diagnóstico como el tratamiento precoz son cruciales para la supervivencia de los pacientes con insuficiencia hepática aguda inducida por intoxicación con amatoxinas.

### ***Evolución de la intoxicación***

Al quinto día de evolución se deben observar los datos de laboratorio, en particular los valores de las enzimas hepáticas como las transaminasas y los valores de protrombina.

Si las transaminasas disminuyen y hay recuperación de los valores de protrombina, el pronóstico es esperanzador y se puede esperar el restablecimiento del paciente.

En cambio, si las transaminasas disminuyen bruscamente y no hay recuperación de los valores de protrombina, el pronóstico es negativo, por lo que culminará en necrosis hepatocelular masiva.

En resumen, tras la fase de agresión visceral, la evolución puede llevar a los siguientes desenlaces:

(A) Restablecimiento de la función hepática, que puede ser: Sin secuelas, o bien, con desarrollo de hepatitis crónica. Por eso, la importancia de realizar el seguimiento de los pacientes.

(B) Desarrollo de necrosis hepatocelular masiva. Se observa: Hipoglucemia, encefalopatía hepática, oligoanuria, coagulación intravascular diseminada (CID) y síndrome de disfunción *multiorgánica* (SDMO) [antes conocido como *fallo multiorgánico*, *fallo orgánico múltiple* o *fracaso multiorgánico* (FMO)].

Todo esto expone la *necesidad de un Trasplante hepático*.

### 3. Cómo Establecer un Diagnóstico de Micetismo

Frente a un cuadro clínico de intoxicación, una anamnesis cuidadosa y una descripción precisa de la sintomatología y los signos clínicos, conducen a determinar que se trata de un micetismo.

En primera instancia se puede determinar si es un micetismo de latencia corta, o bien, de latencia larga cuyos síntomas aparecen en general de 8 a 10 horas después de la ingestión y en ocasiones incluso transcurridos hasta 10 o 15 días, dependiendo de la especie ingerida. Las intoxicaciones con un período de latencia prolongado (> 6 horas) [11] son muy graves y pueden llegar a ser fatales debido a la lesión celular directa de órganos vitales.

Lo ideal es conocer la/s especie/s causante/s y a ser posible, tener ejemplares para ser identificados por un micólogo.

La intoxicación más grave se debe al consumo de carpóforos cuyas toxinas poseen un marcado tropismo por el hígado. Pueden llevar a la muerte en el contexto de una insuficiencia hepática fulminante. Su prototipo es la *Amanita phalloides*. Otros carpóforos hepatotóxicos de hongos superiores de especies del género *Amanita* de la sección *Phalloideae* son: *Amanita exitialis* [12], *Amanita lilloi* [13], *Amanita verna*, *Amanita virosa*; también especies de los géneros *Lepiota* y *Galerina* como: *Lepiota brunneoincarnata*, *Lepiota fulvella*, *Lepiota helveola*, *Lepiota josserandii*, *Galerina autumnalis* y *Galerina marginata* [11].

En los pacientes analizados, la muerte sobrevino generalmente por falla hepática fulminante, que se presentó de formas variadas. Cursaron con un cuadro icterico, presentaron síntomas inespecíficos, pero persistentes, con síntomas gastrointestinales severos, tales como náuseas y vómitos, progresando luego hacia el compromiso de conciencia de magnitud variable y evolutiva (encefalopatía hepática) y falla multiorgánica progresiva.

La mortalidad de la falla hepática fulminante es mayor conforme mayor es el grado de encefalopatía, lo que se relaciona con la presencia de complicaciones graves como edema cerebral, insuficiencia renal aguda, insuficiencia respiratoria o sepsis [14,15].

La insuficiencia renal respiratoria, complicaciones frecuentes en este tipo de enfermos, se presentó en algunos casos. Su íntima relación patogénica con el grado de encefalopatía explica que tras una mejor selección de los enfermos sometidos a trasplante hepático se reducen también las complicaciones asociadas, y con ello, la mortalidad [16].

La falla hepática fulminante se define clásicamente como un trastorno de inicio súbito e intenso de la función del hígado que se manifiesta como ictericia y es seguido de encefalopatía hepática dentro de las ocho semanas de inicio, en ausencia de daño hepático previo [17,18].

El diagnóstico de confirmación, mediante el estudio de la presencia de amatoxinas en orina [19] o aspirado digestivo es definitivo. Después de 36 a 48 horas, las toxinas desaparecen del plasma, si bien siguen siendo detectables en la orina [20]. La vigilancia de las intoxicaciones por amatoxinas, así como el control y seguimiento de los tratamientos, se realiza generalmente mediante análisis de orina [7] ya que las amanitinas se pueden detectar en la orina **si el análisis se realiza dentro de las 36 horas posteriores a la ingestión**. Después de las 36 horas, el análisis no es confiable porque un resultado negativo no puede descartar la intoxicación [21]. Existen diferentes métodos para el análisis de orina: Radioinmunoensayo (RIA), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA: *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) con el *kit* comercial ELISA Amanitin (detecta 1,5 ng/ml) [22], inmunoensayo de flujo lateral (LFIA: *lateral flow immunoassay*) desarrollado más recientemente (detecta, 10 ng/ml, de  $\alpha$ - y/o  $\gamma$ -amanitina y 100 ng/ml de  $\beta$ -amanitina) [23], cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa como hemos realizado [1,24] y un método basado en Electroforesis Capilar Automatizada de Alta Resolución, que hemos desarrollado y validado [19].

La biopsia hepática, si bien aporta información pronóstica, etiológica y señala la presencia de daño hepático previo, usualmente está contraindicada por la coagulopatía.

#### **4. APORTES DE LOS DATOS DE LABORATORIO**

Dentro de los datos de laboratorio: en la fase de gastroenteritis se detecta un aumento de las cifras de hematocrito, urea y creatinina. Entre el 40 y 50% de los intoxicados presentan alteración de las transaminasas en este período crítico y en el 25% de los mismos ya se observa un cierto grado de insuficiencia hepatocelular valorada por un descenso de la actividad protrombótica.

Los pacientes con falla hepática aguda muestran alteración de las funciones excretoras y sintéticas del hígado. Por lo tanto, se observa hiperbilirrubinemia de predominio directo y magnitud variable, hipoprotrombinemia, hipoglicemia e hipoalbuminemia [25].

En los casos clínicos, los resultados de laboratorio presentan un elevado aumento de las transaminasas y al final la disminución de las mismas, lo cual no significa que haya existido mejoría, sino que se correlaciona con lo descrito, ya que es característico el aumento de las transaminasas y de bilirrubina; la rapidez de la caída de esta última tiene un valor pronóstico, pues es mayor en aquellos pacientes con una intoxicación más grave.

Valores de transaminasas inferiores a 25% se asocian a una mortalidad de 70%. Tiene un significado pronóstico desfavorable, pues indica la presencia de una necrosis hepatocelular

masiva. En estas formas más graves se llega a una fase terminal con encefalopatía hepática, que puede conducir a un grave coma y al fallecimiento del paciente.

## 5. DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DE LOS PACIENTES

Desde la década de 1960, la intoxicación por *A. phalloides* ha sido registrada con creciente frecuencia en Europa, América del Norte y del Sur, si bien la mortalidad ha disminuido en la última década debido a las mejoras en la atención de apoyo [26-28].

El micetismo pasa por las cuatro fases que hemos descripto anteriormente, donde, a nuestro criterio, la fase latente (**Fase 1**) tiene una función relevante en la intoxicación porque es el inicio del desequilibrio metabólico y la desorganización de la estructura de los tejidos de los diferentes órganos.

Las amatoxinas son octaciclopéptidos que interfieren con la transcripción del ADN [29]. Se unen a una subunidad de 140 kDa de ARN polimerasa II en los núcleos de las células hepáticas con el consiguiente bloqueo de la síntesis de proteínas y finalmente necrosis celular [30]. Las células con una alta tasa de síntesis de proteínas (entre ellas las enzimas), como por ejemplo las del tracto gastrointestinal y del hígado, son las más dañadas. Por lo tanto, las amatoxinas son responsables del daño hepático severo y del deterioro cerebral y renal que conduce a la muerte, que hemos observado en los exámenes histopatológicos en ratones y evidenciado ahora en pacientes.

Como ya hemos visto, la dosis letal al 50% ( $DL_{50}$ ) de  $\alpha$ -amanitina es de 0,1-0,3 mg/kg [1,31] y las falotoxinas parecen exacerbar la acción de las amatoxinas. En detalle, la  $DL_{50}$  de  $\alpha$ -amanitina para los seres humanos es de 0,1 mg/kg [32]; en ratones corresponde a  $DL_{50}$  ( $\alpha$ -amanitina): 0,3 mg/kg [29] y  $DL_{50}$  ( $\beta$ -amanitina): 0,5 mg/kg [33].

La faloidina, que es el principal componente de las falotoxinas, es un heptapéptido bicíclico de aproximadamente 800 Da (788,97g/mol), termoestable y fácilmente dializable [34]. Las falotoxinas interrumpen la polimerización de actina G a actina F, conduciendo a la desorganización del citoesqueleto y a la muerte celular.

Se recopilaron datos clínicos, anatómo-patológicos y toxicológicos, que se presentaron con especial énfasis en los aspectos histológicos. Se describieron las alteraciones hepáticas y renales típicas de esta intoxicación, que consisten en necrosis masiva de las células lobulillares centrales hepáticas y necrosis tubular aguda del riñón. Fuera del hígado, con frecuencia se encontró diátesis hemorrágica general y edema cerebral severo [35]. Quizás es uno de los pocos trabajos previos que menciona el daño renal causado por este micetismo, que registramos en la mayoría de los casos en nuestros laboratorios.

### ***Diagnóstico de falla hepática fulminante en el micetismo por Amanita phalloides***

El diagnóstico de falla hepática fulminante y su tratamiento continúa siendo uno de los problemas más difíciles en el manejo del paciente con intoxicación por *Amanita*. Cuando la enfermedad hepática aguda muestra signos de gravedad (hipotrombinemia, aún sin encefalopatía), el tratamiento etiológico, si existe, puede ser fundamental para evitar la progresión del daño hepático.

El deterioro de los pacientes es muy rápido, por lo que no es raro que falte tiempo para plantearse la posibilidad del trasplante hepático como medida extrema del tratamiento. La falla hepática aguda generalmente adopta el curso de una falla multiorgánica, con una respuesta sistémica que se puede expresar en una variedad de sistemas.

Esto explica la necesidad de un estricto monitoreo general que se logra en la Unidad de Cuidados Intensivos. El apoyo de soporte permitirá preservar las funciones vitales hasta que el hígado se regenere o esté disponible un órgano para el trasplante.

La disminución del funcionamiento hepático en forma muy rápida, evidenciada a través de las pruebas hepáticas correspondientes, es un factor de mal pronóstico en los pacientes con falla hepática fulminante que rápidamente evoluciona a falla multiorgánica con la necesidad de trasplante.

### ***Ingreso del paciente en el Centro de Salud***

Al ingresar un paciente al Centro de Salud con sospecha de micetismo, se realiza una anamnesis cuidadosa que permite a un especialista de la salud recopilar información mediante preguntas específicas, formuladas al paciente, familiares o personas relacionadas (en este caso, se le denomina heteroanamnesis) para obtener datos útiles y poder efectuar el diagnóstico y el tratamiento adecuado en base a esa información.

Después de la anamnesis, se registran sus datos de laboratorio:

**1) Biometría hemática completa (BHC):** Se mide la composición de glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas en sangre, así como el hematocrito (HCT).

**2) Examen de proteína total:** Se mide la cantidad total de dos clases de proteínas encontradas en la porción líquida de la sangre: **albúmina y globulina.**

**3) Química sanguínea (QS):** Glucosa, urea, creatinina, ácido úrico, colesterol, triglicéridos.

## 6. DETALLES DEL TRATAMIENTO DE LOS PACIENTES

Actualmente, no existen recomendaciones internacionales autorizadas para el manejo de la intoxicación por *Amanita phalloides*. Sin embargo, los principios generales se han descripto en la literatura: Estabilización de las funciones vitales con la corrección de la hipoglucemia y de la pérdida de electrolitos, prevención de la captación de los ciclopéptidos tóxicos en órganos como el hígado y los riñones, descontaminación de los ya absorbidos, uso de antidotos putativos, aumento de la eliminación de los compuestos tóxicos y prevención de complicaciones [6]. La **Tabla 1** muestra los tratamientos que se suelen dar a los pacientes tras el diagnóstico de micetismo por *Amanita phalloides* y hongos relacionados que contienen amatoxinas y falotoxinas.

**Tabla 1: Tratamientos.**

Tratamiento	Dosis y/o Comentarios
<b>Lavado gástrico</b>	Contraindicado en pacientes con pérdida de reflejos protectores de las vías respiratorias (estado deprimido de conciencia; riesgo de hemorragia o perforación gastrointestinal; cirugía reciente; y pacientes con coagulopatías [36].
<b>Carbón activado</b>	30-50 g (o 0,5 g/kg) cada 4 hs durante cuatro días [37,38] para disminuir la circulación enterohepática de las amatoxinas [24,39].
<b>Rehidratación endovenosa</b>	Solución acuosa de cloruro de sodio al 0,9% y dextrosa al 5%.
<b>Silibinina o Silimarina</b>	Flavonolignano, componente del cardo mariano ( <i>Silybum marianum</i> ). <b>Silimarina:</b> Componentes hepatoprotectores, antioxidantes y antiinflamatorios: silibinina (silibina), silidianina y silicristina. La silimarina demostró bloquear <i>in vitro</i> la entrada de las amatoxinas a los hepatocitos [40]. Dosis en bolo de 5 mg/kg e infusión continua de 20 mg/kg/día, cuatro dosis iguales. No perjudica al feto.
<b>Acetilcisteína</b>	Dosis de 150 mg/kg durante 1 h, seguida de 50 mg/kg durante 4 hs y 150 mg/kg durante 16 hs. Dosis de 300 mg/kg i.v. durante 20 horas. Esta terapia no es dañina para el feto.
<b>Terapia con antibióticos <math>\beta</math>-lactámicos</b>	Bencilpenicilina (penicilina G), o bien, ceftazidima. Bencilpenicilina: i.p., 1.000.000 U/kg/día, seis dosis iguales. Se puede utilizar durante el embarazo.
<b>Complejo multivitamínico</b>	Administración de vitamina A, D, E, C, B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , B <sub>6</sub> , B <sub>12</sub> , ácido fólico, ácido pantoténico, D-biotina y nicotinamida; dos veces al día.
<b>Vitamina K</b>	Administración i.v.; una vez al día.
<b>Plasma fresco congelado</b>	15 ml/kg.
<b>Prometheus y MARS</b>	Opcionales.

H: hora; hs: horas; i.p.: intraperitoneal; i.v.: endovenosa.



El paciente requiere internación inmediata. La **atención de apoyo** es la base de la terapia para la mayoría de los pacientes intoxicados con este micetismo y está dirigida a tratar la deshidratación y pérdida de electrolitos que ocurren durante la fase gastrointestinal [41], así como la estabilización de las funciones vitales. Además, la inhibición de la síntesis de proteínas por las amatoxinas y el daño a los hepatocitos pueden alterar la producción de factores de coagulación [42] y, por lo tanto, puede ser necesaria la administración de **vitamina K** intravenosa y **plasma fresco congelado** [43].

Ante el ingreso de un paciente con esta intoxicación, las medidas iniciales consisten en:

- 1) Instalación de una sonda nasogástrica para aspiración continua y administración periódica de carbón activado y de catárticos.
- 2) Intensa reposición de líquidos por vía endovenosa, con soluciones salina y glucosada; diuresis forzada neutra: 3-4 ml/kg/hora de orina durante el primer día.
- 3) Control y seguimiento de los parámetros analíticos, balance hídrico, constantes, presión venosa central y diuresis. Control metabólico.
- 4) Administración por vía intravenosa de 20 a 50 mg/kg/día de silibinina (Legalon® ampollas) o bencilpenicilina (penicilina G): 300.000 U/kg/día (en perfusión continua).
- 5) Lavado gástrico con carbón activado.
- 6) Evitar el uso de benzodiazepinas.
- 7) Control de la vía aérea, así como ventilación mecánica en caso necesario.
- 8) Aporte nutricional.
- 9) Profilaxis gastrointestinal.
- 10) En caso de presentar signos de fracaso hepatocelular, plantear la posibilidad de un trasplante hepático ortóptico (alotrasplante) [9,25], siempre que se reúnan las condiciones exigidas para tal caso (**Tabla 2**).

Las indicaciones para el trasplante de hígado para pacientes que ingieren *Amanita phalloides* incluyen una combinación de disminución de la actividad de la protrombina >50%, aumentos marcados en la actividad de las aminotransferasas séricas y las concentraciones de amoníaco, y cuando está presente, hipofibrinemia, disminución del factor V, acidosis e hipoglicemia [3,44]; ver detalles de los tres tipos de criterios en la **Tabla 2**.

**Tabla 2: Criterios para trasplante hepático.**

<b>Hospital del King's College de Londres [45]</b>	<b>Ganzert et al. (2005) [46]</b>	<b>Escudié et al. (2007) [47]</b>
Tiempo de protrombina >100 seg	Tiempo de protrombina < 25%	Tiempo de protrombina < 10%
<b>≤ 3 de estos criterios:</b> - Tiempo de protrombina >50 seg o INR >3,5. - Billirrubina total sérica > 18 mg/dl. - Edad < 10 años o > 40 años. - Ictericia > 7 días previa a encefalopatía. - Etiología.	Creatinina plasmática > 106 $\mu$ moles/l	Período de incubación < 8 horas

INR (*internacional normalized ratio*): El índice internacional normalizado indica el tiempo que tarda la sangre en coagularse [48]. En una persona normal: INR = 1. Si una persona toma un anticoagulante, INR > 1, porque se alarga el tiempo que tarda en coagularse la sangre. El INR se calcula como la relación del tiempo de protrombina (TP) del paciente y el TP control normal, que luego se eleva a la potencia del valor ISI para el sistema de análisis utilizado:  $INR = (TP \text{ del paciente} / TP \text{ control normal})^{ISI}$ . ISI: índice de sensibilidad internacional; está generalmente entre 1 y 2.

### **Complicaciones**

En los pacientes se presentaron las siguientes complicaciones secundarias a la falla hepática fulminante: la **deshidratación** que fue secundaria al síndrome coleriforme y originó insuficiencia renal aguda de tipo prerrenal. El **síndrome de dificultad respiratoria aguda** (SDRA) en una fase terminal y la **coagulopatía, encefalopatía hepática**, la cual desarrolla frecuentemente **edema cerebral**. Este se presenta en el 80% de los pacientes con encefalopatía grado IV y es la primera causa de muerte en este subgrupo de enfermos. Se denomina encefalopatía hepática a la pérdida de la función cerebral cuando el hígado ya no es capaz de eliminar las toxinas de la sangre. Puede presentarse repentinamente o puede desarrollarse lentamente. Se considera encefalopatía leve al grado I y severa a los grados II-IV.

La **sepsis** complica hasta el 80% de los casos de falla hepática aguda y causa la muerte en 11% [49].

Los **trastornos de la coagulación** son típicos de la falla hepática fulminante y predisponen a sangrado gastrointestinal y en sitios de punción. El trastorno se refleja en la prolongación del tiempo de protrombina (por disminución de la producción de los factores I, II, V, VII, IX y X). Se suele administrar vitamina K para compensar su déficit. La corrección del tiempo de protrombina con plasma está sólo indicado si hay sangrado activo o antes de un procedimiento invasivo. Su uso profiláctico no mejora la evolución.

La **hipoglucemia** es frecuente como consecuencia de la depleción de glicógeno hepático y gluconeogénesis disminuida. Usualmente se requiere un aporte continuo de glucosa al 10%. Se debe administrar tiamina (vitamina B<sub>1</sub>, que ayuda a las células del organismo a convertir carbohidratos en energía) durante tres días para evitar el déficit agudo de esta vitamina al aportar infusiones de carbohidratos.

Otros trastornos metabólicos son: alcalosis respiratoria de origen central, acidosis metabólica, hipofosfonemia, hipopotasemia, hiponatremia e hipomagnesemia.

### ***Hemodiálisis y hemoperfusión o plasmaféresis***

No existe una estrategia de tratamiento estándar y ningún antídoto contra la **insuficiencia hepática**. Se han propuesto técnicas de desintoxicación, como la **plasmaféresis** o **recambio plasmático terapéutico**, en combinación con **terapia de apoyo** para remover los compuestos tóxicos del plasma, logrando así una disminución sustancial en las tasas de mortalidad por debajo del 10% [50]. Las principales complicaciones de estos procedimientos son las infecciones y los trastornos de la coagulación.

Dado que **las amatoxinas sólo se detectan en el plasma en la fase temprana de la intoxicación y por un corto tiempo**, se considera que su remoción por vía extracorpórea, usando **hemodiálisis, hemoperfusión o plasmaféresis**, no elimina cantidades significativas de las toxinas; sólo ocurre si se aplican a las pocas horas después de la ingestión [20,51]. No se recomiendan, a menos que los pacientes presenten **signos de insuficiencia renal aguda**, requiriendo entonces hemodiálisis, en forma de hiperpotasemia, acidosis metabólica, signos urémicos y encefalopatía. Sin embargo, la **hemoperfusión con carbón activado** aplicada tempranamente ha dado resultados muy satisfactorios [52].

### ***Dispositivos extracorpóreos de asistencia hepática***

Se utilizan para aumentar la remoción de un tóxico y también para mejorar la eliminación de sustancias biológicas endógenas (amoníaco, urea, creatinina, bilirrubina, ácidos biliares, aminoácidos, citoquinas, agentes vasoactivos) en la insuficiencia hepática aguda. La mayoría de las técnicas se basan en el principio de la diálisis con albúmina, que se usa como transición al trasplante hepático (que a veces así se puede evitar) o después del mismo cuando hay disfunción del injerto y se quiere evitar un segundo trasplante [53]. Se dializa la sangre contra una solución que contiene albúmina a través de una membrana permeable de alto flujo.

El sistema de separación y adsorción de plasma fraccionado denominado **Sistema FPSA** (*fractionated plasma separation and adsorption system*) es un dispositivo de apoyo hepático extracorpóreo de separación fraccionada de plasma, adsorción y diálisis, que permite la remoción de toxinas solubles en agua y unidas a proteínas. Se comercializa con el nombre de **Prometheus®** (**Prometheus®** 4008H, Fresenius Medical Care AG, Bad Homburg, Alemania) y se utiliza en pacientes intoxicados con *Amanita phalloides* [54-57].

Otro sistema reconocido es el **sistema de recirculación molecular adsorbente (MARS™: Molecular Adsorbent Recirculating System)** que se usa en el manejo de intoxicaciones por *A. phalloides* [58], como así también con otras especies del género *Amanita* sección *Phalloideae*, como *A. bisporigena* [59-62]. Como la  $\alpha$ -amanitina se elimina rápidamente del plasma, estas técnicas pueden ser especialmente útiles si los pacientes se presentan en la unidad hospitalaria cuando aparecen los primeros síntomas.

### **Terapia con fármacos**

La terapia con fármacos consiste en el uso de antibióticos  $\beta$ -lactámicos (bencilpenicilina, ceftazidima), complejo de silimarina o silibinina pura, *N*-acetil-*L*-cisteína, fármacos antioxidantes, vitamina C, vitamina E, cimetidina, ácido  $\alpha$ -lipoico (también llamado ácido tióctico) administrados por separado, o combinados [41,63]. De éstos, sólo bencilpenicilina, ceftazidima, *N*-acetilcisteína y silibina mostraron algún grado de eficacia terapéutica [64]. El uso de esteroides, hormonas de crecimiento y glucagón se asoció con una disminución de la supervivencia de los pacientes, lo que llevó a la exclusión de estos tratamientos en el manejo de estas intoxicaciones [41,64]. Parece prudente descartar el uso de vancomicina o aminoglucósidos, debido a su nefrotoxicidad, en estos pacientes con alto riesgo de insuficiencia renal. Los antídotos con propiedades antioxidantes siguen siendo los tratamientos más efectivos hasta la fecha, lo que muestra el rol predominante del estrés oxidativo en la fisiopatología.

Silibinina (sola o en combinación) y *N*-acetilcisteína (fuerte antioxidante) deberían utilizarse como **terapia de primera línea**, debido a las tasas de mortalidad observadas de 5,6% y 6,8% respectivamente [41,64,65]. La silibina parece ser más eficaz como monoterapia, ya que la mortalidad total en pacientes intoxicados tratados con silibina intravenosa es <10% en comparación con >20% cuando se usa bencilpenicilina o una combinación de silibina y bencilpenicilina [66]. Silimarina ha sido aprobada para el tratamiento de la intoxicación por *Amanita phalloides* en la Unión Europea bajo el nombre de

Legalon® (Rottapharm Madaus, Colonia, Alemania), o bien Legalon® SIL (silibinina-C-2',3-succinato de dihidrógeno, sal disódica; Rottapharm Madaus) [66], o más recientemente, Eurosil 85 [67].

La silimarina ejerce su efecto hepatoprotector después de la administración intravenosa [3,66-68], de varias maneras:

- a) Por sus efectos antiinflamatorios, acción de reparación tisular y actividad antifibrótica.
- b) Por su acción antioxidante al disminuir las ROS y la peroxidación lipídica.
- c) Por interrumpir la recirculación enterohepática de las amanitinas.
- d) Por inhibir la unión de las amatoxinas a las membranas del hepatocito.
- e) Por inhibir, de manera competitiva, al transportador OATP1B3 de las amatoxinas, evitando la entrada de las amanitinas en las células hepáticas [69].
- f) Por inhibir la liberación de TNF- $\alpha$  en los hepatocitos lesionados, disminuyendo así la apoptosis inducida por TNF- $\alpha$  en la intoxicación por amatoxinas.
- g) Por estimular la síntesis de ARN ribosomal para restaurar la síntesis proteica y aumentar la capacidad regenerativa del hígado [70].

El **tratamiento de segunda línea** sería mediante bencilpenicilina sola o en combinación, con tasas de mortalidad observadas del 10,7% [41,64].

Al igual que en otras intoxicaciones, se ha propuesto la inmunoterapia contra las amanitinas. Sin embargo, si bien se demostró un efecto protector parcial de estos anticuerpos contra las amanitinas *in vitro* [71], la fuerte nefrotoxicidad asociada con los anticuerpos específicos de amanitina encontrados en ratones no condujo a mayor desarrollo [72,73].

No se disponía de un antídoto eficaz hasta que en 2015 se propuso la polimixina B [74] y en mayo de 2023 el verde de indocianina [75], demostrado en ratones en ambos casos. También los prenilflavonoides del lúpulo, como el xantumol y el isoxantumol se encuentran en fase clínica para su uso como hepatoprotectores [76, 77].

Han surgido nuevas combinaciones terapéuticas que merecen más investigaciones preclínicas: por ejemplo, la polimixina B que inhibe a OATP1B3 y al transportador de RNAP II, combinada con la metilprednisolona que inhibe al transportador NTCP dio resultados positivos en ratones [78]. Sin embargo, el uso en humanos requiere más estudios debido al impacto negativo de los corticosteroides.

Los fundamentos fisiopatológicos de la acción de los fármacos mencionados son:

- a) La inhibición del transportador OATP1B3 de las amatoxinas para la entrada a los hepatocitos (por antibióticos del núcleo de  $\beta$ -lactámicos como bencilpenicilina) [69,79,80].
- b) La inducción de efectos antioxidantes (por *N*-acetilcisteína, vitamina C, vitamina E, cimetidina, ácido  $\alpha$ -lipoico).

- c) Un efecto combinado de antioxidante y de inhibidor de OATP1B3 (por silibinina o silimarina) [41,46,47,69].
- d) Protección de los hepatocitos humanos contra la apoptosis inducida por  $\alpha$ -amanitina, dependiente de p53 y caspasa-3 (por bencilpenicilina y *N*-acetilcisteína) [81].

## 7. Parte Experimental

**Carpóforos utilizados:** Se utilizaron carpóforos de *Amanita phalloides* (Vaill ex Fr.) Secr. recolectados en otoño e identificados en el Instituto PHRIDEB de Micología del Departamento de Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA), habiéndose depositado ejemplares bajo el número: BAFC 34.547.

**Extracción, aislamiento y cuantificación de  $\alpha$ - y  $\beta$ -amanitinas en los hongos:** Las etapas de extracción, aislamiento y cuantificación de  $\alpha$ - y  $\beta$ -amanitinas de los carpóforos de *Amanita phalloides* se han explicado en detalle recientemente [1], realizando determinaciones mediante cromatografía líquida de alta resolución, sola y combinada con espectrometría de masa tándem.

**Aplicación de técnicas espectroscópicas:** Los ciclopéptidos en estudio, amanitinas y falotoxinas se analizaron por técnicas de resonancia magnética nuclear (RMN) protónica ( $^1\text{H}$ ) y de  $^{13}\text{C}$ , y espectrometría de masa, registrándose por primera vez los correspondientes espectros.

**Pacientes:** Los pacientes provenían del Centro de Asesoramiento y Asistencia Toxicológica, Hospital Interzonal de Agudos Especializado en Pediatría "Sor María Ludovica", Calle 14, Nro. 1631, B 1900 La Plata, Provincia de Buenos Aires. Responsable: Dra. Ana María Girardelli; dada la cercanía con el Parque Pereyra Iraola, donde se registraron las intoxicaciones mencionadas.

### **Estudios en pacientes intoxicados por micetismo:**

**Muestras de sangre y de orina de pacientes intoxicados:** Las muestras de sangre y de orina de casos sospechosos de intoxicación por ingestión de hongos tóxicos (micetismo) fueron provistas por el Centro de Toxicología de La Plata. Todas las muestras fueron filtradas por membrana de 0,22  $\mu\text{m}$ . De la sangre se obtuvo el suero y de la orina el eluido obtenido de la extracción en fase sólida (libre de proteínas y otros interferentes). Las correspondientes muestras control se obtuvieron de voluntarios sanos, igualmente procesadas.

Las toxinas se detectaron mediante ELISA, HPLC, electroforesis común y electroforesis capilar según los procedimientos desarrollados en nuestros laboratorios.

**Análisis bioquímicos:** Se realizaron determinaciones de las concentraciones de urea, creatinina, glucosa, transaminasa glutámico pirúvica (GPT) o alanina. aminotransferasa (ALT), fosfatasa alcalina, calcio, fósforo, sodio y potasio en un equipo autoanalizador Aeroset de Abbot y los reactivos utilizados para todas las determinaciones fueron de Biosystem.

Algunos estudios preliminares fueron realizados por métodos colorimétricos en un espectrofotómetro Metrolab Junior Modelo 325 y utilizando reactivos marca Wiener.

**Análisis estadístico:** Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado y los resultados se expresaron como valor medio  $\pm$  desviación estándar. Se usó el ensayo *t* de Student para determinar la significancia estadística de las diferencias entre grupos.

## 8. Conclusiones

La ingestión de *A. phalloides* resulta generalmente letal, actualmente con un 20% estimado de tasa de mortalidad, debido a la detección tardía de la intoxicación con la consiguiente ineficacia del tratamiento.

Es necesario un diagnóstico precoz con el fin de evitar el tratamiento invasivo y costoso y para mejorar el pronóstico del paciente.

La intoxicación produce síntomas tipo cólera, que generalmente aparecen después de 8 a 12 horas de la ingestión como analizamos en detalle en el presente trabajo. Los pacientes demoran en promedio unas 32 horas en recibir atención médica según registros previos [82], corroborados en los casos registrados en Argentina, debido a que sólo acuden a los centros médicos cuanto la sintomatología se intensifica..

Las amatoxinas (como las amanitinas) son octapéptidos bicíclicos aparentemente únicos responsables de la intoxicación, si bien las falotoxinas contribuyen también a la intoxicación al alterar y destruir las membranas de los hepatocitos, facilitando así la entrada de las amatoxinas en las células. La dosis letal al 50% (DL<sub>50</sub>) de  $\alpha$ -amanitina para los seres humanos es de 0,1 mg/kg [32]. Los órganos diana son la mucosa intestinal, el hígado y los riñones como se había determinado anteriormente [21,41], y que hemos comprobado, pero también los pulmones, cerebro y corazón se ven muy afectados como lo hemos demostrado en los pacientes observados.

El problema de esta intoxicación es que todas las toxinas son estables al calor, las enzimas y los agentes en el tracto gastrointestinal. Además las amatoxinas son estables al almacenamiento de los carpóforos en freezer durante 7-8 meses [83] y en muestras congeladas de orina por hasta 6 meses [84].

Por lo tanto, lo único que resta por hacer es No consumir carpóforos de *Amanita phalloides*.

Además si se recolectan hongos silvestres, es necesario determinar claramente (taxonómicamente o químicamente) que no son hongos tóxicos.

### Agradecimientos

Los autores agradecen a la Universidad de Buenos Aires y al Hospital de Clínicas por la infraestructura y facilidades concedidas. ABP es Investigadora Superior del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de Argentina (CONICET).

### Referencias

1. Battista S.M., Vitale A.A., Alonso Á., et al. Ciclopéptidos tóxicos de *Amanita phalloides* que crece en Argentina: Extracción, identificación y cuantificación de amatoxinas y falotoxinas. Presencia de otros compuestos tóxicos. *An. Asoc. Quím. Argent.* 2023; 110 (1): 73-100.
2. Kaya E., Surmen M.G., Yaykasli K.O., et al. Dermal absorption and toxicity of *alpha* amanitin in mice. *Cutan. Ocul.Toxicol.* 2014; 33 (2): 154-160.
3. Klein A.S., Hart J., Brems J.J., et al. *Amanita* poisoning: treatment and the role of liver transplantation. *Am. J. Med.* 1989; 86 (2): 187-193.
4. Ventura S., Ruiz C., Durán E., et al. Amanitinas. *Rev. Lab. Clín.* 2015; 8 (3): 109-112.
5. Diaz J.H. Evolving global epidemiology, syndromic classification, general management, and prevention of unknown mushroom poisonings. *Crit. Care Med.* 2005; 33 (2): 419-426.
6. Diaz J.H. Syndromic diagnosis and management of confirmed mushroom poisonings. *Crit. Care Med.* 2005; 33 (2): 427-436.
7. Butera R., Locatelli C., Coccini T., et al. Diagnostic accuracy of urinary amanitin in suspected mushroom poisoning: a pilot study. *J. Toxicol. – Clin. Toxicol.* 2004; 42 (6): 901-912.
8. Manteiga Riestra E., Martínez González Ó., Frutos Vivar F. Epidemiología del daño pulmonar agudo y síndrome de distrés respiratorio agudo. *Med. Intensiva* 2006; 30 (4): 151-161.
9. Sass D.A., Shakil A.O. Fulminant hepatic failure. *Gastroenterol. Clin. North Am.* 2003; 32 (4): 1195-1211.
10. Bernuau J. Acute liver failure: avoidance of deleterious cofactors and early specific medical therapy for the liver are better than late intensive care for the brain. *J. Hepatol.* 2004; 41 (1): 152-155.
11. Pomilio A.B., Battista S.M., Alonso A. Micetismos. Parte 1: Síndromes con período de latencia tardía. *Acta Bioquim. Clin. Latinoam.* 2018; 52 (4), 459-487.
12. Meng H., Chen Z.-Y., Chen L.-C., et al. An outbreak of *Amanita exitialis* poisoning. *Clin. Toxicol.* 2023; 61 (4): 270-275.
13. De Souza Viera Morales R., Mendez Gura M., Pose Roman D. Hepatotoxicidad por *Amanita lilloi*, reporte de primeros casos. *Acta Toxicol. Argent* 2016; 24 (2): 128-133.
14. Catalina M.V., Nuñez O., Ponferrada A., et al. Toxicidad hepática por ingesta de setas: curso clínico y nuevas perspectivas de tratamiento. *Gastroenterol. Hepatol.* 2003; 26 (7): 414-420.
15. Martínez S., Escorsell A. Etiología y pronóstico de la hepatitis fulminante. *Rev. Gastroenterol.* 2003; 417-420.
16. Williams R. Classification, etiology, and considerations of outcome in acute liver failure. *Semin. Liver Dis.* 1996; 16 (4): 343-348.
17. Bernuau J., Benhamou J.P. Fulminant and subfulminant liver failure. En: Bircher J., Benhamou J.P., McIntyre N., Rizzetto M., Rodés J. (ed.), *Oxford Textbook of Clinical Hepatology*. 2a ed., vol. 2. Oxford University Press, Oxford, Reino Unido; 1341-1374; 1999.
18. Bernal W., Wendon J. Liver transplantation in adults with acute liver failure. *J. Hepatol.* 2004; 40 (2): 192-197.



19. Battista S.M., Pomilio A.B., Vitale A.A. *Detección y cuantificación de ciclopeptidos tóxicos de Basidiomicetes por electroforesis capilar de alta resolución, para evaluación temprana de intoxicaciones*. Poster 140. VI Congreso Argentino de la Calidad en el Laboratorio Clínico (CALILAB 2010). IV Jornada Latinoamericana de la Calidad en el Laboratorio Clínico. 3 al 5 de noviembre en Puerto Madero, Buenos Aires, Universidad Católica Argentina; organizado por la Fundación Bioquímica Argentina; 2010.
20. Jaeger A., Jehl F., Flesh F., *et al.* Kinetics of amatoxins in human poisoning: therapeutic implications. *J. Toxicol. – Clin. Toxicol.* 1993; 1 (1): 63-80.
21. Karlson-Stiber C., Persson H. Cytotoxic fungi--an overview. *Toxicon* 2003; 42 (4): 339-349.
22. Staack R., Maurer H. New Bühlmann ELISA for determination of amanitins in urine - Are there false positive results due to interferences with urine matrix, drugs or their metabolites? *Toxichem Krimtech* 2000; 68 (2): 68-71.
23. Bever C.S., Adams C.A., Hnasko R.M., *et al.* Lateral flow immunoassay (LFIA) for the detection of lethal amatoxins from mushrooms. *PLoS One* 2020; 15 (4): e0231781.
24. Barceloux D.G. *Medical Toxicology of Natural Substances: Foods, Fungi, Medicinal Herbs, Plants, and Venomous Animals*. Amatoxin – containing mushrooms. John Wiley & Sons incorporated Publication; pp. 265-284; 2008.
25. Martínez Camacho H.A., González Ramírez Benfield J.R. Hepatitis aguda fulminante. *Med. Interna Méx.* 2006; 22 (4): 334-342.
26. Floersheim G.L., Weber O., Tschumi P., *et al.* Die Klinische Knollenblätterpilzvergiftung (*Amanita phalloides*): prognostische Faktoren und therapeutische Massnahmen. *Schweiz. Med. Wochenschr.* 1982; 112 (34): 1164-1177.
27. Hruby K., Csomos G., Fuhrmann M., *et al.* Chemotherapy of *Amanita phalloides* poisoning with intravenous silibinin. *Hum. Toxicol.* 1983; 2 (2): 183-195.
28. Rodríguez-Maldonado M.G., López-Álvarez F., Andrade-Padilla M.A. Intoxicación por hongos: A propósito de un niño con falla hepática. *Rev. Mex. Pediatr.* 2008; 75 (4): 171-174.
29. Wieland T., Faulstich H. Amatoxins, phallotoxins, phallolysin, and antamanide: the biologically active components of poisonous *Amanita* mushrooms. *Crit. Rev. Biochem.* 1978; 5 (3): 185-260.
30. Dorizzi R., Michelot D., Tagliaro F., *et al.* Methods for chromatographic determination of amanitins and related toxins in biological samples. *J. Chromatogr.* 1992; 580 (1-2): 279-291.
31. Vesconi S., Langer M., Iapichino G., *et al.* Therapy of cytotoxic mushroom intoxication. *Critical Care Medicine* 1985; 13 (5): 402-406.
32. Vetter J. Toxins of *Amanita phalloides*. *Toxicon* 1998; 36 (1): 13-24.
33. Deshpande S.S. *Handbook of Food Toxicology*. ICR Press: Boca Raton, EE.UU.; 2002.
34. Chang L.M., Yun H.S., Kim Y.S., *et al.* Aucubin: potential antidote for  $\alpha$ -amanitin poisoning. *J. Toxicol. – Clin. Toxicol.* 1984; 22 (1): 77-85.
35. Fineschi V., Di Paolo M., Centini F. Histological criteria for diagnosis of *Amanita phalloides* poisoning. *J. Forensic Sci.* 1996; 41 (3): 429-432.
36. Vale J.A., Kulig K., American Academy of Clinical Toxicology; *et al.* Position paper: gastric lavage. *J. Toxicol. – Clin. Toxicol.* 2004; 42 (7): 933-943.
37. CIAV. Centro de informação antivenenos: *Protocolo terapéutico preconizado pelo CIAV nos casos de intoxicação por Amanita phalloides*. En: Instituto Nacional de Emergência Médica - INEM IP, Portugal; 2014.
38. TOXBASE. *Clinical Toxicology Database of the United Kingdom*. National Poisons Information Service: *Amanita phalloides* - features and Management; 2023. Accesible en: [www.toxibase.org](http://www.toxibase.org).
39. Mitchel D.M. *Amanita* mushroom poisoning. *Annu. Rev. Med.* 1980; 31: 51-57.
40. Cortese S., Risso M., Trapassi J.H. Intoxicación con *Amanita phalloides*: Serie de tres casos. *Acta Toxicol. Argent.* 2013; 21 (2): 110-117.
41. Enjalbert F., Rapior S., Nouguier-Soulé J., *et al.* Treatment of amatoxin poisoning: 20-year retrospective analysis. *J. Toxicol. – Clin. Toxicol.* 2002; 40 (6): 715-757.
42. Faulstich H. New aspects of *Amanita* poisoning. *Klin. Wochenschr.* 1979; 57 (21): 1143-1152.
43. Alves A.G.F., Gouveia Ferreira M., Paulo J.A., *et al.* Mushroom poisoning with *Amanita phalloides* - a report of four cases. *Eur. J. Intern. Med.* 2001; 12 (1): 64-66.
44. Pinson C.W., Daya M.R., Benner K.G., *et al.* Liver transplantation for severe *Amanita phalloides* mushroom poisoning. *Am. J. Surg.* 1990; 159 (5): 493-499.

45. Polson J., Lee W.M. American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) position paper: the management of acute liver failure. *Hepatology*. 2005; 41 (5): 1179-1197.
46. Ganzert M., Felgenhauer N., Zilker T. Indication of liver transplantation following amatoxin intoxication. *J. Hepatology*. 2005; 42 (2): 202-209.
47. Escudí L., Francoz C., Vinel J.P., et al. *Amanita phalloides* poisoning: reassessment of prognostic factors and indications for emergency liver transplantation. *J. Hepatology*. 2007; 46 (3): 466-473.
48. Perez Pintado E. A propósito del artículo titulado Coeficiente Internacional Normalizado, útil herramienta en la terapia anticoagulante oral. *Medisur* 2017; 15 (2): 168-171.
49. Pérez Gordillo J.H., Colbert Rodríguez M., Cruz Rivera N., et al. Falla hepática fulminante por intoxicación por *Amanita verna*. Reporte de tres casos. *Rev. Hosp. Juárez Méx.* 2009; 76 (3): 168-175.
50. Jander S., Bischoff J. Treatment of *Amanita phalloides* poisoning: I. Retrospective evaluation of plasmapheresis in 21 patients. *Ther. Apher.* 2010; 4 (4): 303-307.
51. Köppel C. Clinical symptomatology and management of mushroom poisoning. *Toxicon* 1993; 31 (12): 1513-1540.
52. Aji D.Y., Calışkan S., Nayir A., et al. Haemoperfusion in *Amanita phalloides* poisoning. *J. Trop. Pediatr.* 1995; 41 (6): 371-374.
53. Faybik P., Hetz H., Baker A., et al. Extracorporeal albumin dialysis in patients with *Amanita phalloides* poisoning. *Liver Int.* 2003; 23 (Suppl. 3): 28-33.
54. Christmann H. (). *Prometheus®* – ein extrakorporales Blutreinigungsverfahren zur Leberunterstützung. *Kardiotechnik* 2006; 4: 108-111.
55. Vardar R., Gunsar F., Ersoz G., et al. Efficacy of fractionated plasma separation and adsorption system (Prometheus) for treatment of liver failure due to mushroom poisoning. *Hepatogastroenterology* 2010; 57 (99-100): 573-577.
56. Bergis D., Friedrich-Rust M., Zeuzem S., et al. Treatment of *Amanita phalloides* intoxication by fractionated plasma separation and adsorption (Prometheus®). *J. Gastrointest. Liver Dis.* 2012; 21 (2): 171-176.
57. Stankiewicz R., Lewandowski Z., Kotulski M., et al. Effectiveness of fractionated plasma separation and adsorption as a treatment for *Amanita phalloides* poisoning. *Ann. Transplant.* 2016; 21: 428-432.
58. Pillukat M.H., Schomacher T., Baier P., et al. Early initiation of MARS® dialysis in *Amanita phalloides*-induced acute liver injury prevents liver transplantation. *Ann. Hepatology*. 2016; 15 (5): 775-787.
59. Shi Y., He J., Chen S., Zhang L., et al. MARS: optimistic therapy method in fulminant hepatic failure secondary to cytotoxic mushroom poisoning – a case report. *Liver* 2002; 22 (Suppl. 2): 78-80.
60. Lionte C., Sorodoc L., Simionescu V. Successful treatment of an adult with *Amanita phalloides*-induced fulminant liver failure with molecular adsorbent recirculating system (MARS). *Rom. J. Gastroenterol.* 2005; 14 (3): 267-271.
61. Mendez-Navarro J., Ortiz-Olvera N.X., Villegas-Rios M., et al. Hepatotoxicity from ingestion of wild mushrooms of the genus *Amanita* section *Phalloideae* collected in Mexico City: two case reports. *Ann. Hepatology*. 2011; 10 (4): 568-574.
62. Wittebole X., Hantson P. Use of the molecular adsorbent recirculating system (MARS) for the management of acute poisoning with or without liver failure. *Clin. Toxicol.* 2011; 49 (9): 782-793.
63. Tavassoli M., Afshari A., Arsene A.L., et al. Toxicological profile of *Amanita virosa* – A narrative review. *Toxicol. Rep.* 2019; 6: 143-150.
64. Poucheret P., Fons F., Doré J.C., et al. Amatoxin poisoning treatment decision-making: pharmacotherapeutic clinical strategy assessment using multidimensional multivariate statistical analysis. *Toxicon* 2010; 55 (7): 1338-1345.
65. Ward J., Kapadia K., Brush E., et al. Amatoxin poisoning: case reports and review of current therapies. *J. Emerg. Med.* 2013; 44 (1): 116-121.
66. Mengs U., Pohl R.-T., Mitchell T. Legalon® SIL: the antidote of choice in patients with acute hepatotoxicity from amatoxin poisoning. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2012; 13 (10): 1964-1970.
67. Gillessen A., Schmidt H.H. Silymarin as supportive treatment in liver diseases: a narrative review. *Adv. Ther.* 2020; 37 (4): 1279-1301.

68. Letschert K., Faulstich H., Keller D., *et al.* Molecular characterization and inhibition of amanitin uptake into human hepatocytes. *Toxicol. Sci.* 2006; 91 (1): 140-149.
69. Maeda K. Organic Anion Transporting Polypeptide (OATP)1B1 and OATP1B3 as important regulators of the pharmacokinetics of substrate drugs. *Biol. Pharm. Bull.* 2015; 38 (2): 155-168.
70. Khazaei R., Seidavi A., Bouyeh M. A review on the mechanisms of the effect of silymarin in milk thistle (*Silybum marianum*) on some laboratory animals. *Vet. Med. Sci.* 2022; 8 (1): 289-301.
71. Chen N., Bowles M.R., Pond S.M. Polyclonal amanitin-specific antibodies: production and cytoprotective properties *in vitro*. *Biochem. Pharmacol.* 1993; 46 (2): 327-329.
72. Kirchner K., Faulstich H. Purification of amatoxin-specific antibodies from rabbit sera by affinity chromatography, their characterization and use in toxicological studies. *Toxicon* 1986; 24 (3): 273-283.
73. Faulstich H., Kirchner K., Derenzini M. Strongly enhanced toxicity of the mushroom toxin  $\alpha$ -amanitin by an amatoxin-specific Fab or monoclonal antibody. *Toxicon* 1988; 26 (5): 491-499.
74. Garcia J., Costa V.M., Carvalho A.T., *et al.* A breakthrough on *Amanita phalloides* poisoning: an effective antidotal effect by polymyxin B. *Arch. Toxicol.* 2015; 89 (12): 2305-2323.
75. Wang B., Wan A.H., Xu Y., *et al.* Identification of indocyanine green as a STT3B inhibitor against mushroom  $\alpha$ -amanitin cytotoxicity. *Nat. Commun.* 2023; 14 (1): 2241.
76. Dorn C., Heilmann J., Hellerbrand C. Protective effect of xanthohumol on toxin-induced liver inflammation and fibrosis. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2012; 5 (1): 29-36.
77. Weiskirchen R., Mahli A., Weiskirchen S., *et al.* The hop constituent xanthohumol exhibits hepatoprotective effects and inhibits the activation of hepatic stellate cells at different levels. *Front. Physiol.* 2015; 6: 140.
78. Garcia J., Costa V.M., Bovolini A., *et al.* An effective antidotal combination of polymyxin B and methylprednisolone for  $\alpha$ -amanitin intoxication. *Arch. Toxicol.* 2019; 93 (5): 1449-1463.
79. Kröncke K.D., Fricker G., Meier P.J., *et al.*  $\alpha$ -Amanitin uptake into hepatocytes. Identification of hepatic membrane transport systems used by amatoxins. *J. Biol. Chem.* 1986; 261 (27): 12562-12567.
80. FDA. *Drug Development and Drug Interactions. Table of Substrates, Inhibitors and Inducers.* Food and Drug Administration, 2023. Accesible en: <https://www.fda.gov/drugs/drug-interactions-labeling/drug-development-and-drug-interactions-table-substrates-inhibitors-and-inducers>
81. Magdalan J., Piotrowska A., Gomulkiwicz A., *et al.* Benzylpenicyllin and acetylcysteine protection from  $\alpha$ -amanitin-induced apoptosis in human hepatocyte cultures. *Exp. Toxicol. Pathol.* 2011; 63 (4): 311-315.
82. Iliev Y., Andonova S., Akavaliev V. Our experience in the treatment of acute *Amanita phalloides* poisoning. *Folia Med. (Plovdiv)* 1999; 41 (4): 30-37.
83. Himmelmann A., Mang G., Schnorf-Huber S. Lethal ingestion of stored *Amanita phalloides* mushrooms. *Swiss Med. Wkly.* 2001; 131 (41-42): 616-617.
84. Maurer H.H., Schmitt C.J., Webber A.A., *et al.* Validated electrospray LC-MS assay for determination of the mushroom toxins alpha- and beta-amanitin in urine after immunoaffinity extraction. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 2000; 748 (1): 125-135.

--

## Método sencillo y rápido para detección y cuantificación de amanitinas, por electroforesis capilar automatizada de alta resolución en orina

Arturo A. Vitale \*<sup>1</sup>, Stella M. Battista<sup>1,2</sup>, Ángel Alonso<sup>2</sup> y Alicia B. Pomilio<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Bioquímica Clínica, Área Hematología, Hospital de Clínicas “José de San Martín”, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. aavitale@sinectis.com.ar; avitale@ffyb.uba.ar; abpomilio@sinectis.com.ar; pomilio@ffyb.uba.ar.

<sup>2</sup> División Alergia e Inmunología, Hospital de Clínicas “José de San Martín”, Universidad de Buenos Aires, Av. Córdoba 2351, C1120AAF Buenos Aires, Argentina. aalonsomed@gmail.com.

\* Prof. Dr. Arturo A. Vitale: aavitale@sinectis.com.ar; avitale@ffyb.uba.ar

Recibido: 22 de noviembre de 2023

Aceptado: 12 de diciembre de 2023

---

### Resumen:

El presente trabajo, fue desarrollado en vista de la urgencia diagnóstica que presenta el micetismo provocado por *Amanita phalloides* que crece en Argentina. Si se actúa en forma rápida se evita la insuficiencia de los distintos órganos afectados, ya que está comprobado que si el tóxico se elimina del torrente sanguíneo al principio de la intoxicación se previene la aparición del toxindrome. En base a estas premisas se diseñó el método **de electroforesis capilar de zona (CZE)** automatizada **de alta resolución** que fue validado para la determinación de  $\alpha$ - y  $\beta$ -amanitinas, de acuerdo con los criterios internacionales establecidos principalmente por ICH (*International Council for Harmonization*) y Farmacopea Norteamericana. Los logros de las condiciones experimentales de las corridas electroforéticas descriptas consisten en: a) muy cortos tiempos de migración electroforética: la corrida total se realiza en unos 4 minutos (los tiempos de migración de  $\alpha$ - y  $\beta$ -amanitinas son menores a 3 minutos en estas condiciones de corrida electroforética); b) mínima preparación de la muestra: filtrado por membrana y dilución en el buffer de corrida; c) picos agudos que permiten una buena cuantificación; d) linealidad en el rango de concentración de 5 a 100 ng/ml; y d) límite de detección (LOD) (señal/ruido: 3:1) de 1,5 ng/ml y límite de cuantificación (LOQ) (señal/ruido: 10:1) de 5 ng/ml (la más baja concentración utilizada para la curva de calibración); aptos para muestras clínicas. De esta manera se puede realizar la detección temprana de este micetismo para proceder a un tratamiento eficaz. Resultó ser un procedimiento rápido, sencillo, eficiente e inocuo, de aplicación universal.

**Palabras clave:** *Amanita phalloides*; micetismo; electroforesis capilar de zona automatizada de alta resolución; diseño; validación; tiempos de migración muy cortos; mínima preparación de la muestra; límites de detección y de cuantificación muy bajos, aptos para muestras clínicas; diagnóstico precoz.

## **Simple and rapid method for detection and quantification of amanitins, by automated high-resolution capillary electrophoresis in urine**

### **Abstract**

The present work was developed in view of the diagnostic urgency due to the mycetism caused by *Amanita phalloides* that grows in Argentina. If action is taken quickly, the failure of the different affected organs is avoided, since it has been proven that if the poison is removed from the bloodstream at the beginning of the intoxication, the appearance of toxindrome is prevented. Based on these premises, the high-resolution automated capillary zone electrophoresis (CZE) method was designed and validated for the determination of  $\alpha$ - and  $\beta$ -amanitins, in accordance with the international criteria established mainly by ICH (*International Council for Harmonization*) and North American Pharmacopeia. The achievements of the described experimental conditions of the electrophoretic runs consist of: a) very short electrophoretic migration times: the total run is carried out in about 4 minutes (the migration times of  $\alpha$ - and  $\beta$ -amanitins are less than 3 minutes under these electrophoretic run conditions); b) minimal sample preparation: membrane filtration and dilution in running buffer; c) sharp peaks that allow good quantification; d) linearity in the concentration range from 5 to 100 ng/ml; and d) limit of detection (LOD) (signal/noise: 3:1) of 1.5 ng/ml and limit of quantification (LOQ) (signal/noise: 10:1) of 5 ng/ml (lowest concentration used for the calibration curve); suitable for clinical samples. Therefore, early detection of this mycetism can be carried out to proceed with effective treatment. It turned out to be a quick, simple, efficient, and innocuous procedure, with universal application.

**Keywords:** *Amanita phalloides*; mycetism; high resolution automated zone capillary electrophoresis; design; validation; very short migration times; minimal sample preparation; very low detection and quantification limits, suitable for clinical samples; early diagnostic.

### **1. Introducción**

En trabajos previos hemos informado la toxicidad del carpóforo de *Amanita phalloides* que crece en Argentina, siendo fatal con una estimación del 20% de los casos, indicando las fases clínicas del micetismo, su diagnóstico y tratamiento [1-3]. Dado que la intoxicación presenta un tiempo de latencia de aproximadamente 6 horas (síndrome de latencia tardía [1]) se cuenta con 48 horas para la distribución de los compuestos tóxicos desde la sangre a los órganos blanco, principalmente hígado y riñón. La máxima excreción de los tóxicos ocurre por orina dentro de las 72 horas post-ingestión de los carpóforos, siendo éstas las concentraciones más altas halladas en fluidos biológicos por procedimientos no invasivos.

Dada la complejidad de este micetismo, y el riesgo de trasplante hepático, o bien, de resultado fatal, es necesaria la rápida confirmación de la presencia de amanitinas en los fluidos del paciente para su tratamiento precoz.

Por ello, se han usado varios métodos analíticos para evaluar a las amanitinas [4]. Desde la cromatografía en capa delgada (TLC: *thin-layer chromatography*) [5, 6] en fluidos corporales hasta la detección de  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -amanitinas en fluidos biológicos en humanos por radioinmunoensayos (RIA: *radioimmunoassays*) [7-16] que requiere la producción y purificación de anticuerpos, con marcación con  $^{125}\text{I}$ ; tiene una vida corta y no está disponible en todos los hospitales. La técnica ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) también se utilizó, como un método de reemplazo de RIA, para determinar amatoxinas en suero y orina de humanos [14-17], si bien es más selectivo para  $\alpha$ -amanitina y  $\gamma$ -amanitina (pero no para  $\beta$ -amanitina) [17]. ELISA es un método simple y muy sensible, pero aún involucra reactivos especializados y múltiples rondas de incubación y lavado, por lo que es un procedimiento que requiere mucho tiempo. El kit ELISA (kit Bühlmann ELISA) [18] está disponible durante todo el año, es comparable a RIA en cuanto a tiempo y manipulación, y no se requiere un procedimiento complejo de extracción como sucede con la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC: *high-performance liquid chromatography*), ni precauciones de seguridad con respecto a la radiactividad como con RIA. Se informó otra prueba ELISA para  $\beta$ -amanitina en orina [14] aunque no está disponible comercialmente. Recientemente, se realizó la producción de un anticuerpo monoclonal (mAb) que se une específicamente a las amatoxinas y establece un método para detectar  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -amanitinas en hongos mediante un inmunoensayo competitivo indirecto (ic-ELISA: *indirect competitive immunoassay*) [19]. Se ha descrito una nueva generación de anticuerpos monoclonales (mAbs) de alta afinidad para la detección de amatoxinas, con un formato de ensayo de inhibición competitiva (c-ELISA: *competitive inhibition assay format*) [20]. El concepto de unión específica de anticuerpo-antígeno se aplicó aún más en la tecnología de inmunoensayo de flujo lateral (LFIA: *Lateral-Flow Immunoassay*), en ensayos de rápida lectura de resultados [21-23]. Se aplicaron mAbs preparados a tiras de inmunoensayo (LFIA) para detectar amatoxinas, como  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -amanitinas, y todo el procedimiento, incluida la extracción de la muestra, puede completarse en 10 minutos [22]. Dado que los mAbs tienen un ciclo de preparación largo, los aptámeros se han convertido en la mejor opción para la detección de  $\alpha$ -amanitina. Los aptámeros son oligonucleótidos de ADN o ARN monocatenarios que permiten interacciones específicas con moléculas diana y tienen muchas ventajas sobre los anticuerpos, como bajo peso molecular,

alta estabilidad, fáciles de modificar y un amplio rango de reconocimiento de diana, y carecen de inmunogenicidad [24]. Recientemente, se utilizó un aptámero de ADN para determinar la  $\alpha$ -amanitina letal en muestras de hongos y orina mediante ELISA de perlas magnéticas (MELISA: *magnetic bead-ELISA*) [24]. Se desarrolló también un inmunoensayo de quimioluminiscencia (CLIA: *chemiluminescence immunoassay*), que combina un sistema de quimioluminiscencia con una reacción inmune [25].

Debe tenerse en cuenta que RIA, ELISA con sus variantes metodológicas, MELISA y CLIA son ensayos caros para desarrollar en hospitales de nuestro medio, por lo cual se busca utilizar técnicas que permitan el uso de equipos disponibles en hospitales y centros de atención. Por tal razón, en un principio se eligió la técnica cromatográfica de HPLC y HPLC-EM (HPLC combinada con espectrometría de masa), debido a la disponibilidad de equipamiento. Además, el procedimiento en fase reversa ha sido el más utilizado en la literatura [26-33], lo cual permite realizar comparaciones. En nuestros laboratorios se analizaron muestras de carpóforos de *A. phalloides* provenientes de la Provincia de Buenos Aires (Parque Pereyra Iraola, Pilar y Luján), para determinar el contenido total de amatoxinas y de falotoxinas [2].

Esta técnica también se usó para analizar las toxinas (amanitinas) en fluidos biológicos, como por ejemplo en plasma, orina, fluido gastroduodenal, heces y tejidos [34] y en orina después de la extracción por inmunoafinidad [35] y para determinar  $\alpha$ -amanitina y faloidina en plasma humano [36] utilizando varias técnicas de detección, como detectores ultravioleta, electroquímicos y de matriz de diodos [37, 38]. La cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masa (CL-EM) [35, 39, 40] el método más utilizado en la última década [4]. Este enfoque ofrece alta selectividad y eficiencia de separación, además que la espectrometría de masa proporciona información estructural, masa molar y mayor selectividad y detectabilidad. Quizás la metodología más sensible es la cromatografía líquida de ultra alta resolución en fase reversa acoplada a espectrometría de masa Orbitrap (RP-UHPLC-OrbitrapMS: *Reversed Phase Ultra-High Performance Liquid Chromatography Coupled to Orbitrap Mass Spectrometry*) para analizar  $\alpha$ - y  $\beta$ -amanitina en plasma humano a niveles de subnanogramos por mililitro [41]. Las distintas técnicas se han detallado recientemente [2, 4].

La instrumentación HPLC -EM no está disponible en todos los laboratorios y no todos los métodos cumplen con los requisitos de sensibilidad, precisión, especificidad, simplicidad y rapidez de ejecución.

Hasta el momento de nuestra preocupación en el tema, no se realizaban diagnósticos de este micetismo en Argentina por detección de amanitinas en fluidos corporales de pacientes. Por lo

tanto, en nuestros laboratorios se desarrolló y validó un método basado en electroforesis capilar con el menor tiempo de migración y el menor límite de detección de valor para muestras clínicas, pudiendo detectar y cuantificar  $\alpha$ - y  $\beta$ -amanitinas en muestras de orina de pacientes con sospecha de este micetismo. Se trabajó con muestras de orina de pacientes intoxicados obtenidas del Centro de Asesoramiento y Asistencia Toxicológica, Hospital Interzonal de Agudos Especializado en Pediatría "Sor María Ludovica", con tres días post-ingesta.

La electroforesis capilar, principalmente, la electroforesis de zona capilar (CZE: *capillary zone electrophoresis*), es un método de separación altamente eficiente, muy utilizado por su versatilidad y por aplicarse en la separación de péptidos, proteínas y ácidos nucleicos. Sin embargo, la primera determinación de  $\alpha$ - y  $\beta$ -amanitina en extractos de carpóforos y en muestras de orina sembrada (o enriquecida) mediante CZE con un detector de matriz de diodos [13] presentó un alto tiempo de migración (20 minutos) y un límite de detección alto (1  $\mu\text{g/ml}$ ), fuera del rango clínico que, es de diez a cien veces menor, mostrando falta de sensibilidad o baja sensibilidad. Además, debido a su falta de sensibilidad, las amanitinas no pudieron ser cuantificadas. Las condiciones fueron mejoradas posteriormente en muestras de orina [42]. También se desarrolló un procedimiento de electroforesis capilar combinada con ionización por electrospray y espectrometría de masa (CE-ESI-MS: *capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry*) para separar amatoxinas y falotoxinas, en extractos metanólicos de muestras de hongos frescos y secos [43]. La electroforesis capilar se suele combinar con algunos detectores de alta sensibilidad, incluidos los detectores de UV, fluorescencia inducida por láser, electroquimioluminiscencia, arreglo de diodos, espectrometría de masa y quimioluminiscencia [44].

En la presente investigación se buscó desarrollar y validar un método de electroforesis capilar con el menor tiempo de migración y el menor límite de detección de valor para muestras clínicas. Por lo tanto, el objetivo general consistió en lograr desarrollar un método rápido de detección y cuantificación de los ciclopéptidos tóxicos por electroforesis capilar de zona automatizada, de alta resolución (ECAR) para un diagnóstico precoz. Los analitos se separan en un capilar que sólo contiene una solución de buffer. La separación ocurre debido a que los distintos componentes de la muestra migran como bandas discretas con velocidades diferentes [45]. El diseño se basó en lograr el mínimo tiempo de migración con los menores límites de detección. Se evidenció que el pH básico de 8,6 (buffer fosfato) permitía lograr esos objetivos.



Las amatoxinas se consideran los ciclopéptidos más potentes de *A. phalloides*, por lo que los principales estudios toxicológicos se centraron en estos tóxicos [2], entre las amatoxinas neutras  **$\alpha$ -amanitina** y de las ácidas  **$\beta$ -amanitina** fueron motivo de nuestro estudio.

En este trabajo, se desarrolló un método CZE para medir  $\alpha$ - y  $\beta$ -amanitinas en muestras de orina de casos sospechosos de intoxicación por amanitina.

Al aplicar CZE, **no fue necesario un paso de extracción** ya que las amanitinas se pueden detectar sin la interferencia de los compuestos de la orina; sólo requiere la dilución de la muestra en el electrolito de fondo. El método fue validado conforme a los criterios internacionales establecidos establecidos por ICH (*International Council for Harmonization*) [45] y Farmacopea Norteamericana [46] y [40]. Se pudo determinar, además, que la orina de los pacientes se conservó por más de 2 años a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , según la detección de amanitinas.

## **2. Materiales y métodos:**

### **2.1. Productos químicos y reactivos**

Todos los productos químicos utilizados en la preparación de buffers y soluciones fueron de grado analítico. Se usaron: fosfato de potasio monobásico, tetraborato de sodio, ácido fosfórico (85%), ácido clorhídrico (37%) e hidróxido de sodio. Los estándares de  $\alpha$ - y  $\beta$ -amanitinas fueron Sigma.

### **2.2. Soluciones de buffers y de amanitinas estándar para análisis por electroforesis capilar**

Se prepararon soluciones de buffer borato cubriendo el rango de pH 8-10 a las siguientes concentraciones: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 y 60 mM. Se ajustó el pH mediante la adición de NaOH 1N o HCl 1N. También se prepararon soluciones de buffer fosfato a pH 2,4 (100 mM) y a pH 7 (5, 30, 50 mM). Se prepararon soluciones stock de cada amanitina en metanol a 500  $\mu\text{g/ml}$ .

### **2.3. Muestras de orina**

Las muestras blanco de orina fueron de voluntarios sanos.

Las muestras clínicas de orina resultaron de casos sospechosos de intoxicación provistas por el Centro de Asesoramiento y Asistencia Toxicológica, Hospital Interzonal de Agudos Especializado en Pediatría "Sor María Ludovica", Calle 14, Nro. 1631, B 1900 La Plata, Provincia de Buenos Aires, dada la cercanía con el Parque Pereyra Iraola, donde se registraron las principales intoxicaciones por ingestión de carpóforos del hongo superior *Amanita*

*phalloides*. Todas las muestras de orina fueron filtradas por una membrana de 0,22  $\mu\text{m}$ , antes de la dilución en el buffer, y una alícuota de 10  $\mu\text{l}$  se diluyó en 200  $\mu\text{l}$  de buffer.

#### **2.4. Equipo de electroforesis capilar de alta resolución (ECAR):**

Se utilizó un equipo ECAR: BioFocus Capillary Electrophoresis 3000 (Bio-Rad) con colector de fracciones automatizado; las muestras se disolvieron en buffer borato a pH 8,6. Se realizó un barrido con el detector de arreglo de fotodiodos (PDA: *photodiode array*) programable de procesamiento rápido UV/visible (190-500 nm) y se seleccionó  $\lambda_{\text{máx}}$ : 210 nm; inyección hidrodinámica: 20 psi\*seg (20 psi = 1379 mbar (o hPA) = 1,34 atm), polaridad normal, voltaje de 20kV, temperatura de corrida: 20°C, duración de la corrida 10 min, capilar: 70 cm x 50  $\mu\text{m}$  DI (diámetro interno) de sílica fundida (recubierta con polidiimida), termostático a 20°C ( $\pm 0,1^\circ\text{C}$ ).

Los experimentos se llevaron a cabo en polaridad normal, aplicando un voltaje de 20 kV. Todos los datos fueron registrados y analizados mediante el software de BioRad.

Los capilares nuevos fueron acondicionados previamente mediante lavados consecutivos con agua desionizada durante 5 min, HCl 1 M durante 5 min, agua desionizada durante 2 min, NaOH 1% durante 10 min, agua desionizada durante 2 min y buffer fosfato pH 8,6 durante 5 min, todo a 1400 mbar (20,3 psi). Después de cada corrida el capilar fue lavado con NaOH 1% durante 3 min, agua desionizada durante 2 min y buffer fosfato durante 5 min. Se hizo un pasaje de 5 segundos de buffer fosfato después de la inyección de cada muestra. Los viales de buffer fueron cambiados después de cada corrida para evitar modificaciones en la composición del buffer y en el comportamiento electroforético.

#### **2.5. Etapas de validación del método desarrollado por electroforesis capilar de alta resolución**

**2.5.1. Preparación de los estándares analíticos, estándares de calibración y muestras control:** Porciones de las soluciones stock se diluyeron con el buffer fosfato para preparar las soluciones de estándares analíticos que fueron utilizadas para sembrar las preparaciones de orinas para los estándares de calibración y controles de calidad (QC).

Se prepararon los estándares de calibración (10-100 ng/ml) y las muestras de control de calidad (10 a 100 ng/ml) de  $\alpha$ - y  $\beta$ -amanitinas y los pools de blanco de orina a partir de soluciones de estándares analíticos preparadas en forma independiente. Todas las soluciones fueron almacenadas a 4°C.

**2.5.2. Pureza de pico y selectividad:** En 10 muestras de orina blanco (libre de tóxico) de voluntarios se analizó la presencia de posibles picos interferentes con los picos de los analitos.

**2.5.3. Linealidad de la calibración:** Se utilizaron estándares de calibración con concentraciones de 5, 10, 25, 50, 75 y 100 ng/ml de  $\alpha$ -amanitina y  $\beta$ -amanitina filtrados por membrana de 0,22  $\mu$ m (n =5).

**2.5.4. Repetibilidad:** Se prepararon independientemente muestras control de  $\alpha$ -amanitina y de  $\beta$ -amanitina, 5 a concentraciones bajas (10 ng/ml) y 5 a concentraciones altas (75 ng/ml), que se analizaron por separado y mezcladas siendo inyectadas aleatoriamente 10 veces.

**2.5.5. Exactitud y precisión:** Se analizaron muestras control intradía e interdía por análisis de regresión lineal para determinar la concentración del analito contra curva de calibración. Se realizaron 5 siembras de alfa-amanitina de 10, 50 y 75 ng/ml y 5 siembras de beta-amanitina de 10, 50 y 75 ng/ml. Para estimar la exactitud se promediaron los valores determinados para cada concentración y se calculó el porcentaje de sesgo. Para la precisión se calculó la desviación estándar relativa (RSD: *relative standard deviation*).

La exactitud y la precisión inter-días (entre días; inyectando distintos días) del método se evaluó mediante la comparación del análisis de las muestras control durante más de 5 días consecutivos con el método ya mencionado.

**2.5.6. Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ):** Se analizaron las muestras de control de calidad de  $\alpha$ -amanitina y  $\beta$ -amanitina (n=5), a concentraciones de 2,5 y 5 ng/ml, para la determinación del límite de detección (LOD) (señal/ruido: 3:1) y del límite de cuantificación (LOQ) (señal/ruido: 10:1).

**2.5.7. Prueba de aplicabilidad:** Se analizaron amanitinas en 8 muestras de orina de pacientes sospechosos de intoxicación utilizando el método aquí descrito.

## **2.6. Análisis estadístico en general**

Los resultados se expresaron como valor medio  $\pm$  desviación estándar. Se usó el ensayo *t* de Student para determinar la significancia estadística de las diferencias entre grupos.

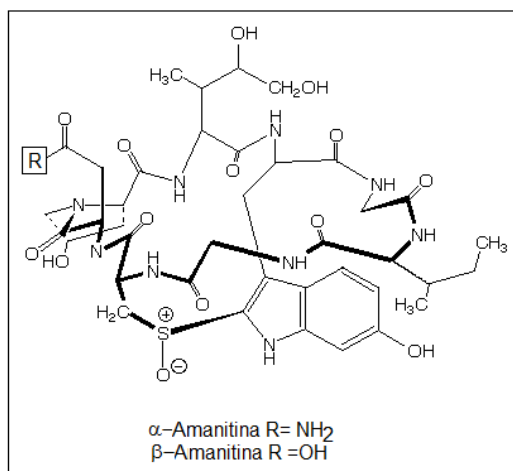
## **3. Discusión y Resultados:**

### **3.1. Selección de las condiciones operativas de corrida electroforética**

Se hicieron corridas electroforéticas en buffer fosfato y buffer borato. Si bien, como es sabido, la utilización de buffer fosfato produce mayor calentamiento del capilar si los tiempos de migración son largos, se seleccionó el buffer fosfato debido a una mejor resolución (picos más agudos; después de variar la concentración del buffer de 5 a 60 mM y el pH de 8 a 10), que permitió una buena cuantificación, con tiempos de migración muy cortos.

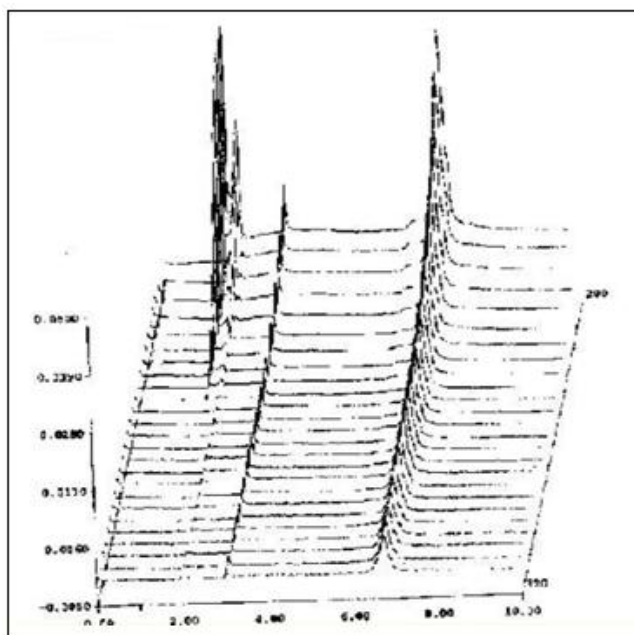
El pH de corrida seleccionado fue 8,6 debido a que la  $\alpha$ -amanitina a ese pH permanece neutra, mientras que la  $\beta$ -amanitina tiene carga negativa (**Figura 1**) por ser ácida. En

consecuencia, la  $\beta$ -amanitina migra más lentamente que la  $\alpha$ -amanitina, presentando mayor tiempo de migración en el electroferograma.



**Figura 1:** Estructuras primarias de  $\alpha$ - y  $\beta$ -amanitinas.

Se seleccionó la longitud de onda de 210 nm para la detección por brindar mejor resolución (**Figura 2**).



**Figura 2:** Electroferogramas tridimensional (3D) en el rango de 200 a 320 nm de longitud de onda ( $\lambda$ ), en buffer fosfato, pH 8,6.

Se analizaron soluciones estándares de  $\alpha$ - y  $\beta$ -amanitina que fueron sembradas en orinas para hacer la curva de calibración correspondiente a cada amanitina. También se prepararon los estándares blanco de orina, estándares control de calidad y estándares de calibración (10 a 100 ng/ml del analito). Todas las soluciones se almacenaron a 4°C.

En los electroferogramas los picos se obtuvieron en el rango de tiempo de migración de 2 a 4 minutos, es decir que unos 5 minutos es el tiempo suficiente para observar a ambas amanitinas. No se detectaron interferencias en la región de interés.

Se utilizaron capilares nuevos previamente lavados con agua desionizada durante 5 min, se colocaron en HCL 1M durante 5 min, luego enjuagar con agua desionizada durante 2 min, se colocan luego en NaOH 1% por 3 min enjuagar con agua desionizada 2 min y colocar por 5 min en buffer fosfato. Después de la inyección de cada muestra se pasa por 5 segundos buffer.

Luego de cada corrida se cambiaron los viales de buffer para mantener la concentración inicial, para no haber interferencia en el comportamiento electroforético.

En cuanto a las muestras de orina se filtraron por membrana de 0,22  $\mu\text{m}$ .

Se realizó la dilución de 10  $\mu\text{l}$  en 200  $\mu\text{l}$  de buffer fosfato; se protegen de degradación fotoquímica.

### **3.2. Validación del método de electroforesis capilar de zona (CZE) de alta resolución:**

El método desarrollado basado en electroforesis capilar de alta resolución fue validado para la determinación de  $\alpha$ - y  $\beta$ -amanitinas, de acuerdo con los criterios establecidos por ICH (*International Council for Harmonization*) [45] y Farmacopea Norteamericana [46] y [40]. Se determinaron: Pureza del pico y selectividad; linealidad; repetibilidad; exactitud y precisión; límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) y prueba de aplicabilidad.

### **3.3. Resultados de la validación**

Los resultados de la validación mostraron que las curvas de calibración para  $\alpha$ - y  $\beta$ -amanitinas fueron lineales en el rango de concentración de 5 a 100 ng/ml con una media de los valores de  $r^2$  de 0,998 y 0,997 respectivamente. El límite de detección (LOD) (señal/ruido: 3:1) fue de 1,5 ng/ml y el límite de cuantificación (LOQ) (señal/ruido: 10:1) fue de 5 ng/ml. Esta última es la más baja concentración utilizada para la curva de calibración.

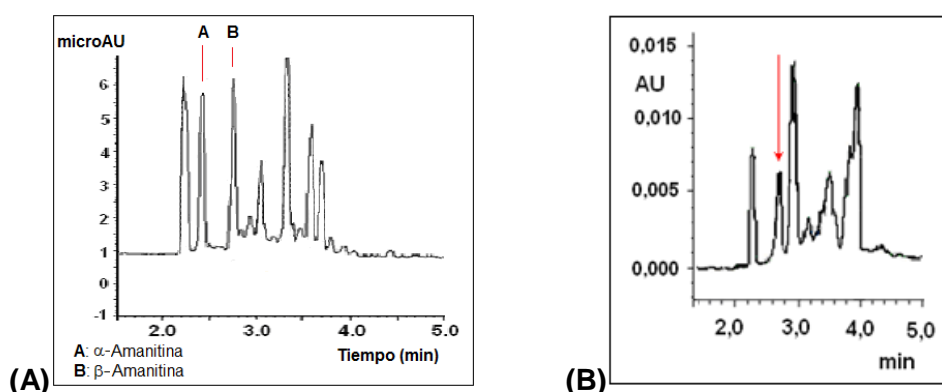
La repetibilidad ( $n = 10$ ) se analizó con 5 determinaciones a la concentración de 10 ng/ml y 5 a la concentración de 75 ng/ml; los valores de desviación estándar relativa (RSD) de  $\alpha$ -amanitina fueron 6,2% para 10 ng/ml y 7,2% para 75 ng/ml, mientras que para  $\beta$ -amanitina resultaron ser: 7,1% para 10 ng/ml y 5,0% para 75 ng/ml.

Precisión y exactitud intra-día del método CZE desarrollado en orinas: Para 10 ng/ml de  $\alpha$ -amanitina: precisión 2,5% y exactitud 3,5%; para  $\beta$ -amanitina: Precisión: 3,1% y exactitud: 5,0%. Precisión y exactitud inter-días del método CZE desarrollado en orinas: Para 10 ng/ml

de  $\alpha$ -amanitina: Precisión 14,4% y exactitud 13,5%; para  $\beta$ -amanitina: Precisión 6,5% y exactitud 11,5%.

### 3.4. Análisis de orinas sembradas con amanitinas y de orinas de pacientes intoxicados:

Al sembrar las orinas con las amanitinas se demostró que no es necesario procesar previamente las orinas ya que no hay picos que interfieran en las zonas de migración de las mismas. Sólo se requiere diluir la muestra con el buffer de corrida (buffer fosfato) y filtrarla para la eliminación de bacterias (membrana de 0,22  $\mu$ m) (**Figuras 3 A y B**).



**Figura 3:** Electroferogramas. (A) Representativo de muestra clínica de orina con  $\alpha$ - y  $\beta$ -amanitinas. Electrolito de corrida: buffer fosfato, pH 8,6. (B) Muestra de orina enriquecida con 45 ng/ml de  $\beta$ -amanitina.

Se trabajó con muestras de orina de pacientes intoxicados con 3 días post-ingesta. Es interesante acortar que las muestras de orina almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  mostraron igual comportamiento que las recién recolectadas, lo que pone de manifiesto la estabilidad de las amanitinas en tales condiciones, en concordancia con estudios previos en carpóforos almacenados en freezer durante 7-8 meses [47] y en muestras congeladas de orina por hasta 6 meses [35].

Los logros de las condiciones experimentales de las corridas electroforéticas presentadas consisten en: a) muy cortos tiempos de migración electroforética: la corrida total se realiza en unos 4 minutos (los tiempos de migración de  $\alpha$ - y  $\beta$ -amanitinas son menores a 3 minutos en estas condiciones de corrida electroforética); b) mínima preparación de la muestra: filtrado por membrana y dilución en el buffer de corrida; c) picos agudos que permiten una buena cuantificación; d) linealidad en el rango de concentración de 5 a 100 ng/ml; y d) límite de detección (LOD) (señal/ruido: 3:1) de 1,5 ng/ml y límite de cuantificación (LOQ)

(señal/ruido: 10:1) de 5 ng/ml (la más baja concentración utilizada para la curva de calibración).

De esta manera se puede realizar la detección temprana de este micetismo para proceder a un tratamiento eficaz. Los resultados de la validación mostraron que las curvas de calibración para  $\alpha$ - y  $\beta$ -amanitinas fueron lineales en el rango de concentración de 5 a 100 ng/ml con una media de los valores de  $r^2$  de 0,998 y 0,997 respectivamente. El límite de detección (LOD) (señal/ruido: 3:1) fue de 1,5 ng/ml y el límite de cuantificación (LOQ) (señal/ruido: 10:1) fue de 5 ng/ml; aptos para muestras clínicas. Esta última es la más baja concentración utilizada para la curva de calibración.

Es una herramienta útil para la investigación toxicológica y el análisis forense de casos de intoxicación.

#### **4. Conclusiones:**

Dado que se han registrado varias intoxicaciones en diferentes áreas de nuestro país y que hasta el momento no se disponía de trabajos científicos sobre determinación de los ciclopéptidos tóxicos de *A. phalloides* que crece en Argentina, en fluidos biológicos de pacientes afectados, se encaró el tema en este trabajo. Por lo tanto, se desarrolló y validó un método basado en la técnica de electroforesis capilar de zona (CZE) de alta resolución, automatizada, que es simple y aplicable al análisis de  $\alpha$ - y  $\beta$ -amanitina en orina, en menos de 4 minutos con buffer fosfato, pH 8,6, como electrolito de corrida, logrando condiciones ventajosas con respecto a procedimientos previamente publicados.

El método fue validado, resultando ser selectivo, reproducible, exacto, preciso y adecuado para la determinación cuantitativa de ciclopéptidos, como  $\alpha$ - y  $\beta$ -amanitinas, en carpóforos de hongos tóxicos y en orina de pacientes intoxicados.

El tratamiento de la muestra para el análisis sólo requirió filtración y dilución de la orina en el buffer de corrida. Los reactivos y las condiciones utilizadas no son agresivas para el capilar o el sistema y se utilizan solventes no contaminantes. El método cumple con todos los criterios de validación establecidos. Los límites de detección aquí están por debajo de los establecidos en otros métodos de cromatografía líquida o incluso de electroforesis capilar. **Se utilizaron muestras reales clínicas para probar la aplicabilidad del método** para el diagnóstico de la intoxicación por amanitinas en unos pocos minutos, ya que no requiere extracción ni preparación previa de la muestra. Este método permite una detección temprana

de la intoxicación. Es de valor para la investigación toxicológica y el análisis forense de casos de intoxicación.

### Agradecimientos

Los autores agradecen a la Universidad de Buenos Aires y al Hospital de Clínicas por la infraestructura y facilidades concedidas. ABP es Investigadora Superior del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de Argentina (CONICET).

### Referencias

1. Pomilio A.B., Battista S.M., Alonso A. Micetismos. Parte 1: Síndromes con período de latencia tardía. *Acta Bioquím. Clín. Latinoamer.* 2018; 52 (4): 459-487.
2. Battista S.M., Vitale A.A., Alonso A., Pomilio A.B. Ciclopéptidos tóxicos de *Amanita phalloides* que crece en Argentina: Extracción, identificación y cuantificación de amatoxinas y falotoxinas. Presencia de otros compuestos tóxicos. *An. Asoc. Quím. Argent.* 2023; 110 (1): 73-100.
3. Pomilio A.B., Battista S.M., Vitale A.A., Alonso A. Intoxicaciones por ingestión del hongo superior *Amanita phalloides* que crece en argentina. Fases clínicas, diagnóstico y tratamiento. *An. Asoc. Quím. Argent.* 2023; 110 (2): 60-81.
4. Barbosa I., Domingues C., Ramos F., et al. Analytical methods for amatoxins: a comprehensive review. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2023; 232: 115421.
5. Haines J.H., Lichstein E., Glickerman D. A fatal poisoning from an amatoxin containing *Lepiota*. *Mycopathologia* 1986; 93 (1): 15-17.
6. Wieland T. *Peptides of poisonous Amanita mushrooms*. Springer, New York, 1986.
7. Faulstich H., Trischmann H., Zobeley S. A radioimmunoassay for amanitin. *FEBS Lett.* 1975; 56 (2): 312-315.
8. Fiume L., Busi C., Campadelli-Fiume G., et al. Production of antibodies to amanitins as the basis for their radioimmunoassay. *Experientia* 1975; 31: 1233-1234.
9. Faulstich H., Zobeley S., Trischmann H. A rapid radioimmunoassay, using a nylon support, for amatoxins from *Amanita* mushrooms. *Toxicon* 1982; 20 (5): 913-924.
10. Andres R.Y., Frei W., Gautschi K., et al. Radioimmunoassay for amatoxins by use of a rapid, 125I-tracer-based system. *Clin Chem* 1986; 32 (9):1751-1755.
11. Homann J., Rawer P., Bleyl H., et al. Early detection of amatoxins in human mushroom poisoning. *Arch. Toxicol.* 1986; 59 (3): 190-191.
12. Andres Y.R., Frei W.K. Amatoxin and anti-amatoxin for radioimmunoassay prepared by a novel approach: Chemical and structural considerations. *Toxicon* 1987; 25 (9): 915-922.
13. Brüggemann O., Meder M., Freitag R. Analysis of amatoxins  $\alpha$ -amanitin and  $\beta$ -amanitin in toadstool extracts and body fluids by capillary zone electrophoresis with photodiode array detection. *J. Chromatogr. A* 1996; 744 (1-2): 167-176.
14. Abuknesha R.A., Maragkou A. A highly sensitive and specific enzyme immunoassay for detection of  $\beta$ -amanitin in biological fluids. *Anal Bioanal Chem* 1993; 379: 853-860.
15. Butera R., Locatelli C., Coccini T., et al. Diagnostic accuracy of urinary amanitin in suspected mushroom poisoning: a pilot study. *J. Toxicol.-Clin. Toxicol.* 2004; 42 (6): 901-912.
16. Parant F., Peltier L., Lardet G., et al. Syndrome phalloïdien: Quelle est la place du dosage des alpha- et gamma-amanitines par ELISA (Bühlmann)? Resultats preliminaires. *Acta Clin. Belg.* 2006; Suppl, 1: 11-17.
17. Staack R., Maurer H. New Bühlmann ELISA for determination of amanitins in urine - Are there false positive results due to interferences with urine matrix, drugs or their metabolites? *Toxichem Krimtech* 2000; 68 (2): 68-71.
18. Bühlmann Laboratories. *Management of suspected mushroom poisoning*. Bühlmann Laboratories, Allschwil, Suiza, 2022.
19. He K., Mao Q., Zang X., et al. Production of a broad-specificity monoclonal antibody and application as a receptor to detection amatoxins in mushroom. *Biologicals* 2017; 49: 57-61.



20. Bever C.S., Hnasko R.M., Cheng L.W., *et al.* A rapid extraction method combined with a monoclonal antibody-based immunoassay for the detection of amatoxinas. *Toxins (Basel)* 2019; 11 (12): 724.
21. He K., Zhang X.Y., Zhao R.P., *et al.* An enzyme-linked immunosorbent assay and a gold-nanoparticle based immune-chromatographic test for amatoxins using recombinant antibody. *Microchim. Acta* 2016; 183 (7): 2211-2219.
22. Bever C.S., Adams C.A., Hnasko R.M., *et al.* Lateral flow immunoassay (LFIA) for the detection of lethal amatoxins from mushrooms. *PLoS One* 2020; 15 (4): e0231781.
23. Di Nardo F., Chiarello M., Cavalera S., *et al.* Ten years of lateral flow immunoassay technique applications: trends, challenges and future perspectives. *Sensors* 2021; 21 (15): 5185.
24. Gao J., Liu N., Zhang X., *et al.* Utilizing the DNA aptamer to determine lethal  $\alpha$ -amanitin in mushroom samples and urine by magnetic bead-ELISA (MELISA). *Molecules* 2022; 27 (2): 538.
25. Zhu J., Dou L., Shao S., *et al.* An automated and highly sensitive chemiluminescence immunoassay for diagnosing mushroom poisoning. *Front. Chem.* 2021; 9: 813219.
26. Enjalbert F., Rapior S., Nouguier-Soulé J., *et al.* Treatment of amatoxin poisoning: 20-year retrospective analysis. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 2002; 40 (6): 715-757.
27. Garcia J., Oliveira A., de Pinho P.G., *et al.* Determination of amatoxins and phallotoxins in *Amanita phalloides* mushrooms from northeastern Portugal by HPLC-DAD-MS. *Mycologia* 2015; 107 (4): 679-687.
28. Enjalbert F., Gallion C., Jehl F., *et al.* Simultaneous assay for amatoxins and phallotoxins in *Amanita phalloides* Fr. by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 1992; 598 (2): 227-236.
29. Enjalbert F., Gallion C., Jehl F., *et al.* Toxin content, phallotoxin and amatoxin composition of *Amanita phalloides* tissues. *Toxicon* 1993; 31 (6): 803-807.
30. Enjalbert F., Cassanas G., Guinchard C., *et al.* Toxin composition of *Amanita phalloides* tissues in relation to the collection site. *Mycologia* 1996; 88 (6): 909-921.
31. Enjalbert F., Cassanas G., Salhi S.L., *et al.* Distribution of the amatoxinas and phallotoxins in *Amanita phalloides*. Influence of the tissues and the collection site. *C. R. Acad. Sci. – Sér. III* 1999; 322 (10): 855-862.
32. Hu J., Zhang P., Zeng J., *et al.* Determination of amatoxins in different tissues and development stages of *Amanita exitialis*. *J. Sci. Food Agric.* 2012; 92 (13): 2664-2667.
33. Scott Chialvo C.H., Griffin L.H., Reed L.K., *et al.* Exhaustive extraction of cyclopeptides from *Amanita phalloides*: guidelines for working with complex mixtures of secondary metabolites. *Ecol. Evol.* 2020; 10 (10): 4233-4240.
34. Jaeger A., Jehl F., Flesch F., *et al.* Kinetics of amatoxins in human poisoning: therapeutic implications. *J. Toxicol.-Clin. Toxicol.* 1993; 31 (1): 63-80.
35. Maurer H.H., Schmitt C.J., Webber A.A., *et al.* Validated electrospray LC-MS assay for determination of the mushroom toxins alpha- and beta-amanitin in urine after immunoaffinity extraction. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 2000; 748 (1): 125-135.
36. Rieck W., Platt D. High-performance liquid chromatographic method for the determination of  $\alpha$ -amanitin and phalloidin in human plasma using the column-switching technique and its application in suspected cases of poisoning by the green species of *Amanita* mushroom (*Amanita phalloides*). *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 1988; 425: 121-134.
37. Defendenti C., Bonacina E., Mauroni M., *et al.* Validation of a high performance liquid chromatographic method for alpha amanitin determination in urine. *Forensic Sci. Int.* 1998; 92 (1): 59-68.
38. Barbosa I., Domingues C., Barbosa R.M., *et al.* Amanitins in wild mushrooms: the development of HPLC-UV-EC and HPLC-DAD-MS methods for food safety purposes. *Foods* 2022; 11 (23): 3929.
39. Maurer H.H. Multi-analyte procedures for screening for and quantification of drugs in blood, plasma, or serum by liquid chromatography-single stage or tandem mass spectrometry (LC-MS or LC-MS/MS) relevant to clinical and forensic toxicology. *Clin. Biochem.* 2005; 39 (4): 310-318.
40. Vlaskin D.N., Gainullina E.T., Klyuster O.V., *et al.* Express method for detection of *Amanita phalloides* amanitine toxins. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2006; 141 (1): 110-111.
41. Bambauer T.P., Wagmann L., Weber A.A., *et al.* Analysis of  $\alpha$ - and  $\beta$ -amanitin in human plasma at subnanogram per milliliter levels by Reversed Phase Ultra-High Performance Liquid Chromatography coupled to Orbitrap Mass Spectrometry. *Toxins (Basel)* 2020; 12 (11): 671.

42. Robinson-Fuentes V.A., Jaime-Sánchez J.L., García-Aguilar L., et al. Determination of *alpha*- and *beta*-amanitin in clinical urine samples by Capillary Zone Electrophoresis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2008; 47 (4-5): 913-917.
43. Rittgen J., Pütz M., Pyell U. Identification of toxic oligopeptides in *Amanita* fungi employing Capillary Electrophoresis-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry with positive and negative ion detection. *Electrophoresis* 2008; 29 (10), 2094-2100.
44. Wu H., Tang K. Highly sensitive and robust Capillary Electrophoresis-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry: interfaces, preconcentration techniques and applications. *Rev. Anal. Chem.* 2020; 39 (1): 45-55.
45. ICH. *ICH Harmonized Guideline Validation of Analytical Procedures Q2(R2)*. International Council for Harmonization (ICH) of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. Ginebra, Suiza. 1-34; 2022. Borrador aprobado el 24 de marzo de 2022.
46. USP (United States Pharmacopeia) General Chapter 1225. Validation of compendial methods (30th ed.). National Formulary 25, Rockville, MD, USA: The United States Pharmacopeial Convention Inc., 2007.
47. Himmelmann A., Mang G., Schnorf-Huber S. Lethal ingestion of stored *Amanita phalloides* mushrooms. *Swiss Med. Wkly.* 2001; 131 (41-42): 616-617.

--

## **Diseño y síntesis de nuevos materiales poliméricos con la incorporación de biocompuestos, para su aplicación como recubrimientos**

Mariana Allasia

Tesis de Doctorado para optar al grado académico superior de Doctor en Ingeniería Química – Premio AQA: “Dr. Luis Guglielmelli 2023” (Área: Química Orgánica y Bio-Orgánica).  
Director de Tesis: Prof. Dr. Roque J. Minari. Codirector: Prof. Dr. Luis M. Gugliotta.

Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química (INTEC-UNL); Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral (UNL), Ciudad de Santa Fe, Provincia de Santa Fe.  
e-mail: allasiamariana@gmail.com.ar

*Recibido: 27 de septiembre de 2023*

*Aceptado: 30 de octubre de 2023*

---

La producción de materiales poliméricos híbridos en base acuosa a partir de recursos derivados de fuentes renovables tiene un importante interés en la industria química a nivel mundial, debido a las altas exigencias medioambientales y del mercado para reemplazar los solventes orgánicos y los monómeros derivados del petróleo. La incorporación de biopolímeros o monómeros biobasados, se encuentra entre las principales estrategias empleadas actualmente para la síntesis de materiales poliméricos más amigables con el medioambiente, al reducir la huella de carbono y potenciar la biodegradabilidad.

En esta Tesis de Doctorado se investiga la síntesis de diferentes materiales poliméricos híbridos basados en recursos derivados de fuentes naturales, para diferentes aplicaciones. En este sentido, se plantea la incorporación de una o dos proteínas, caseína (proteína de la leche) y zeína (proteína del maíz), buscando obtener un polímero híbrido nanoestructurado con una alta sinergia entre las fases. Por otro lado, el empleo de monómeros biobasados permite incrementar la sustitución de monómeros derivados del petróleo, minimizando el impacto ambiental de los materiales. En el esquema de la Figura 1 se representa el contenido de esta Tesis, donde se incluye las proteínas utilizadas, el método de síntesis, el material y aplicación perseguida, el grupo de investigación con quien se colaboró y la publicación asociada (cuando corresponde). A continuación, se hace una pequeña reseña de cada capítulo de la Tesis.

En el Capítulo 1, se introducen los principales antecedentes y conceptos relacionados con las técnicas de polimerizaciones empleadas, como la polimerización en emulsión batch y semi-batch y la polimerización en miniemulsión. Además, se incluyen consideraciones generales en cuanto a las proteínas empleadas (caseína y zeína); y sobre los monómeros bioderivados [metacrilato de isobornilo (IBOMA) y acrilato de 2-octilo (OA)] empleados

para la preparación de los materiales. Además, se realizan consideraciones generales sobre las principales aplicaciones de interés en esta Tesis.

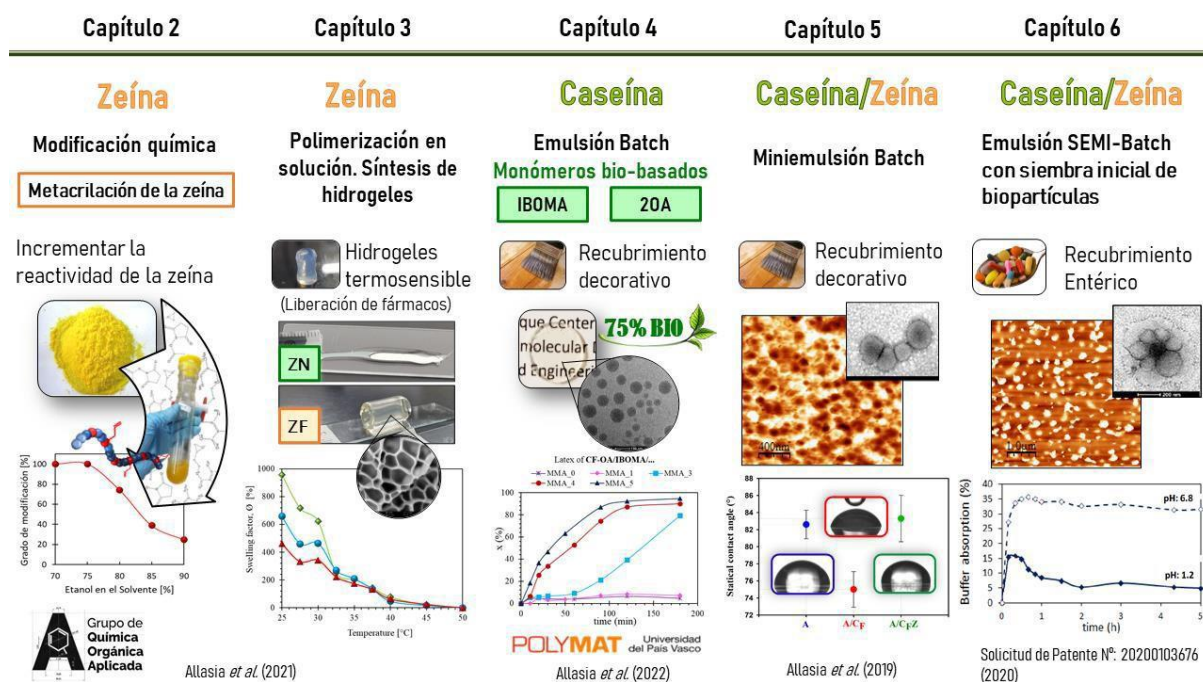


Figura 1. Resumen del contenido de los capítulos 2-6 de la Tesis de Doctorado.

El Capítulo 2 considera la modificación química de la zeína (proteína hidrofóbica), con el objetivo de obtener una proteína capaz de polimerizar radicalmente. Este estudio involucró el uso de variados agentes modificantes que poseen diferentes grupos reactivos, para determinar el sistema más indicado para la funcionalización de la zeína. El grado de modificación de la zeína se evaluó mediante resonancia magnética nuclear (RMN) y análisis elemental.

El Capítulo 3 contiene la investigación de la incorporación de la zeína metacrilada como bio- macroentrecruzante, en la síntesis de hidrogeles termosensibles basados en poli(*N*-vinilcaprolactama). Se analizó el efecto de la incorporación de la zeína modificada químicamente frente a la proteína nativa. Además, se sintetizaron y caracterizaron hidrogeles con diferentes concentraciones de zeína, para su potencial aplicación en la liberación controlada de fármacos. Por último, se comparó el desempeño de la zeína funcionalizada como bio- macroentrecruzante respecto a un entrecruzante convencional de bajo peso molecular (*N,N*-metileno-*bis*-acrilamida).

En el Capítulo 4, se investigó la síntesis de látex híbridos basados en caseína metacrilada por polimerización batch en emulsión, con la incorporación de monómeros biobasados (OA e

IBOMA), para su aplicación como recubrimiento decorativo. Se investigaron diferentes composiciones en la mezcla de monómeros empleando OA e IBOMA como reemplazo de los monómeros derivados del petróleo BA y MMA, para incrementar el contenido biológico final de los materiales. Se analizó el mecanismo de nucleación de las partículas, la cinética de polimerización, la fracción biológica final y las propiedades de aplicación, haciendo hincapié en la resistencia al agua y en la biodegradabilidad de las películas.

En el Capítulo 5, se presenta el estudio de la incorporación de zeína y caseína en la síntesis de látex híbridos acrílico/proteínas, con un contenido de sólidos moderado (35%), para su aplicación como recubrimiento decorativo. Debido a la hidrofobicidad de la zeína, la estrategia de síntesis empleada fue la polimerización en miniemulsión batch. El trabajo involucró la preparación de las miniemulsiones con diferentes combinaciones de las proteínas (manteniendo un contenido total de 25 % de proteína respecto a los monómeros acrílicos), y la polimerización de las mismas. Se evaluó la cinética, el mecanismo de nucleación, la morfología de las nanopartículas obtenidas y las propiedades de aplicación de las películas producidas a partir de los látex. Además, se comparó el desempeño del látex híbrido respecto de la mezcla física de un látex de acrílico puro con las proteínas.

El Capítulo 6 involucra la síntesis de nanopartículas híbridas acrílico/caseína-zeína, mediante la polimerización semi-batch en emulsión, con una siembra inicial de biopartículas, con el objetivo de incrementar el contenido de la proteína hidrofóbica. Por un lado, se investigó la estrategia de obtención de las biopartículas a partir de las proteínas. Luego, estas biopartículas fueron empleadas como siembras en la polimerización semi-batch de BA/MMA dosificados en forma de mezcla a caudal constante. Se evaluó el desempeño de la polimerización semi-batch respecto de la batch, para este sistema. Se estudió la cinética de reacción, el diámetro y la morfología de las nanopartículas sintetizadas y las propiedades de las películas obtenidas, para su posible aplicación como recubrimiento entérico.

Finalmente, en el Capítulo 7 se extrajeron las principales conclusiones del trabajo de investigación y se formularon algunas sugerencias para trabajos futuros.

Además de los resultados incluidos en los capítulos antes mencionados, durante la ejecución de esta Tesis se avanzó también en el estudio de la producción de recubrimientos termocurables basados en aceite epoxidado de soja, entrecruzados con ácidos dicarboxílicos de diferentes pesos moleculares (sin catalizadores). Este trabajo fue publicado en:

Allasia *et al.*, *Polymer* 2021; 232: 124143. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2021.124143>.  
y no forma parte del contenido de esta Tesis de Doctorado.

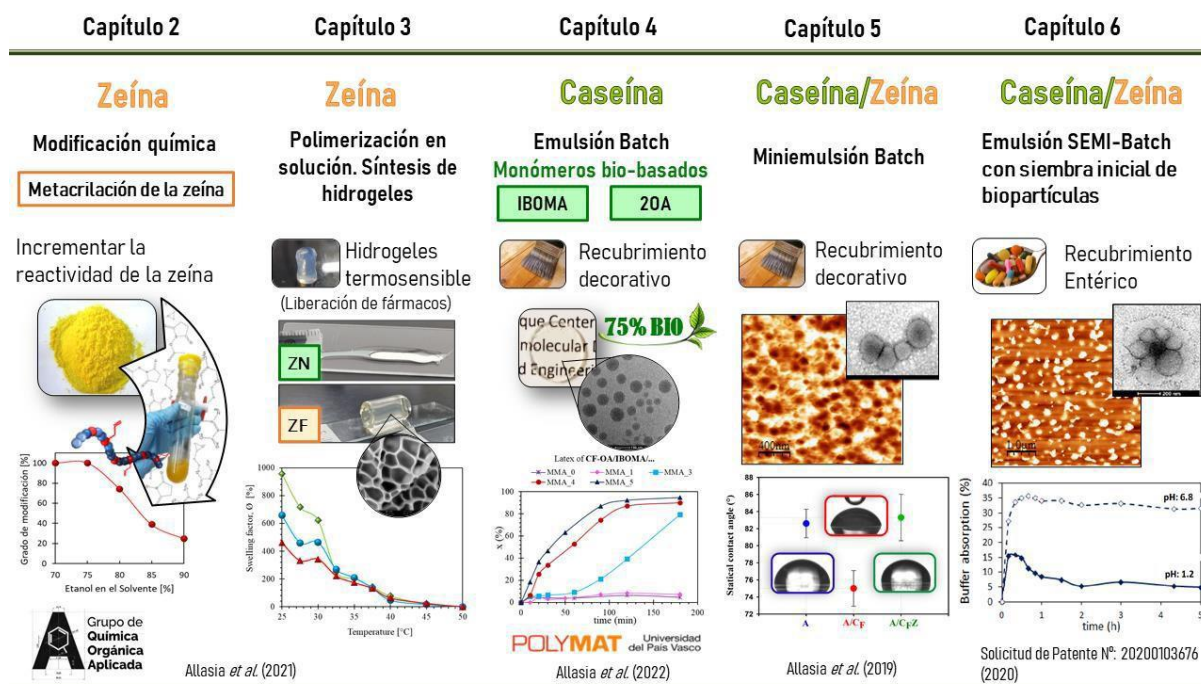
## **Design and synthesis of new polymeric materials with the incorporation of biocomposites, for their application as coatings**

The production of water-based hybrid polymeric materials from resources derived from renewable sources is of significant interest in the chemical industry worldwide, due to the high environmental and market demands to replace organic solvents and monomers derived from petroleum. The incorporation of biopolymers or biobased monomers is among the main strategies currently used for the synthesis of more environmentally friendly polymeric materials, by reducing the carbon footprint and enhancing biodegradability.

This Ph.D. Thesis investigates the synthesis of different hybrid polymeric materials based on resources derived from natural sources, for different applications. In this sense, the incorporation of one or two proteins is proposed, casein (milk protein) and zein (corn protein), searching for a nanostructured hybrid polymer with high synergy between the phases. On the other hand, the use of biobased monomers allows increasing the substitution of monomers derived from petroleum, minimizing the environmental impact of the materials. The content of this Ph. D. Thesis is shown in Figure 1, which includes the proteins used, the method of synthesis, the material and application pursued, the research group with whom there was a collaboration, and the associated publication (when applicable). Below is a short review of each chapter of the Ph. D. Thesis.

In Chapter 1, the main background and concepts related to the polymerization techniques used, such as batch and semi-batch emulsion polymerization and mini-emulsion polymerization, are shown. In addition, general considerations are included regarding the proteins used (casein and zein); and on the bioderived monomers [isobornyl methacrylate (IBOMA) and 2-octyl acrylate (OA)] used for the preparation of the materials. Moreover, general considerations are taken into account about the main applications of interest in this Ph. D. Thesis.

Chapter 2 considers the chemical modification of zein (hydrophobic protein), with the aim of obtaining a protein capable of radical polymerization. This study involved the use of various modifying agents, which contain different reactive groups, to determine the most suitable system for the functionalization of zein. The degree of zein modification was evaluated by nuclear magnetic resonance (NMR) and elemental analysis.



**Figure 1.** Summary of the content of Chapters 2-6 of this Ph. D. Thesis.

Chapter 3 contains the investigation of the incorporation of methacrylated zein as a bio-macrocrosslinker, in the synthesis of thermosensitive hydrogels based on poly(*N*-vinylcaprolactam). The effect of incorporating the chemically modified zein *versus* the native protein was analyzed. Furthermore, hydrogels with different concentrations of zein were synthesized and characterized for their potential application in the controlled release of drugs. Finally, the performance of the functionalized zein as a bio-macro cross-linker was compared to a conventional low molecular weight cross-linker (*N,N*-methylene-*bis*-acrylamide).

In Chapter 4, the synthesis of hybrid latexes based on methacrylated casein by batch emulsion polymerization was investigated, with the incorporation of biobased monomers (OA and IBOMA), for their application as a decorative coating. Different compositions in the monomer mixture were investigated using OA and IBOMA as a replacement for the petroleum-derived monomers BA and MMA, to increase the final biological content of the materials. The particle nucleation mechanism, polymerization kinetics, final biological fraction, and application properties were analyzed, emphasizing the water resistance and biodegradability of the films.

In Chapter 5, the incorporation of zein and casein in the synthesis of acrylic/protein hybrid latexes, with a moderate content of solids (35%), for its application as a decorative coating was studied. Due to the hydrophobicity of zein, the synthesis strategy used was batch mini-emulsion polymerization. The work involved the preparation of miniemulsions with different

combinations of proteins (maintaining a total protein content of 25% with respect to acrylic monomers), and their polymerization. The kinetics, the nucleation mechanism, the morphology of the nanoparticles obtained, and the application properties of the films produced from the latexes were evaluated. Furthermore, the performance of the hybrid latex was compared to the physical mixture of pure acrylic latex with proteins.

Chapter 6 involves the synthesis of acrylic/casein-zein hybrid nanoparticles, through semi-batch emulsion polymerization, with an initial seeding of bioparticles, with the aim of increasing the content of the hydrophobic protein. On the one hand, the strategy for obtaining bioparticles from proteins was investigated. Then, these bioparticles were used as seeds in the semi-batch polymerization of BA/MMA dosed as a mixture at a constant flow rate. The performance of semi-batch polymerization compared to batch polymerization was evaluated for this system. The reaction kinetics, diameter and morphology of the synthesized nanoparticles, and the properties of the films obtained were studied for their possible application as enteric coating.

Finally, in Chapter 7 the main conclusions of the research work were drawn and some suggestions for future work were formulated.

In addition to the results included in the aforementioned chapters, during the execution of this Ph. D. Thesis progress was also made in the study of the production of thermocurable coatings based on epoxidized soybean oil, cross-linked with dicarboxylic acids of different molecular weights (without catalysts). Results were published in: Allasia *et al.*, Polymer 2021; 232: 124143. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2021.124143>, and are not part of the content of this Ph. D. Thesis.

--



## **Desde semillas nutritivas a alimentos complejos: Marcadores de autenticidad y estabilidad de componentes bioactivos a lo largo de la cadena de producción**

Federico Iván Brigante

Tesis de Doctorado para optar al grado académico superior de Doctor en Química en el área de la Ciencia de los Alimentos - Premio AQA: “Dr. Enrique Herrero Ducloux 2023”. Directora de Tesis: Prof. Dra. María Verónica Baroni.

Grupo de Productos Orgánicos Naturales Bioactivos, Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos Córdoba (ICYTAC-CONICET, UNC), Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba (UNC). Email: fbrigante@gmail.com

*Recibido: 27 de septiembre de 2023*

*Aceptado: 31 de octubre de 2023*

---

La seguridad alimentaria hace referencia a la disponibilidad suficiente de alimentos, su acceso oportuno y su aprovechamiento biológico, de manera estable a través del tiempo. La globalización de la agricultura y consecuentemente su industrialización presentan efectos secundarios adversos que afectan a todo el planeta.

Estos efectos incluyen el desarrollo tecnológico sesgado, el uso de sólo algunas especies de plantas de alto consumo energético, prácticas de monocultivo y, de esta manera, una disminución de la diversidad genética en el sector agrícola. En consecuencia, la seguridad alimentaria mundial se ha vuelto fuertemente dependiente de cultivos mayoritarios como el arroz, el maíz y el trigo, los cuales sustentan más del 50 % de la demanda calórica mundial. Estos granos son una parte esencial de varias dietas, sin embargo, poseen una baja concentración de micronutrientes esenciales y no esenciales. Como resultado, se estima que la deficiencia de micronutrientes afecta aproximadamente a 2 mil millones de personas en todo el mundo [1,2]. Para abordar este problema, es necesario ampliar el campo de investigación y desarrollo mediante la explotación de las especies de cultivos desatendidas. Esto incluye antiguos cultivos que son ricos en micronutrientes y/o fitonutrientes que han desempeñado tradicionalmente el papel de alimento básico en muchas culturas y están actualmente relegados, ya que solamente ingresan en pequeños nichos del sistema alimentario mundial.

En este contexto, es muy necesario desarrollar el cultivo y la utilización de pseudocereales que han adquirido mucha relevancia en el siglo 21. Estos pseudocereales han ganado una importancia mundial en la industria nutracéutica debido a que poseen un mejor perfil nutricional en comparación con los cereales. Estos pseudocereales por lo general están

enriquecidos en varios compuestos bioactivos de importancia nutricional tales como polifenoles (flavonoides, lignanos, etc), aminoácidos, fibra alimentaria, vitaminas, minerales antioxidantes y ácidos grasos insaturados, entre otros [2,3]. Cereales tales como: el arroz, el maíz y el trigo son monocotiledóneas y pertenecen a la familia *Poaceae*, sin embargo el amaranto, la quinoa, el trigo sarraceno y la chía, aunque se asemejan a los cereales, son dicotiledóneas y se clasifican como pseudocereales. Otras dicotiledóneas que también cobraron la misma importancia debido a sus extraordinarias características nutricionales, del mismo orden que las de los pseudocereales, son el lino y el sésamo que a menudo reciben el nombre de “supersemillas” o “superalimentos”.

La chía (*Salvia hispanica L.*) es una hierba anual que puede crecer hasta 1 m de altura y tiene hojas dispuestas de manera opuesta con pequeñas flores hermafroditas blancas o moradas. La chía ha sido estudiada principalmente por su contenido de aceite, el cual posee casi 55–60 % de ácido linolénico ( $\omega$ -3), 18–20 % de ácido linoleico ( $\omega$ -6), 6 % de ácidos monoinsaturados ( $\omega$ -9) y 10 % de grasas saturadas. Los compuestos fenólicos de la chía serían los responsables de la mencionada actividad antioxidante. Dichos compuestos han sido ampliamente estudiados siendo los principales el ácido cafeico, el ácido (*R*)-3-(3,4-dihidroxifenil)-2-hidroxiopropanoico (también conocido con el nombre de *danshensu*) y otros como los ácidos rosmarinico y salvianólico [4-6].

El lino (*Linum usitatissimum L.*) es un cultivo anual perteneciente a la familia *Linaceae* y es uno de los cultivos herbáceos más antiguos con un origen que se remonta a la región del alto Asia o Cáucaso, extendiéndose posteriormente a China e India. Las semillas de lino son ricas en aceite (42-46 % del peso de la semilla) con un perfil mayoritario de ácidos grasos insaturados. Este aceite se compone de aproximadamente un 73 % de ácidos grasos insaturados, un 9 % de ácidos grasos saturados, 52–57 % ácido  $\alpha$ -linolénico (ALA) y una relación  $\omega$ -3/ $\omega$ -6 de 1:0,3 [7]. La harina de lino también puede contener compuestos antioxidantes, que se encuentran comúnmente en el lino entero como herbacetina diglucósido, ácido *p*-cumárico glucósido, ácido cafeico glucósido y ácido ferúlico glucósido, entre otros [8,9].

El sésamo (*Sesamum indicum L.*) es una planta herbácea anual cultivada por su semilla comestible. Cultivado desde la antigüedad en todo el subcontinente indio, Mesopotamia y Anatolia, el sésamo se había extendido a China hacia el año 2 d.C.; hoy, China se ha convertido en el mayor consumidor del mundo. Las semillas de sésamo son una muy buena fuente de energía, aportando 2340 kJ/100 g, principalmente por su alto contenido en aceite. Este aceite es rico en ácidos grasos mono y poliinsaturados y contiene una cantidad

significativa de ácido linoleico (un ácido graso esencial). Esta semilla es particularmente interesante debido a su alto contenido de lignanos fisiológicamente activos, siendo los principales sesamina y sesamolina [10]. Los lignanos de las semillas de sésamo se consideran responsables de una serie de efectos beneficiosos para la salud en los seres humanos, incluida la reducción de los niveles de colesterol en plasma y la elevación de los niveles de  $\gamma$ -tocoferol [11,12].

Actualmente, desde un punto de vista más holístico de la ciencia de alimentos, existe un notable interés en la integridad alimentaria, la cual puede ser definida como “el estado de estar completo, entero, sin disminuir, o en perfecta condición”. Este es un concepto moderno que involucra el origen de los alimentos, la trazabilidad, la seguridad, la autenticidad y la calidad [13,14].

Un aspecto clave de la integridad alimentaria está ligado a la trazabilidad alimentaria, la cual está definida como la habilidad de acceder a toda la información relacionada con un producto alimentario, durante su ciclo de producción completo (elaboración, procesado y distribución), a través de registros [15].

A partir de esto, surge la autenticación alimentaria como el proceso que verifica que un alimento se encuentre en cumplimiento con la descripción de su etiqueta. Una razón importante de la desconfianza en los consumidores radica en la ocurrencia de varios escándalos a nivel mundial de adulteración de alimentos. Los márgenes de ganancia en la producción de alimentos suelen ser relativamente bajos comparados con otras industrias como la farmacéutica. Por lo tanto, la adulteración de alimentos con ingredientes de menor costo es una de las prácticas fraudulentas utilizadas para maximizar ingresos por parte de fabricantes o comerciantes inescrupulosos [16].

Para verificar un alimento adulterado, es necesario hallar un compuesto o un conjunto de compuestos que puedan servir de marcadores de autenticidad e integridad. Entonces, la presencia/ausencia de un marcador o marcadores específicos indican la presencia/ausencia de un dado ingrediente, o cuya presencia no corresponde al producto, de este modo la evaluación de marcadores de genuinidad/ fraude se ha utilizado por mucho tiempo para evaluar la autenticidad de un dado producto. La necesidad de detectar estos marcadores de genuinidad (o indicadores de fraude) trajo aparejado la necesidad de desarrollar métodos analíticos que permitan su detección [17].

El término *Foodomics* (“alimentómica”) fue utilizado por primera vez en 2009 como “una disciplina que estudia los temas relacionados a los alimentos y la nutrición a través de la aplicación e integración de tecnologías ómicas avanzadas para mejorar el bienestar del

consumidor, su salud y su confianza". El estudio cualitativo y cuantitativo completo de un metaboloma, es decir, la metabolómica, es ahora un componente esencial de la biología de sistemas. La metabolómica se ha beneficiado enormemente de los avances en las tecnologías analíticas, incluida la resonancia magnética nuclear (RMN) y la espectrometría de masa de alta resolución (*HRMS*) acopladas a las técnicas de separación como la cromatografía líquida de ultra alta *performance* (*UHPLC*) o cromatografía gaseosa [18,19].

Las tecnologías ómicas, ya sea a través de métodos dirigidos como los enfoques no dirigidos, deben acompañarse del uso de métodos estadísticos que permitan manejar el gran volumen de datos (alta cantidad de variables para cada muestra analizada) que surge en los experimentos realizados y ser capaces de extraer información valiosa. La quimiometría es "la rama de la química que se ocupa del análisis de datos químicos (extrayendo información de los datos) y asegurando que los datos experimentales contengan la máxima información" [20].

A la hora de desarrollar un nuevo alimento funcional (alimentos procesados que brindan beneficios en la prevención de enfermedades y/o la promoción de la salud, además de su valor nutritivo) [21], se debe encontrar un alimento base que sirva como un medio para incluir componentes que le otorguen el mencionado efecto benéfico. Entre los alimentos base, podemos mencionar a los productos de panadería, que son consumidos en todo el mundo por gente de diferentes edades y culturas y representan un buen modelo a enriquecer a través de la adición de componentes bioactivos, como ser semillas nutritivas (chía, sésamo y lino) u otros. Existe un interés creciente en los productos de panadería funcionales con mayores beneficios para la salud, especialmente en la prevención de algunas enfermedades crónicas como la diabetes tipo 2, las enfermedades cardiovasculares y los trastornos neurodegenerativos. La fortificación de la harina de trigo con fitoquímicos, componentes vegetales con diversas bioactividades, es uno de los enfoques prometedores para mejorar la salud pública dado el consumo generalizado de este tipo de productos horneados [22]. En este sentido es imperioso evaluar la efectividad de dicha fortificación a través del estudio del efecto del procesado y de la digestión gastrointestinal sobre los ingredientes funcionales agregados (polifenoles u otros).

Es sabido que los métodos de cocción pueden afectar la estabilidad de los compuestos bioactivos. El procesamiento térmico, por ejemplo, conduce a la degradación del ácido ascórbico pero aumenta el nivel de contenido fenólico en vegetales como el tomate debido a la ruptura de uniones con componentes estructurales como la celulosa. Además, los productos

sobrecalentados también pueden provocar un color poco atractivo y un mal sabor debido a la reacción de oxidación de los lípidos y los compuestos bioactivos [23]. Esto demuestra que no hay una simple correlación entre la adición de compuestos antioxidantes y las características antioxidantes efectivas de un alimento y, por lo tanto, los cambios que ocurren en los alimentos funcionales como efecto del procesado deben ser estudiados. Además, la bioaccesibilidad de los compuestos beneficiosos agregados en un alimento funcional depende de su estabilidad digestiva, su liberación de la matriz alimentaria y la eficiencia de su paso transepitelial [24].

De lo anteriormente expuesto, surge que las mejoras nutricionales introducidas a los alimentos, transformándolos en funcionales, deben ser debidamente estudiadas a fin de comprobar si tales incorporaciones proveen beneficios reales para la salud de los consumidores. Esto podría estar afectado tanto por los procesos físicos y químicos involucrados en el procesado, como por los que ocurren a nivel gastrointestinal; por lo tanto dichas interacciones también deben ser incluidas en los estudios. Por otra parte, a fin de asegurar la calidad y la seguridad de estos nuevos alimentos, es necesario encontrar los marcadores químicos que los identifiquen, permitiendo verificar su presencia en alimentos enriquecidos.

En este trabajo se propuso hallar marcadores de autenticidad de semillas de chía, lino y sésamo, que son ampliamente valoradas por sus extraordinarias características nutricionales en términos de ácidos grasos, proteínas, minerales y micronutrientes que las hacen candidatas idóneas a ser incorporadas en la dieta, combinando técnicas de metabolómica dirigida y no dirigida por plataformas de espectrometría de masa y resonancia magnética nuclear junto a técnicas estadísticas multivariadas. Por otro lado, se propuso evaluar las mejoras de la calidad nutricional de productos de panadería con incorporación de estas semillas en diferentes formas (enteras o harina).

La aplicación de metabolómica no dirigida por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa permitió hallar marcadores de autenticidad únicos de cada semilla y expandir la huella de marcadores hallados previamente hacia familias químicas diferentes a polifenoles, tanto en modo negativo como positivo. Los resultados obtenidos con espectrometría de masa y analizados por técnicas estadísticas multivariadas como *PCA* y *OPLS-DA*, en ambos modos de ionización, permitieron proponer 23 compuestos como marcadores de autenticidad para las tres semillas, siendo en su mayoría pertenecientes a la familia de polifenoles y sus derivados glicosilados. Los modelos estadísticos fueron correctamente validados con buenos parámetros de ajuste y predictibilidad.

Con respecto a los estudios realizados de metabolómica no dirigida por resonancia magnética nuclear, se encontraron 7 compuestos en total como marcadores de las tres semillas en estado nativo, es decir sin procesar, perteneciendo a la familia de los polifenoles, glicósidos cianogénicos y derivados de cafeoíllo. Por otro lado, en este caso se validaron los marcadores hallados sobre una matriz compleja como galletas dulces con semillas enteras. Se observó que sólo los marcadores de sésamo resistieron el procesado y fueron validados por esta técnica.

La resonancia magnética se reafirmó como una técnica rápida de análisis con ventajas inherentes sobre las cromatografías previamente discutidas, que permitiría el análisis de autenticidad de matrices complejas de panadería que contengan las semillas en equipos de rutina en tiempos menores, aunque con limitaciones en cuanto a sensibilidad y posibilidad de detectar metabolitos que cambian durante el procesamiento.

La aplicación de la metabolómica dirigida por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa, permitió hallar marcadores de autenticidad de cada semilla y validarlos en galletas dulces y productos comerciales, particularmente estudiando la familia de los polifenoles. Luego de la aplicación de las técnicas de estadística multivariada, se determinaron 12 compuestos para la diferenciación de las semillas. Estos marcadores luego fueron evaluados en las galletas dulces y en productos comerciales ampliamente consumidos, demostrando un fuerte impacto del proceso productivo sobre los marcadores propuestos. Los lignanos, sobre todo derivados glicosilados de sesaminol, fueron seleccionados como marcadores de semillas de sésamo. Estos mostraron su prevalencia en el estudio no dirigido y luego fueron exitosamente propuestos, cuantificados y validados en el estudio dirigido. Además, se logró la validación de marcadores para las tres semillas en una variedad de productos comerciales de panadería, de los cuales se comprobó así su autenticidad.

Por otra parte, en lo referido a los aspectos nutricionales estudiados, se logró mejorar la calidad de productos con harina de semillas, lo cual quedó demostrado a través de la medición de la actividad antioxidante y el contenido total de polifenoles con respecto a una galleta control. Si bien se observó un incremento de actividad y contenido de polifenoles al incrementar la cantidad de ingrediente funcional, los estudios *in vitro* confirmaron que ambos se ven afectados negativamente al incorporarlas en productos de panadería dado que se observaron grandes pérdidas con respecto a la actividad y contenido de polifenoles de la harina. Este punto indica que debería tenerse mayor cuidado y estudio al enunciar ciertas propiedades funcionales en los rótulos de alimentos procesados, ya que se observó una

marcada disminución de tales propiedades por efecto del procesamiento en los casos estudiados durante esta Tesis. Al mismo tiempo, se consiguió la revalorización de un material que a menudo se descarta durante la producción de aceite, para la creación de nuevos alimentos funcionales con propiedades antioxidantes mejoradas.

La formulación de nuevos alimentos funcionales con harina desgrasada de semillas tuvo buena aceptación por parte de los consumidores, esto se vio reflejado en resultados de una prueba descriptiva y una afectiva. Este paso es esencial a la hora de incluir nuevos productos en el mercado, además de la presencia de beneficios para la salud. Al mismo tiempo, un buen producto funcional debe ser apto tecnológicamente y responder a las exigencias de los estándares de productos ya existentes en el mercado. Los productos formulados presentaron muy buenas características tecnológicas que permitirían su potencial incorporación.

El estudio del proceso digestivo de las galletas permitió constatar que los polifenoles sobreviven a los procesos que ocurren durante ella y son absorbidos en el intestino para estar potencialmente biodisponibles. Esto quedó demostrado por los porcentajes de recuperación observados, cercanos al 20 %. Además, se observó que la mejora en actividad antioxidante se mantuvo con respecto a la formulación control en todos los pasos del proceso digestivo. Los lignanos di- y tri-glucosilados, particularmente, mostraron una mayor resistencia a estos procesos que sus respectivas agliconas. Además, las galletas con harina de sésamo mostraron un efecto prebiótico, es decir, favorecieron el crecimiento de las bacterias benéficas. Esto constituye un beneficio más que se suma a los expuestos en los anteriores párrafos.

La aplicación de flujos de trabajo de metabolómica por diferentes técnicas analíticas resultó excelente en la búsqueda de marcadores moleculares en alimentos tanto en materias primas como en productos procesados.

La quimiometría brindó herramientas que permitieron extraer patrones de clasificación correctamente validados para proponer los marcadores.

En resumen, se hallaron exitosamente marcadores de la presencia de semillas a lo largo de la cadena de producción de panificados. Esto se logró con la aplicación de técnicas analíticas acopladas y estadística multivariada. Gracias a estos marcadores, las semillas fueron diferenciadas entre ellas en su estado crudo/nativo e identificadas dentro de diferentes matrices de panadería. Se confirmaron el impacto del procesado sobre sus propiedades nutraceuticas y los beneficios que proveen al ser ingeridas a través de su incorporación en galletas dulces.

## Referencias

1. FAO (2013). The State of Food and Agriculture, Food and Agriculture Organisation, Rome.
2. Pirzadah T.B., Malik B. Pseudocereals as super foods of 21st century: recent technological interventions. *J. Agric. Food Res.* 2020; 2: 100052.
3. Kreft I., Zhou M., Golob A., *et al.* Breeding buckwheat for nutritional quality. *Breed. Sci.* 2020; 70: 67-73.
4. Rahman M. J., Costa de Camargo A., Shahidi F. Phenolic and polyphenolic profiles of chia seeds and their *in vitro* biological activities. *J. Funct. Foods* 2017; 35: 622-634.
5. Saphier O., Silberstein T., Kamer H., *et al.* Chia seeds are richer in polyphenols compared to flax seeds. *Integr. Food Nutr. Metab.* 2017; 4: 1-4. Doi: 10.15761/IFNM.1000182.
6. Oliveira-Alves S.C., Vendramini-Costa D.B., Betim Cazarin C.B., *et al.* Characterization of phenolic compounds in chia (*Salvia hispanica* L.) seeds, fiber flour and oil. *Food Chem.* 2017; 232: 295-305.
7. Madhusudhan B. Potential benefits of flaxseed in health and disease - A perspective. *Agric. Conspec. Sci.* 2009; 74: 67-72.
8. Corbin C., Fidel T., Leclerc E.A., *et al.* Development and validation of an efficient ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from flax (*Linum usitatissimum* L.) seeds. *Ultrason. Sonochem.* 2015; 26: 176-185.
9. Teh S.-S., Niven B.E., Bekhit A.ED.A. *et al.* Optimization of polyphenol extraction and antioxidant activities of extracts from defatted flax seed cake (*Linum usitatissimum* L.) using microwave-assisted and pulsed electric field (PEF) technologies with response surface methodology. *Food Sci. Biotechnol.* 2015; 24: 1649-1659.
10. Budowski P., Markley K.S. The chemical and physiological properties of sesame oil. *Chem. Rev.* 1951; 48: 125-151.
11. Lemcke-Norojärvi M., Kamal-Eldin A., Appelqvist L.A., *et al.* Corn and sesame oils increase serum  $\gamma$ -tocopherol concentrations in healthy Swedish women. *J. Nutr.* 2001; 131: 1195-1201.
12. Cooney R.V., Custer L.J., Okinaka L., *et al.* Effects of dietary sesame seeds on plasma tocopherol levels. *Nutr. Cancer* 2001; 39: 66-71.
13. Kendall H., Clark B., Rhymer C., *et al.* A systematic review of consumer perceptions of food and authenticity: A European perspective. *Trends Food Sci. Technol.* 2019; 94: 79-90.
14. Manning L. Food Integrity. *Br. Food J.* 2017; 119: 2-6.
15. Olsen P., Borit M. How to define traceability. *Trends Food Sci. Technol.* 2013; 29: 142-150.
16. Aung M.M., Chang Y.S. Traceability in a food supply chain: Safety and quality perspectives. *Food Control* 2014; 39: 172-184.
17. Georgiou C.A., Danezis G.P. Chapter 3 - Elemental and Isotopic Mass Spectrometry. *Compr. Anal. Chem.* 2015; 68: 131-243.
18. Dettmer K., Aronov P.A., Hammock B.D. Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrom. Rev.* 2007; 26: 51-78.
19. Hall R.D. Plant metabolomics: from holistic hope, to hype, to hot topic. *New Phytol.* 2006; 169: 453-468.
20. Katajamaa M., Oresic M. Data processing for mass spectrometry-based metabolomics. *J. Chromatogr. A* 2007; 1158: 318-328.
21. Arihara K. Functional Foods. *Encyclopedia of Meat Sciences (Second Edition)*. Devine C., Dikeman M. (eds.), Segunda Edición. Oxford: Academic Press, págs. 32-36; 2014.
22. Gao J., Koh A.H.S., Zhou W. Enhancing health benefits of bakery products using phytochemicals. *Adv. Food Nutr. Res.* 2022; 99: 239-281.



23. Rajchl A., Voldřich M., Čížková H., *et al.* Stability of nutritionally important compounds and shelf life prediction of tomato ketchup. *J. Food Eng.* 2010; 99: 465-470.
24. Ortega N., Macià A, Romero M.P., *et al.* Matrix composition effect on the digestibility of carob flour phenols by an *in-vitro* digestion model. *Food Chem.* 2011; 124: 65-71.

--

### **From nutritious seeds to complex foods: Markers of authenticity and stability of bioactive components throughout the production chain**

Food security refers to the sufficient availability of food, its timely access and biological use in a stable manner over time. The globalization of agriculture and, consequently, its industrialization show adverse side effects that affect the entire planet.

These effects include biased technological development, the use of only some energy-intensive plant species, monoculture practices and, therefore, a decrease in genetic diversity in the agricultural sector. Consequently, global food security has become heavily dependent on major crops such as rice, corn and wheat, which support more than 50% of global caloric demand. These grains are an essential part of several diets; however, they have a low concentration of essential and non-essential micronutrients. As a result, micronutrient deficiency is estimated to affect approximately 2 billion people worldwide [1,2]. To address this problem, there is a need to expand the scope of research and development by exploiting the neglected crop species. This includes ancient crops that are rich in micronutrients and/or phytonutrients that have traditionally played the role of staple food in many cultures and are currently relegated, only entering small niches of the global food system.

In this context, it is very necessary to develop the culture and use of pseudocereals that have become very relevant in the 21st century. These pseudocereals have gained global importance in the nutraceutical industry because they have a better nutritional profile compared to cereals. These pseudocereals generally contain several bioactive compounds of nutritional importance such as polyphenols (flavonoids, lignans, etc.), amino acids, dietary fiber, vitamins, antioxidant minerals and unsaturated fatty acids, among others [2,3]. Cereals such as rice, corn and wheat are monocotyledonous and belong to the *Poaceae* family, however amaranth, quinoa, buckwheat and chia, although they resemble cereals, are dicotyledonous and are classified as pseudocereals. Other dicotyledons that also gained the same importance due to their extraordinary nutritional characteristics, similar to those of pseudocereals, are flax and sesame, which are often called “superseeds” or “superfoods”.

Chia (*Salvia hispanica* L.) is an annual herb that can grow up to 1 m tall and has oppositely

arranged leaves with small white or purple hermaphrodite flowers. Chia has been studied mainly for its oil content, which has almost 55–60% linolenic acid ( $\omega$ -3), 18–20% linoleic acid ( $\omega$ -6), 6% monounsaturated acids ( $\omega$ -9), and 10% saturated fat. The phenolic compounds in chia would be responsible for the aforementioned antioxidant activity. These compounds have been widely studied, the main ones being caffeic acid, (*R*)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-hydroxypropanoic acid (also known as *danshensu*), and others such as rosmarinic and salvianolic acids [4-6].

Flax (*Linum usitatissimum* L.) is an annual crop belonging to the *Linaceae* family and is one of the oldest herbaceous crops with an origin that dates back to the region of Upper Asia or Caucasus, later spreading to China and India. Flax seeds are rich in oil (42-46% of the seed weight) with a profile of mostly unsaturated fatty acids. This oil is composed of approximately 73% unsaturated fatty acids, 9% saturated fatty acids, 52–57%  $\alpha$ -linolenic acid (ALA), and a  $\omega$ -3/ $\omega$ -6 ratio of 1:0.3 [7]. Flax flour may also contain antioxidant compounds, which are commonly found in whole flax, such as herbacetin diglucoside, *p*-coumaric acid glucoside, caffeic acid glucoside, and ferulic acid glucoside, among others [8,9].

Sesame (*Sesamum indicum* L.) is an annual herbaceous plant cultivated for its edible seed. Cultivated since ancient times throughout the Indian subcontinent, Mesopotamia and Anatolia, sesame had spread to China by year 2 AD. Today, China has become the world's largest sesame consumer. Sesame seeds are a very good source of energy, providing 2340 kJ/100 g, mainly due to the high oil content. This oil is rich in mono- and polyunsaturated fatty acids, and contains a significant amount of linoleic acid (an essential fatty acid). This seed is particularly interesting due to its high content of physiologically active lignans, the main ones being sesamin and sesamolin [10]. Lignans from sesame seeds are considered responsible for a number of human beneficial health effects, including reducing plasma cholesterol levels and increasing  $\gamma$ -tocopherol levels [11,12].

Currently, from a more holistic point of view of food science, there is notable interest in food integrity, which can be defined as “the state of being complete, whole, undiminished, or in perfect condition.” This is a modern concept that involves food origin, traceability, safety, authenticity, and quality [13,14].

A key aspect of food integrity is linked to food traceability, which is defined as the ability to access all information related to a food product, during its complete production cycle (manufacturing, processing and distribution), through records [15].

From this on, food authentication arises as the process that verifies that a food complies with the description on its label. An important reason for consumer distrust lies in the

occurrence of several global food adulteration scandals. Profit margins in food production are usually relatively low compared to other industries such as pharmaceuticals. Therefore, food adulteration with lower cost ingredients is one of the fraudulent practices used to maximize revenue by unscrupulous manufacturers or traders [16].

To verify an adulterated food, it is necessary to find a compound or a set of compounds that can serve as markers of authenticity and integrity. Therefore, the presence/absence of a specific marker or markers indicates the presence/absence of a given ingredient, or whose presence does not correspond to the product. Consequently, the evaluation of genuineness/fraud markers has been used for a long time to evaluate the authenticity of a given product. The need to detect these genuineness markers (or fraud indicators) brought with it the need to develop analytical methods that allow their detection [17].

The term *Foodomics* was used for the first time in 2009 as “a discipline that studies issues related to food and nutrition through the application and integration of advanced omics technologies to improve consumer well-being, health, and trust”. The complete qualitative and quantitative study of a metabolome, i.e. metabolomics, is now an essential component of systems biology. Metabolomics has benefited greatly from advances in analytical technologies, including nuclear magnetic resonance (NMR) and high-resolution mass spectrometry (HRMS) coupled to separation techniques such as ultra-high-performance liquid chromatography (UHPLC), or gas chromatography [18,19].

Omic technologies, whether through targeted methods or non-targeted approaches, must be accompanied by the use of statistical methods that allow handling the large data volume (high number of variables for each sample analyzed) that arises in the experiments carried out and are capable of extracting valuable information. Chemometrics is "the branch of chemistry that deals with the analysis of chemical data (extracting information from the data) and ensuring that the experimental data contain maximum information" [20].

When developing a new functional food (processed foods that provide benefits in disease prevention and/or health promotion, in addition to the nutritional value) [21], a base food must be found that serves as a means to include components that give it the aforementioned beneficial effect. Among basic foods, bakery products can be mentioned, which are consumed throughout the world by people of different ages and cultures, and account for a good model to enrich through the addition of bioactive components, such as nutritious seeds (chia, sesame and flax) or others. There is growing interest in functional bakery products with greater health benefits, especially in the prevention of some chronic diseases such as type 2 diabetes, cardiovascular diseases, and neurodegenerative disorders. Fortification of wheat

flour with phytochemicals, plant components with various bioactivities, is one of the promising approaches to improve public health given the widespread consumption of this type of baked products [22]. In this sense, it is imperative to evaluate the effectiveness of such fortification through the study of the effect of processing and gastrointestinal digestion on the added functional ingredients (polyphenols or others).

It is known that cooking methods can affect the stability of bioactive compounds. Thermal processing, for example, leads to the degradation of ascorbic acid, but increases the level of phenolic content in vegetables such as tomatoes due to the bond breakdown with structural components such as cellulose. Furthermore, overheated products can also cause unattractive color and bad taste due to the oxidation reaction of lipids and bioactive compounds [23]. This demonstrates that there is no simple correlation between the addition of antioxidant compounds and the effective antioxidant characteristics of a food and, therefore, the changes that occur in functional foods as an effect of processing should be studied. Moreover, the bioaccessibility of the beneficial compounds added to a functional food depends on their digestive stability, release from the food matrix, and efficiency of their transepithelial passage [24].

Consequently, the nutritional improvements introduced to foods, which transform them into functional ones, must be duly studied in order to verify whether such additions provide real benefits for the health of consumers. This could be affected by both the physical and chemical processes involved in processing, as well as those that occur at the gastrointestinal level. Therefore, these interactions should be also included in the studies. On the other hand, in order to ensure the quality and safety of the new foods, it is necessary to find chemical markers to identify them, allowing to be verified in fortified foods.

In this Ph. D. Thesis, it was proposed to find authenticity markers for chia, flax and sesame seeds, which are widely valued for the extraordinary nutritional characteristics in terms of fatty acids, proteins, minerals, and micronutrients that make them ideal candidates to be incorporated into the diet. Combined targeted and non-targeted metabolomics techniques were used using mass spectrometry and nuclear magnetic resonance platforms, together with multivariate statistical techniques. On the other hand, the improvements in the nutritional quality of bakery products were proposed to be evaluated with the incorporation of seeds in different forms (whole or flour).

The application of non-targeted metabolomics by liquid chromatography coupled to mass spectrometry made it possible to find unique authenticity markers for each seed and further expand the footprint of markers previously found towards chemical families other than polyphenols, both in negative and positive modes.

Results from mass spectrometry, and analyzed by multivariate statistical techniques, such as PCA and OPLS-DA, in both ionization modes, led to propose 23 compounds as authenticity markers for the three seeds, most of them belonging to the family of polyphenols, and its glycosylated derivatives. The statistical models were correctly validated with good fit parameters and predictability.

With respect to the metabolomics studies not directed by nuclear magnetic resonance, 7 compounds in total were found as markers of the three seeds in native state, that is, unprocessed, belonging to the family of polyphenols, cyanogenic glycosides, and caffeoyl derivatives. On the other hand, in this case the markers found on a complex matrix such as sweet cookies with whole seeds were validated. Only sesame markers resisted processing and were validated by this technique.

Magnetic resonance was reaffirmed as a rapid analysis technique with inherent advantages over the previously discussed chromatographies, which would allow the authenticity analysis of complex bakery matrices containing seeds in routine equipment in shorter times, although with limitations in terms of sensitivity, and possibility of detecting metabolites that change during processing.

The application of metabolomics directed by liquid chromatography coupled to mass spectrometry made it possible to find authenticity markers for each seed and validate them in sweet cookies and commercial products, particularly studying the polyphenol family. After the application of multivariate statistical techniques, 12 compounds were determined for seed differentiation. These markers were then evaluated in sweet cookies and in widely consumed commercial products, demonstrating a strong impact of the production process on the proposed markers. Lignans, especially glycosylated derivatives of sesaminol, were selected as sesame seed markers. These markers showed prevalence in the undirected study and were then successfully proposed, quantified and validated in the directed study. In addition, the validation of markers for the three seeds was achieved in a variety of commercial bakery products, thus verifying authenticity.

On the other hand, regarding the nutritional aspects studied, it was possible to improve the quality of products with seed flour, which was demonstrated through the measurement of the antioxidant activity and the total content of polyphenols with respect to a control cookie. Although an increase in activity and content of polyphenols was observed by increasing the amount of functional ingredient, *in vitro* studies confirmed that both are negatively affected when incorporated into bakery products since large losses with respect to activity and content of flour polyphenols were observed.

This point indicates that greater care and study should be taken into account when stating certain functional properties on the labels of processed foods, since such properties markedly decreased due to the effect of processing in the cases studied. At the same time, the revaluation of a material that is often discarded during oil production was achieved, for the creation of new functional foods with improved antioxidant properties.

The formulation of new functional foods with defatted seed flour was well accepted by consumers as reflected in descriptive and sensorial tests. This step is essential when including new products on the market, in addition to the presence of health benefits. At the same time, a good functional product must be technologically suitable and must respond to the demands of product standards already existing on the market. The formulated products showed very good technological characteristics that would allow their potential incorporation.

The study of the digestive process of cookies made it possible to verify that polyphenols survive these processes, and these compounds are absorbed in the intestine to be potentially bioavailable. This was demonstrated by the observed recovery percentages, close to 20%. Furthermore, the improvement in antioxidant activity was maintained with respect to the control formulation in all steps of the digestive process. In particular, di- and tri-glycosylated lignans showed greater resistance to these processes than the respective aglycones. In addition, cookies with sesame flour showed a prebiotic effect, that is, they promoted the growth of beneficial bacteria. This constitutes another benefit to be added to those explained above.

The application of metabolomics workflows using different analytical techniques was excellent in the search for molecular markers in foods, both in raw materials and in processed products.

Chemometrics provided tools that allowed correctly validated classification patterns to be extracted to propose markers.

In summary, markers of the presence of seeds were successfully found throughout the bakery production chain. This was achieved with the application of coupled analytical techniques and multivariate statistics. Thanks to these markers, the seeds were differentiated from each other in their raw/native state, and identified within different bakery matrices. The impact of processing on the nutraceutical properties and the benefits provided when ingested through their incorporation into sweet cookies were confirmed.

## **References**

1. FAO (2013). *The State of Food and Agriculture*, Food and Agriculture Organisation, Rome.

2. Pirzadah T.B., Malik B. Pseudocereals as super foods of 21st century: recent technological interventions. *J. Agric. Food Res.* 2020; 2: 100052.
3. Kreft I., Zhou M., Golob A., *et al.* Breeding buckwheat for nutritional quality. *Breed. Sci.* 2020; 70: 67-73.
4. Rahman M. J., Costa de Camargo A., Shahidi F. Phenolic and polyphenolic profiles of chia seeds and their *in vitro* biological activities. *J. Funct. Foods* 2017; 35: 622-634.
5. Saphier O., Silberstein T., Kamer H., *et al.* Chia seeds are richer in polyphenols compared to flax seeds. *Integr. Food Nutr. Metab.* 2017; 4: 1-4. Doi: 10.15761/IFNM.1000182.
6. Oliveira-Alves S.C., Vendramini-Costa D.B., Betim Cazarin C.B., *et al.* Characterization of phenolic compounds in chia (*Salvia hispanica* L.) seeds, fiber flour and oil. *Food Chem.* 2017; 232: 295-305.
7. Madhusudhan B. Potential benefits of flaxseed in health and disease - A perspective. *Agric. Conspec. Sci.* 2009; 74: 67-72.
8. Corbin C., Fidel T., Leclerc E.A., *et al.* Development and validation of an efficient ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from flax (*Linum usitatissimum* L.) seeds. *Ultrason. Sonochem.* 2015; 26: 176-185.
9. Teh S.-S., Niven B.E., Bekhit A.E.D.A. *et al.* Optimization of polyphenol extraction and antioxidant activities of extracts from defatted flax seed cake (*Linum usitatissimum* L.) using microwave-assisted and pulsed electric field (PEF) technologies with response surface methodology. *Food Sci. Biotechnol.* 2015; 24: 1649-1659.
10. Budowski P., Markley K.S. The chemical and physiological properties of sesame oil. *Chem. Rev.* 1951; 48: 125-151.
11. Lemcke-Norojärvi M., Kamal-Eldin A., Appelqvist L.A., *et al.* Corn and sesame oils increase serum  $\gamma$ -tocopherol concentrations in healthy Swedish women. *J. Nutr.* 2001; 131: 1195-1201.
12. Cooney R.V., Custer L.J., Okinaka L., *et al.* Effects of dietary sesame seeds on plasma tocopherol levels. *Nutr. Cancer* 2001; 39: 66-71.
13. Kendall H., Clark B., Rhymer C., *et al.* A systematic review of consumer perceptions of food and authenticity: A European perspective. *Trends Food Sci. Technol.* 2019; 94: 79-90.
14. Manning L. Food Integrity. *Br. Food J.* 2017; 119: 2-6.
15. Olsen P., Borit M. How to define traceability. *Trends Food Sci. Technol.* 2013; 29: 142-150.
16. Aung M.M., Chang Y.S. Traceability in a food supply chain: Safety and quality perspectives. *Food Control* 2014; 39: 172-184.
17. Georgiou C.A., Danezis G.P. Chapter 3 - Elemental and Isotopic Mass Spectrometry. *Compr. Anal. Chem.* 2015; 68: 131-243.
18. Dettmer K., Aronov P.A., Hammock B.D. Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrom. Rev.* 2007; 26: 51-78.
19. Hall R.D. Plant metabolomics: from holistic hope, to hype, to hot topic. *New Phytol.* 2006; 169: 453-468.
20. Katajamaa M., Oresic M. Data processing for mass spectrometry-based metabolomics. *J. Chromatogr. A* 2007; 1158: 318-328.
21. Arihara K. Functional Foods. *Encyclopedia of Meat Sciences (Second Edition)*. Devine C., Dikeman M. (eds.), Segunda Edición. Oxford: Academic Press, págs. 32-36; 2014.
22. Gao J., Koh A.H.S., Zhou W. Enhancing health benefits of bakery products using phytochemicals. *Adv. Food Nutr. Res.* 2022; 99: 239-281.
23. Rajchl A., Voldřich M., Čížková H., *et al.* Stability of nutritionally important compounds and shelf life prediction of tomato ketchup. *J. Food Eng.* 2010; 99: 465-470.
24. Ortega N., Macià A, Romero M.P., *et al.* Matrix composition effect on the digestibility of carob flour phenols by an *in-vitro* digestion model. *Food Chem.* 2011; 124: 65-71.

**ESTUDIO ESTRUCTURAL Y ESPECTROSCÓPICO DE DERIVADOS  
BENCÉNICOS NITROGENADOS Y CLORADOS CON ACTIVIDADES  
BIOLÓGICAS ANTAGÓNICAS**

María Victoria Elizabeth Castillo Scheuermann

Tesis de Doctorado para optar al grado académico superior de Doctor en Ciencias Químicas –  
Premio AQA: “Dr. Enrique Herrero Ducloux 2023”. Directora: Prof. Dra. Silvia Antonia  
Brandán.

Instituto de Química Inorgánica; Cátedra de Química General. Facultad de Bioquímica,  
Química y Farmacia, Universidad Nacional de Tucumán. vitimol@hotmail.com

*Recibido: 11 de julio de 2023*

*Aceptado: 24 de agosto de 2023*

---

En este trabajo de tesis se realizó el estudio estructural y espectroscópico, experimental y teórico, de dos series de compuestos con actividades biológicas totalmente antagónicas. Los compuestos de cada serie son derivados bencénicos nitrogenados y clorados. La primera serie está conformada por dos grupos, el primer grupo constituido por tres derivados del núcleo quinazolin (A): I) 3-amino-2-(4-clorofenil) quinazolin-4(3H)-ona, II) 3-amino-2-(4-metilfenil) quinazolin-4(3H)-ona y III) 3-amino-2-(4-nitrofenil) quinazolin-4(3H)-ona, mientras que el segundo grupo está formado por tres derivados del núcleo benzoxazin (B): I) 2-(4-clorofenil)-4H-3,1-benzoxazin-4-ona, II) 2-(4-metilfenil)-4H-3,1-benzoxazin-4-ona y III) 2-(4-nitrofenil)-4H-3,1-benzoxazin-4-ona. Por otro lado, la segunda serie considera los siguientes derivados bencénicos: hexaclorobenceno, ácido 2,4-diclorofenoxiacético, 3,3',4,4'-tetracloroazobenceno (TCAB) y 3,3',4,4'-tetracloroazoxibenceno (TCABO). Adicionalmente, se realizó el estudio del comportamiento en solución del ácido 2,4-diclorofenoxiacético en acetona.

Los compuestos que contienen núcleos bencénicos en sus estructuras presentan propiedades muy diversas según el número y la naturaleza de los diferentes grupos sustituyentes. Tanto el benceno como sus derivados han sido utilizados en innumerables síntesis, como productos intermediarios y/o finales y son ampliamente estudiados desde diferentes puntos de vista.

Las síntesis y los estudios estructurales y vibracionales de diversos compuestos bencénicos nitrogenados o clorados, con núcleos quinazolin o benzoxazin en sus estructuras (como los compuestos propuestos en la primera serie), son de gran interés químico, bioquímico y farmacológico ya que producen numerosos e interesantes efectos biológicos en el organismo



humano. Las 3*H*-quinazolin-4-onas y 4*H*-3,1-benzoxazin-4-onas son subunidades estructurales centrales que existen en una serie de productos naturales bioactivos. Las 3*H*-quinazolin-4-onas exhiben un amplio espectro de actividades biológicas y farmacéuticas, que hacen que sean muy usadas en las terapias antihipertensivas, antidiabéticas, antiinflamatorias, antibacterianas, anticonvulsivas, antitumorales, como depresor del sistema nervioso central (SNC) y diuréticas. De forma similar, los compuestos 2-sustituidos-4*H*-3,1-benzoxazin-4-onas actúan como inactivadores de quimotripsina, inhibidores de la elastasa leucocitaria humana y serina proteasa.

Por otro lado, los compuestos de la segunda serie, exhiben características toxicológicas que influyen en el metabolismo humano y en la potencial biodegradación por parte de los microorganismos presentes en el suelo. Algunos de estos compuestos tienen baja toxicidad pero otros son altamente tóxicos. En el caso de los derivados azo y azoxi bencenos, I. J. Badovinac y col. reportaron que los mismos presentan propiedades fotoquímicas y físicas, por lo cual, estos derivados se usan ampliamente en múltiples aplicaciones desde el punto de vista industrial.

Hasta la fecha, se conocen los efectos biológicos que producen en el organismo ambas series de compuestos, pero los mecanismos de los efectos terapéuticos, en el primer grupo o toxicológicos, en el segundo, aún son desconocidos.

En los últimos años, sólo para algunos de los compuestos estudiados, se determinaron experimentalmente las estructuras cristalinas y moleculares. Para los compuestos de la primera serie a estudiar, los derivados quinazolin y benzoxazin, la síntesis y caracterización por espectroscopías de resonancia magnética nuclear (RMN) e Infrarrojo y espectrometría de masa fueron reportadas por Rai y col. Hasta el momento, las estructuras cristalinas y moleculares de estos compuestos no fueron determinadas y no existen estudios teóricos sobre sus geometrías y las asignaciones de sus espectros vibracionales. Sin embargo, para compuestos similares como el 3-amino-2-fenilquinazolin-4(3*H*)-ona, existen estudios teóricos a nivel B3LYP/6-31G\*, reportados por Panicker y col., con la asignación completa de las bandas observadas en los espectros vibracionales y, además, para el compuesto 2-fenil-4*H*-3,1-benzoxazin-4-ona, Ambujakshan y col. informaron el estudio vibracional junto a cálculos teóricos.

Con respecto a los compuestos de la segunda serie, recientemente fueron reportadas para el hexaclorobenceno, sólo las características principales del espectro Raman en fase sólida por Zhang y col., quienes registraron el correspondiente espectro FT-Raman e identificaron los

principales grupos funcionales del compuesto. En ese estudio, la simulación del espectro Raman fue llevada a cabo mediante el método B3LYP/Lan12dz.

El refinamiento de la estructura cristalina del ácido fenoxiacético fue publicado por Colin H. L. Kennard, mientras que los estudios estructurales de los ácidos 2-clorofenoxiacético y 4-clorofenoxiacético se llevaron a cabo mediante el uso de métodos de rayos X por diferentes autores.

Un estudio teórico sobre la estructura molecular y asignaciones vibracionales parciales del ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) en fase gaseosa fue reportado por Badawi y col. En este estudio, los autores informaron ocho estructuras teóricas junto a una asignación vibracional parcial, teniendo en cuenta la estructura *Cgcpp* no planar (*C* = *cis*, *g* = *gauche* y *pp* = *perpendicular*) usando el nivel de cálculos B3LYP/6-311G\*\* y el programa *GaussView 5.0*. Sin embargo, la metodología SQMFF no fue utilizada para realizar las asignaciones correspondientes de las bandas observadas en los espectros vibracionales y, además, el correspondiente campo de fuerza no fue reportado.

Los estudios computacionales sobre la superficie de energía potencial (SEP), los estados electrónicos excitados, el uso de la relación de propiedad de estructura cuantitativa (QSPR), la red neuronal artificial (ANN) junto a la fotoisomerización de los compuestos de azobenceno y sus derivados ya fueron publicados por G. Chilaya y col. Sin embargo, los espectros vibracionales de TCAB siguen sin asignarse. Por otra parte, los derivados azoxi, tienen isómeros geométricos, conocidos como configuraciones *Cis* y *Trans*, cuyos mecanismos de isomerización fueron estudiados por diferentes autores, y sus estructuras *Trans* fueron determinadas para algunos derivados mediante el uso de rayos X.

Debido al amplio espectro de usos e importancia de ambas series de compuestos, el presente trabajo de Tesis estuvo dirigido a la investigación experimental y teórica combinando métodos espectroscópicos con cálculos teóricos derivados de la mecánica cuántica.

En principio, se llevaron a cabo las caracterizaciones de los compuestos hexaclorobenceno (HCB) y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), mediante espectroscopías de infrarrojo y Raman en los estados de agregación en que fueron posibles, con equipos pertenecientes a los Servicios Técnicos del Instituto de Investigaciones para la Industria Química (INIQUI, CONICET) de la Universidad Nacional de Salta. Luego se continuaron los estudios con los compuestos bencénicos de la primera serie. Todos ellos son compuestos comerciales de elevada pureza.

Posteriormente, se realizaron las síntesis de los compuestos azo y azoxi bencenos en colaboración con el Dr. Juan Zinczuk del Instituto de Química Rosario (IQUIR-CONICET) de la Universidad Nacional de Rosario, Santa Fe, quien posee una amplia experiencia en el área de la síntesis orgánica. Los compuestos sintetizados fueron caracterizados mediante espectroscopía de RMN en solución de cloroformo deuterado, espectrometría de masa y los espectros de infrarrojo, Raman y de absorción UV- Visible.

Los estudios experimentales se completaron con cálculos teóricos empleando métodos derivados de la Teoría de los Funcionales de la Densidad (DFT) con diferentes funcionales y conjuntos de funciones base usando el conjunto de programas Gaussian 09. En esta oportunidad, se usó el método híbrido B3LYP con los conjuntos de funciones base 6-31G\* y 6-311++G\*\* que permitieron tener en cuenta, de manera adecuada, los requerimientos de correlación electrónica en los cálculos, tanto de las geometrías como de las energías conformacionales, así como en el análisis de las curvas de energía potencial para las rotaciones internas posibles de los compuestos estudiados.

Las estructuras iniciales de las dos series de compuestos estudiadas fueron modeladas con el programa *GaussView 5.0* y luego optimizadas empleando DFT. Además, se predijeron las propiedades estructurales y vibracionales para los tres conformeros más estables de 2,4-D en solución de acetona. El efecto del solvente se estudió usando el Método de Campo de Reacción Auto Consistente (SCRF) con el Modelo del Polarizado Continuo (PCM).

Con el fin de analizar las energías de las posibles conformaciones y los parámetros geométricos en los diferentes medios, así como también la magnitud de las interacciones intramoleculares, se calcularon los orbitales naturales de enlace con el programa NBO 3.1 y las propiedades topológicas usando la teoría de Bader de átomos en moléculas (AIM) y el programa AIM 2000. Los cálculos de los potenciales electrostáticos derivados de las cargas de Merz-Singh-Kollman, nos permitieron determinar los mapas de superficie de potenciales electrostáticos, con los cuales pudimos predecir las reactividades y los posibles sitios nucleofílicos y electrofílicos de reacción.

Se registraron los espectros de Infrarrojo y Raman mediante las técnicas por Transformada de Fourier en fase sólida (en solución de acetona sólo el compuesto 2,4-D) y luego fueron comparados con los correspondientes espectros teóricos a fin de realizar las asignaciones de las bandas observadas experimentalmente a los modos normales de vibración esperados. Mediante la combinación de cálculos DFT con la metodología del campo de fuerza mecánico cuántico escalado (SQMFF) de Pulay a nivel de teoría B3LYP/6-31G\* y el uso del programa

MOLVIB, se logró ajustar lo mejor posible las frecuencias teóricas a las experimentales, tomando en cuenta las frecuencias e intensidades observadas en los espectros experimentales de IR y de Raman.

Se hizo la comparación de los resultados teóricos con los experimentales y se analizaron las desviaciones estándar (RMSD) de los parámetros geométricos y de las frecuencias calculadas con respecto a los correspondientes valores experimentales. De este modo se determinó el método y el conjunto de funciones base que genera menor error y, por tanto, la aproximación teórica que mejor se ajustaría a los datos experimentales y, supuestamente, al comportamiento real de la molécula. Asimismo, se logró la asignación completa de todos los modos normales de vibración a las bandas observadas experimentalmente.

Además, se determinaron las constantes de fuerza armónicas de todos los modos de estiramiento y de deformación, reportándose para todos los casos, sólo algunos de los valores obtenidos.

El estudio de las propiedades moleculares, electrostáticas, espectroscópicas y reactividades de las series de compuestos estudiadas permitió predecir el comportamiento de los mismos y la relación entre sus estructuras, propiedades y las principales diferencias que presentan en sus actividades biológicas.

Finalmente, se realizó una comparación de todos los resultados obtenidos para cada serie de compuestos (propiedades moleculares, reactividades, frecuencias armónicas y campos de fuerzas moleculares), a fin de encontrar las principales diferencias entre estas moléculas con actividades biológicas tan opuestas.

## **CONCLUSIONES**

### ***IX.1 DERIVADOS CON PROPIEDADES DE INTERÉS FARMACOLÓGICO***

Al comparar la diferencia energética GAP predicha con el conjunto de funciones base 6-31G\* de la serie de derivados con interés farmacológico, se encontró el mismo orden decreciente de reactividad al introducir el sustituyente en (A3): derivado NO<sub>2</sub> > derivado Cl > derivado CHa, siendo los derivados benzoxazines más reactivos, excepto en el caso del derivado NFB cuya reactividad es menor que la de NFQ. Este resultado podría justificarse por la menor energía observada en el orbital HOMO de NFQ. La menor reactividad de los derivados quinazolínicos podría estar relacionada con la formación de nuevos RCPs y BCPs que estabilizarían a estos derivados.

Las comparaciones de los valores de electrofilicidad y potenciales químicos entre derivados quinazolínicos y benzoxazinas muestran mayores valores para los derivados

benzoxazinas, en particular el derivado NFB. Este resultado se atribuye al fuerte carácter desactivante del grupo NO<sub>2</sub>.

## **IX-2. DERIVADOS CON CARACTERÍSTICAS TOXICOLÓGICAS**

Las comparaciones de los valores GAP para la serie de derivados con características toxicológicas predichos con el conjunto de funciones base 6-31G\*, presentan el siguiente orden creciente de reactividad: HCB < 2,4-D (C3) < TCABO (*Trans* I) < TCAB (*Cis* II). La menor reactividad de HCB, en relación a TCAB, podría ser justificada claramente por el mayor valor energético de su orbital HOMO.

Las comparaciones de los valores de electrofilicidad, nucleofilicidad y potenciales químicos de los derivados toxicológicos muestran mayores valores para el derivado TCABO (*Trans* I). Estas propiedades se justifican debido a su estructura planar y a la proximidad de los átomos de cloro con el enlace N=O.

Para el compuesto HCB, se presenta una mayor estabilidad y esto justificaría su presencia en el medio ambiente.

### **Referencias**

1. Castillo M.V., Romano E., Raschi A.B., Yurquina A., Brandán S.A. Structural study and vibrational spectra of 3-amino-2-(4-chloro-phenyl) quinazolin-4(3*H*)-one. *Computational and Theoretical Chemistry* 2012; 995: 43-48.
2. Castillo M.V., Romano E., Argañaraz G.R., Rudyk R.A., Brandán S.A. *Theoretical Structural and Vibrational Investigation on the 2-(4-chlorophenyl) -4*H*-3,1-benzoxazin-4-one compound. Structural Analysis and Modelling: Research and Development*. Edited Collection, Nova Science Publishers, Inc. Editors: Yucheng Liu, Chapter 1; 2013. ISBN: 978-1-62618-674-3.
3. Castillo M.V., Pergomet J.L., Carnavale G.A., Davies L., Zinczuk J., Brandán S.A. A complete vibrational study on a potential environmental toxicant agent, the 3,3',4,4'-tetrachloroazobenzene combining the FTIR, FT Raman, UV-Visible and NMR spectroscopies with DFT calculations. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2015; 134: 577586.
4. Castillo M.V., Manzur M.E., Di Marco L., Runco V., Brandán S.A. *Structural and vibrational study of a powerful environmental pollutant agent, the hexachlorobenzene compound. Descriptors, Structural and spectroscopic Properties of Heterocyclic derivatives of importance for the health and the environmental*. Edited Collection, Nova Science Publishers, Inc. Editors: Brandán S.A., Chapter 7; 2015. ISBN: 978-1-63482-708-9.
5. Castillo M.V., Manzur M.E., Di Marco L., Davies L., Runco V., Brandán S.A. *Vibrational study of 2,4 dichlorophenoxy acetic acid in acetone solution. Descriptors, Structural and spectroscopic Properties of Heterocyclic derivatives of importance for the health and the environmental*. Edited Collection, Nova Science Publishers, Inc. Editors: Silvia A. Brandán, Chapter 8; 2015. ISBN: 978-1-63482-708-9.

6. Castillo M.V., Romano E., Raschi A.B., Brandán S.A. *Structural and Vibrational Investigation on a Benzoxazin Derivative with Potential Antibacterial Activity. Frontiers in*

*Computational Chemistry*. Vol. 2. Editors: Zaheer Ul-Haq and Jeffry D. Madura (Eds). Bentham Science Publishers. Inc.; 2015. ISBN: 978-1-60805-978-2.

7. Castillo M.V., Davies L., Brandán S.A. Analysis of the structure and the FT-IR and Raman spectra of 2-(4-nitro-phenyl)-4*H*-3,1-benzoxazin-4-one. Comparisons with the chlorinated and methylated derivatives. *Journal of Molecular Structure* 2017; 1140: 2-11.

8. Castillo M.V., Pergomet J.L., Carnavale G.A., Davies L., Zinzuk J., Brandán S.A. FTIR, FTRaman, UV-Visible and NMR Spectroscopic studies on 3,3',4,4'-tetrachloroazoxybenzene, an Azoxybenzene derivative with toxic effects. *Journal of Molecular Structure* 2017; 1142: 18-27.

-

## **Structural and spectroscopic study of nitrogenated and chlorinated benzene derivatives with antagonical biological activities**

In this Ph. D. Thesis, the structural and spectroscopic, experimental and theoretical study of two series of compounds with totally antagonistic biological activities was carried out. The compounds of each series are nitrogenous and chlorinated benzene derivatives. The first series is made up of two groups, the first group contains three derivatives of the quinazolin nucleus (A): I) 3-amino-2-(4-chlorophenyl) quinazolin-4(3*H*)-one, II) 3-amino-2-(4-methylphenyl) quinazolin-4(3*H*)-one, and III) 3-amino-2-(4-nitrophenyl) quinazolin-4(3*H*)-one, while the second group is formed by three derivatives of the benzoxazin nucleus (B): I) 2-(4-chlorophenyl)-4*H*-3,1-benzoxazin-4-one, II) 2-(4-methylphenyl)-4*H*-3,1-benzoxazin-4-one, and III) 2-(4-nitrophenyl)-4*H*-3,1-benzoxazin-4-one. On the other hand, the second series considers the following benzene derivatives: hexachlorobenzene, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 3,3',4,4'-tetrachloroazobenzene (TCAB), and 3,3',4,4'-tetrachloroazoxybenzene (TCABO). In addition, the study of the behavior in solution of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in acetone was carried out.

Compounds that contain benzene nuclei in their structures show very diverse properties depending on the number and nature of the different substituent groups. Both benzene and its derivatives have been used in countless syntheses, as intermediate and/or final products, and are widely studied from different points of view.

The syntheses and structural and vibrational studies of various nitrogenous or chlorinated benzene compounds, with quinazoline or benzoxazin nuclei in their structures (such as the compounds proposed in the first series), are of great chemical, biochemical and pharmacological interest since they produce numerous and interesting biological effects in

the human body. The 3*H*-quinazolin-4-ones and 4*H*-3,1-benzoxazin-4-ones are core structural subunits that exist in a number of bioactive natural products. The 3*H*-quinazolin-4-ones exhibit a wide spectrum of biological and pharmaceutical activities, which make them widely used in antihypertensive, antidiabetic, anti-inflammatory, antibacterial, anticonvulsant, antitumor therapies, as a central nervous system (CNS) depressant, and diuretics. Similarly, 2-substituted-4*H*-3,1-benzoxazin-4-ones behave as chymotrypsin inactivators, human leukocyte elastase and serine protease inhibitors.

On the other hand, the compounds of the second series exhibit toxicological characteristics that influence human metabolism and potential biodegradation by soil microorganisms. Some of these compounds have low toxicity, but others are highly toxic. In the case of azo and azoxy benzene derivatives, I. J. Badovinac *et al.* reported that they show photochemical and physical properties, which is why these derivatives are widely used in multiple applications from an industrial point of view.

To date, the biological effects that both series of compounds produce in the body are known, but the mechanisms of the therapeutic effects, in the first group, or the toxicological effects, in the second, are still unknown.

In recent years, only for some of the compounds studied, the crystalline and molecular structures were determined experimentally. For the compounds of the first series to be studied, the quinazolin and benzoxazin derivatives, the synthesis and characterization by nuclear magnetic resonance (NMR) and Infrared spectroscopy, and mass spectrometry were reported by Rai *et al.* Until now, the crystalline and molecular structures of these compounds have not been determined and there are no theoretical studies on their geometries and the assignments of their vibrational spectra. However, for similar compounds such as 3-amino-2-phenylquinazolin-4(3*H*)-one, there are theoretical studies at the B3LYP/6-31G\* level, reported by Panicker *et al.*, with the complete assignment of the bands in the vibrational spectra and, furthermore, for the compound 2-phenyl-4*H*-3,1-benzoxazin-4-one, Ambujakshan *et al.* reported the vibrational study together with theoretical calculations.

With respect to the compounds of the second series, only the main characteristics of the solid phase Raman spectrum were recently reported for hexachlorobenzene by Zhang *et al.*, who recorded the corresponding FT-Raman spectrum and identified the main functional groups of the compound. In that study, the Raman spectrum simulation was carried out using the B3LYP/Lanl2dz method.

The refinement of the crystal structure of phenoxyacetic acid was published by Colin H. L. Kennard, while the structural studies of 2-chlorophenoxyacetic and 4-chlorophenoxyacetic

acids were carried out by X-ray methods by different authors.

A theoretical study on the molecular structure and partial vibrational assignments of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in the gas phase was reported by Badawi *et al.* In this study, the authors reported eight theoretical structures along with a partial vibrational assignment, taking into account the non-planar *Cgcpp* structure (*C* = *cis*, *g* = *gauche*, and *pp* = *perpendicular*) using the B3LYP/6-311G\*\* level of calculations and the GaussView 5.0 program. However, the SQMFF methodology was not used to make the corresponding band assignments in the vibrational spectra and, furthermore, the corresponding force field was not reported.

Computational studies on surface potential energy (SEP), excited electronic states, the use of quantitative structure-property relationship (QSPR), artificial neural network (ANN) along with photoisomerization of azobenzene compounds and their derivatives were already published by G. Chilaya *et al.* However, the vibrational spectra of TCAB remain unassigned. On the other hand, azoxy derivatives have geometric isomers, known as *Cis* and *Trans* configurations, whose isomerization mechanisms were studied by different authors, and their *Trans* structures were determined for some derivatives by X-rays.

Due to the wide spectrum of uses and importance of both series of compounds, the present Ph. D. Thesis was aimed at experimental and theoretical research, combining spectroscopic methods with theoretical calculations derived from quantum mechanics.

In principle, the characterizations of the compounds hexachlorobenzene (HCB) and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) were carried out using infrared and Raman spectroscopy in the aggregation states in which they were possible, with equipment belonging to the Technical Services of the Research Institute for the Chemical Industry (Instituto de Investigaciones para la Industria Química: INIQUI, CONICET) of the National University of Salta. Then, the studies were continued with the benzene compounds of the first series. All of them are commercial compounds of high purity.

Subsequently, the syntheses of the azo and azoxy benzene compounds were carried out in collaboration with Dr. Juan Zinzuk from the Rosario Chemistry Institute (Instituto de Química Rosario: IQIR-CONICET) of the National University of Rosario, Santa Fe, who has extensive experience in the area of organic synthesis. The synthesized compounds were characterized by NMR spectroscopy in deuterated chloroform solution, mass spectrometry, and infrared, Raman and UV-Visible absorption spectra.

The experimental studies were completed with theoretical calculations using methods



derived from Density Functional Theory (DFT) with different functionals and sets of basis functions using the Gaussian 09 set of programs. On this occasion, the hybrid B3LYP method was used with the sets of basis functions 6-31G\* and 6-311++G\*\* that allowed the electronic correlation requirements to be adequately taken into account in the calculations, both of the geometries and the conformational energies, as well as in the analysis of the potential energy curves for the possible internal rotations of the compounds studied.

The initial structures of the two series of compounds studied were modeled with the GaussView 5.0 program and then optimized using DFT. Furthermore, the structural and vibrational properties were predicted for the three most stable conformers of 2,4-D in acetone solution. The effect of the solvent was studied using the Self Consistent Reaction Field Method (SCRF) with the Polarized Continuous Model (PCM).

In order to analyze the energies of the possible conformations and the geometric parameters in the different media, as well as the magnitude of the intramolecular interactions, the natural bonding orbitals were calculated with the NBO 3.1 program and the topological properties using the theory of Bader of atoms in molecules (AIM) and the AIM 2000 program. The calculations of the electrostatic potentials derived from the Merz-Singh-Kollman charges allowed us to determine the surface maps of electrostatic potentials, with which we could predict the reactivities and the possible nucleophilic and electrophilic reaction sites.

Infrared and Raman spectra were recorded using Fourier Transform techniques in solid phase (in acetone solution only 2,4-D) and then they were compared with the corresponding theoretical spectra in order to carry out band assignments at the expected normal modes of vibration. By combining DFT calculations with the Pulay scaled quantum mechanical force field (SQMFF) methodology at the B3LYP/6-31G\* theory level and the use of the MOLVIB program, it was possible to adjust the theoretical frequencies to the experimental ones as best as possible, taking into account the frequencies and intensities observed in the experimental IR and Raman spectra.

The theoretical results were compared with the experimental ones and the standard deviations (RMSD) of the geometric parameters and the calculated frequencies were analyzed with respect to the corresponding experimental values. Therefore, the method and the set of base functions that generate the least error were determined and, therefore, the theoretical approach that would best fit the experimental data and, supposedly, the real behavior of the molecule. Likewise, the complete assignment of all normal vibration modes

to the experimentally observed bands was achieved.

Furthermore, the harmonic force constants of all stretching and deformation modes were determined, reporting only some of the values obtained for all cases.

The study of the molecular, electrostatic, spectroscopic properties and reactivities of the series of compounds studied allowed us to predict their behavior and the relationship between their structures, properties and the main differences they show in their biological activities.

Finally, a comparison was performed of all the results for each series of compounds (molecular properties, reactivities, harmonic frequencies and molecular force fields), in order to find the main differences between these molecules with such opposite biological activities.

## CONCLUSIONS

### ***IX.1 DERIVATIVES WITH PROPERTIES OF PHARMACOLOGICAL INTEREST***

When comparing the predicted GAP energy difference with the 6-31G\* set of basis functions of the series of derivatives with pharmacological interest, the same decreasing order of reactivity was found when introducing the substituent in (A3): NO<sub>2</sub> derivative > Cl derivative > CHa derivative, the benzoxazines derivatives being more reactive, except in the case of the NFB derivative whose reactivity is lower than that of NFQ. This result could be justified by the lower energy observed in the HOMO orbital of NFQ. The lower reactivity of quinazoline derivatives could be related to the formation of new RCPs and BCPs that would stabilize these derivatives.

Comparisons of electrophilicity values and chemical potentials between quinazoline derivatives and benzoxazines show higher values for the benzoxazine derivatives, in particular the NFB derivative. This result is attributed to the strong deactivating character of the NO<sub>2</sub> group.

### ***IX-2. DERIVATIVES WITH TOXICOLOGICAL CHARACTERISTICS***

Comparisons of the GAP values for the series of derivatives with toxicological characteristics predicted with the 6-31G\* set of base functions, show the following increasing order of reactivity: HCB < 2,4-D (C3) < TCABO (*Trans* I) < TCAB (*Cis* II). The lower reactivity of HCB, in relation to TCAB, could be clearly justified by the higher energy value of its HOMO orbital.

Comparisons of the values of electrophilicity, nucleophilicity and chemical potentials of the toxicological derivatives show higher values for the TCABO derivative (*Trans* I). These

properties are justified due to its planar structure and the proximity of the chlorine atoms to the N=O bond.

For the HCB compound, there is greater stability and this would justify its presence in the environment.

## References

1. Castillo M.V., Romano E., Raschi A.B., Yurquina A., Brandán S.A. Structural study and vibrational spectra of 3-amino-2-(4-chloro-phenyl) quinazolin-4(3H)-one. *Computational and Theoretical Chemistry* 2012; 995: 43-48.
2. Castillo M.V., Romano E., Argañaraz G.R., Rudyk R.A., Brandán S.A. *Theoretical Structural and Vibrational Investigation on the 2-(4-chlorophenyl)-4H-3,1-benzoxazin-4-one compound. Structural Analysis and Modelling: Research and Development*. Edited Collection, Nova Science Publishers, Inc. Editors: Yucheng Liu, Chapter 1; 2013. ISBN: 978-1-62618-674-3.
3. Castillo M.V., Pergomet J.L., Carnavale G.A., Davies L., Zinzuk J., Brandán S.A. A complete vibrational study on a potential environmental toxicant agent, the 3,3',4,4'-tetrachloroazobenzene combining the FTIR, FT Raman, UV-Visible and NMR spectroscopies with DFT calculations. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2015; 134: 577586.
4. Castillo M.V., Manzur M.E., Di Marco L., Runco V., Brandán S.A. *Structural and vibrational study of a powerful environmental pollutant agent, the hexachlorobenzene compound. Descriptors, Structural and spectroscopic Properties of Heterocyclic derivatives of importance for the health and the environmental*. Edited Collection, Nova Science Publishers, Inc. Editors: Brandán S.A., Chapter 7; 2015. ISBN: 978-1-63482-708-9.
5. Castillo M.V., Manzur M.E., Di Marco L., Davies L., Runco V., Brandán S.A. *Vibrational study of 2,4 dichlorophenoxy acetic acid in acetone solution. Descriptors, Structural and spectroscopic Properties of Heterocyclic derivatives of importance for the health and the environmental*. Edited Collection, Nova Science Publishers, Inc. Editors: Silvia A. Brandán, Chapter 8; 2015. ISBN: 978-1-63482-708-9.
6. Castillo M.V., Romano E., Raschi A.B., Brandán S.A. *Structural and Vibrational Investigation on a Benzoxazin Derivative with Potential Antibacterial Activity. Frontiers in Computational Chemistry*. Vol. 2. Editors: Zaheer Ul-Haq and Jeffry D. Madura (Eds). Bentham Science Publishers. Inc.; 2015. ISBN: 978-1-60805-978-2.
7. Castillo M.V., Davies L., Brandán S.A. Analysis of the structure and the FT-IR and Raman spectra of 2-(4-nitro-phenyl)-4H-3,1-benzoxazin-4-one. Comparisons with the chlorinated and methylated derivatives. *Journal of Molecular Structure* 2017; 1140: 2-11.
8. Castillo M.V., Pergomet J.L., Carnavale G.A., Davies L., Zinzuk J., Brandán S.A. FTIR, FTRaman, UV-Visible and NMR Spectroscopic studies on 3,3',4,4'-tetrachloroazoxybenzene, an Azoxybenzene derivative with toxic effects. *Journal of Molecular Structure* 2017; 1142: 18-27.

--

**Estructura y espectroscopia de agregados iónicos entre cationes (protón y metálicos) y moléculas de interés biológico:  
Espectroscopía de disociación multifotónica IR de agregados iónicos entre las bases del ADN y H<sup>+</sup>, Ag<sup>+</sup> y Ba<sup>2+</sup>**

Andrés Felipe Cruz Ortiz

Tesis de Doctorado para optar al grado académico superior de Doctor en Ciencias Químicas – Premio AQA: “Dr. Enrique Herrero Ducloux 2023”. Director de Tesis: Prof. Dr. Gustavo A. Pino.

Centro láser de Ciencias Moleculares, Instituto de Investigaciones en Fisicoquímica de Córdoba [INFIQC (CONICET-UNC)], Departamento de Fisicoquímica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.  
Email: andres.cruz@unc.edu.ar

*Recibido: 29 de septiembre de 2023*

*Aceptado: 30 de octubre de 2023*

---

Las interacciones intermoleculares entre las bases del ADN desempeñan un papel fundamental en la formación y estabilización de la estructura de doble hélice del ADN. En particular, las interacciones por puente de hidrógeno son responsables del reconocimiento molecular entre las bases de ADN, por lo que cada base en su forma canónica interactúa específicamente con su base complementaria, es decir, citosina (C) con guanina (G) y adenina (A) con timina (T) (C≡G y A=T), formando pares de bases *canónicos*, formalmente conocidos como pares de Watson-Crick (WC).

La interacción entre cationes metálicos y/o (H<sup>+</sup>) y bases del ADN puede inducir cambios en las propiedades estructurales y electrónicas que afectan desde el plegamiento macromolecular hasta el reconocimiento base—base siendo aspectos de gran interés tanto desde el punto de vista de la investigación básica como para el desarrollo de futuras aplicaciones tecnológicas. Por otro lado, gracias a la flexibilidad estructural del ADN, puede presentar propiedades estructurales muy diversas, con un amplio abanico de potenciales aplicaciones en el campo de la nanotecnología y biomedicina. Resulta intrigante conocer las propiedades estructurales de estos sistemas. Sin embargo todavía no se conoce el mecanismo molecular que regula la formación y estabilización de este tipo de estructuras.

El objetivo central de esta Tesis Doctoral fue estudiar cómo la interacción con diferentes átomos y cationes permite estabilizar apareamientos y plegamientos no canónicos en el ADN y cómo

dicha interacción determina las propiedades estructurales de los agregados generados. Para obtener información molecular detallada acerca del problema planteado, se eligieron sistemas modelo, simplificados y factibles de ser estudiados en fase gaseosa, aislados y mediante técnicas de espectroscopía láser. De tal forma que los resultados obtenidos constituyan un punto de partida que permitan avanzar en el estudio del problema planteado, desde un enfoque *bottom-up* aumentando la complejidad del modelo empleado. En este contexto, los sistemas químicos más relevantes empleados fueron las bases del ADN, interaccionando con  $H^+$ ,  $Ag^+$  y  $Ba^{2+}$ . Para obtener información acerca de la estructura de los agregados estudiados se utilizó la espectrometría de masa en tándem (MS/MS), espectroscopía de disociación multifotónica IR, en complemento con cálculos de estructura electrónica a nivel DFT.

Cinco publicaciones en revistas internacionales revisadas por pares fueron el producto del desarrollo de esta Tesis Doctoral, siendo el tesista el primer autor. En uno de estos trabajos, publicado en el prestigioso *Journal of Physical Chemistry Letters*, se reveló por primera vez la estructura de los pares de bases de Hoogsteen y Watson-Crick en fase gaseosa, y también los autores descubrieron que su población depende significativamente del pH de la solución. Además, el tesista fue mentor de dos estudiantes de doctorado y coautor de dos artículos adicionales.

--

**Structure and spectroscopy of ionic aggregates between cations (proton and metallic) and molecules of biological interest:  
IR multiphoton dissociation spectroscopy of ionic aggregates between DNA bases and  $H^+$ ,  $Ag^+$ , and  $Ba^{2+}$**

Intermolecular interactions between DNA bases play a critical role in the formation and stabilization of the DNA double helix structure. In particular, hydrogen bond interactions are responsible for molecular recognition between DNA bases, whereby each base in its canonical form interacts specifically with its complementary base, that is, cytosine (C) with guanine (G) and adenine (A) with thymine (T) ( $C\equiv G$  and  $A=T$ ), forming *canonical* base pairs, formally known as Watson-Crick (WC) pairs.

The interaction between metal cations and/or ( $H^+$ ) and DNA bases can induce changes in the structural and electronic properties that affect from macromolecular folding to base–base recognition, being aspects of great interest both from the point of view of basic research as well as for the development of future technological applications. On the other hand, thanks to the DNA structural flexibility, very diverse structural properties are expected, with a wide range of potential applications in the field of nanotechnology and biomedicine. It is intriguing to know the structural properties of these systems. However, the molecular mechanism that regulates the formation and stabilization of this type of structures is still not known.

The central aim of this Ph. D. Thesis was to study how the interaction with different atoms and cations allows stabilizing non-canonical pairings and foldings in DNA and how this interaction determines the structural properties of the generated aggregates. To obtain detailed molecular information about the problem posed, model systems were chosen, simplified and feasible to be studied in the gas phase, isolated and using laser spectroscopy techniques. In such a way that the results obtained constitute a starting point that allows progress in the study of the problem posed, from a *bottom-up* approach, increasing the complexity of the model used. In this context, the most relevant chemical systems used were the DNA bases, interacting with  $H^+$ ,  $Ag^+$  and  $Ba^{2+}$ . To obtain information about the structure of the studied aggregates, tandem mass spectrometry (MS/MS), IR multiphoton dissociation spectroscopy, was used in addition to electronic structure calculations at the DFT level.

Five publications in international peer-reviewed journals were the product of the development of this Doctoral Thesis, with the thesis student being the first author. In one of these works, published in the prestigious *Journal of Physical Chemistry Letters*, the structure of the Hoogsteen and Watson-Crick base pairs in the gas phase was revealed for the first time, and the authors also discovered that their population depends significantly on the pH of the solution. In addition, the thesis student was a mentor to two doctoral students and co-author of two additional articles.

**Drogas vegetales empleadas como analgésicas y anti-inflamatorias en la  
medicina tradicional.  
Validación científica de su efecto terapéutico.**

Micaela Paula Del Gaudio

Tesis de Doctorado para optar al grado académico superior de Doctor en Ciencias Químicas. –  
Premio AQA: “Dr. Luis Guglielmelli 2023” (Área: Química Orgánica y Bio-Orgánica).  
Directora: Prof. Dra. María Gabriela Ortega.

Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV-CONICET), Departamento de Ciencias  
Farmacéuticas, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.  
Email: [mdelgaudio@fcq.unc.edu.ar](mailto:mdelgaudio@fcq.unc.edu.ar); [micaeladelgaudio@gmail.com](mailto:micaeladelgaudio@gmail.com)

Recibido: 28 de septiembre de 2023

Aceptado: 30 de octubre de 2023

---

Las plantas constituyen un recurso valioso en los sistemas de salud de los países en desarrollo. Acorde a informes de la Organización Mundial de la Salud (OMS), se sabe que más del 80% de la población mundial utiliza, rutinariamente, la medicina tradicional para satisfacer sus necesidades de atención primaria de salud.

Con el fin de validar el efecto analgésico y antiinflamatorio atribuido por la medicina popular, se planteó estudiar los extractos acuosos obtenidos de 6 especies vegetales autóctonas: *Berberis ruscifolia* Lam., *Jodina rhombifolia* (Hook. & Arn.) Reissek, *Modiolastrum malvifolium* (Griseb.) K. Schum, *Sphaeralcea bonariensis* (Cav.) Griseb, *Araujia odorata* (Hook & Arn.) Fontella y Goyder y *Schinus fasciculata* (Griseb.) I.M. Johnst.

El efecto antiinflamatorio se evaluó en líneas celulares derivadas de macrófagos de ratón J774A.1 y el efecto analgésico fue estudiado mediante experimentos *in vivo* en ratones albinos machos, cepa suizo ICR.

Los extractos acuosos de las 6 especies propuestas, fueron evaluados como inhibidores de óxido nítrico (NO), mostrando una interesante actividad, la infusión y la decocción obtenidas de la especie *B. ruscifolia*. Por tal motivo, se continuaron los estudios con los extractos acuosos de dicha especie en líneas celulares, incorporando el extracto etanólico en este estudio, ya que mostró una importante inhibición sobre el NO relacionada a la inhibición proteica de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS).

Con respecto al efecto analgésico *in vivo*, la infusión, decocción y el extracto etanólico de *B. ruscifolia* presentaron inhibición nociceptiva evaluada mediante el test de inducción de contorsiones por ácido acético y el test de formalina, siendo el extracto etanólico el más activo.

El estudio químico de los extractos de esta especie fue realizado, demostrando la presencia del alcaloide berberina, en los tres extractos, con un contenido mayor en el extracto etanólico. Por lo tanto, se ensayó berberina para determinar su efecto antiinflamatorio y analgésico.

La berberina demostró inhibir la producción de NO mediada por una disminución de la iNOS en el modelo de líneas celulares y mostró ser más activa que el extracto etanólico en los modelos evaluados *in vivo*.

Esto impulsó a indagar sobre el mecanismo de acción de su actividad, evaluada *in vivo*. La berberina produjo un efecto antinociceptivo mediado por la inhibición de las vías del dolor activadas por histamina, prostaglandina E<sub>2</sub>, bradicinina, cinamaldehído y capsaicina. Además, se demostró que la inhibición de las distintas vías de dolor producida por berberina, se debe en parte a la inhibición de la proteína quinasa A y proteína quinasa C, las cuales, a nivel intracelular intervienen en la transmisión nociceptiva.

Por lo tanto, se pudo demostrar que los extractos de *B. ruscifolia* ejercen actividad antiinflamatoria en líneas celulares y actividad analgésica *in vivo*, donde dicho efecto terapéutico se debe al menos en parte, al alcaloide berberina, validando así la eficacia de la especie *B. ruscifolia*, reportada en la medicina tradicional como analgésica y antiinflamatoria.

--

### **Plant Drugs Used as Analgesics and Anti-Inflammatory Agents in Traditional Medicine. Scientific Validation of the Therapeutic Effect**

Plants are a valuable resource in health systems in developing countries. According to reports from the World Health Organization (WHO), it is known that more than 80% of the world's population routinely uses traditional medicine to provide their primary health care needs.

In order to validate the analgesic and anti-inflammatory effect attributed by folk medicine, the aqueous extracts obtained from six autochthonous plant species: *Berberis ruscifolia* Lam., *Jodina rhombifolia* (Hook. & Arn.) Reissek, *Modiolastrum malvifolium* (Griseb.) K. Schum, *Sphaeralcea bonariensis* (Cav.) Griseb, *Araujia odorata* (Hook & Arn.) Fontella and Goyder, and *Schinus fasciculate* (Griseb.) IM Johnst, were studied.



The anti-inflammatory effect was evaluated in J774A.1 mouse macrophages cell lines and the analgesic effect was studied by *in vivo* experiments in male albino mice, swiss ICR strain.

The aqueous extracts of the 6 proposed species were evaluated as nitric oxide (NO) inhibitors, showing an interesting activity the infusion and decoction of *B. ruscifolia* species. For this reason, the studies of these aqueous extracts in cell lines were continued, incorporating the ethanolic extract, which showed an important NO inhibition related to the decrease of inducible nitric oxide synthase (iNOS) enzyme.

Regarding the analgesic effect *in vivo*, the infusion, decoction and ethanolic extract of *B. ruscifolia* showed nociceptive inhibition by contortions induction by acetic acid and the formalin tests, being the ethanolic extract the most active.

The chemical study of the extracts of this species was carried out, demonstrating the presence of the alkaloid berberine, in the three extracts, with a higher content in the ethanolic extract. Therefore, berberine was tested for its anti-inflammatory and analgesic effect.

Berberine was shown to inhibit NO production mediated by a decrease in iNOS in the cell line model and was shown to be more active than the ethanolic extract in the models evaluated *in vivo*.

This prompted us to investigate the mechanism of action of its activity, evaluated *in vivo*. Berberine produced an antinociceptive effect mediated by inhibition of pain pathways activated by histamine, prostaglandin E2, bradykinin, cinnamaldehyde, and capsaicin. In addition, it was shown that the inhibition of the different pain pathways produced by berberine is due in part to the inhibition of protein kinase A and protein kinase C, which, at the intracellular level, are involved in nociceptive transmission.

Therefore, the anti-inflammatory activity in cell lines and analgesic activity *in vivo* were demonstrated for *B. ruscifolia* extracts, being said therapeutic effect, at least in part, due to the berberine alkaloid, thus validating the efficacy of the *B. ruscifolia* species, reported as analgesic and anti-inflammatory in traditional medicine.

## Estudio térmico y fotoquímico de nuevas sulfonas derivadas de dihidropiridinas

Guadalupe Firpo

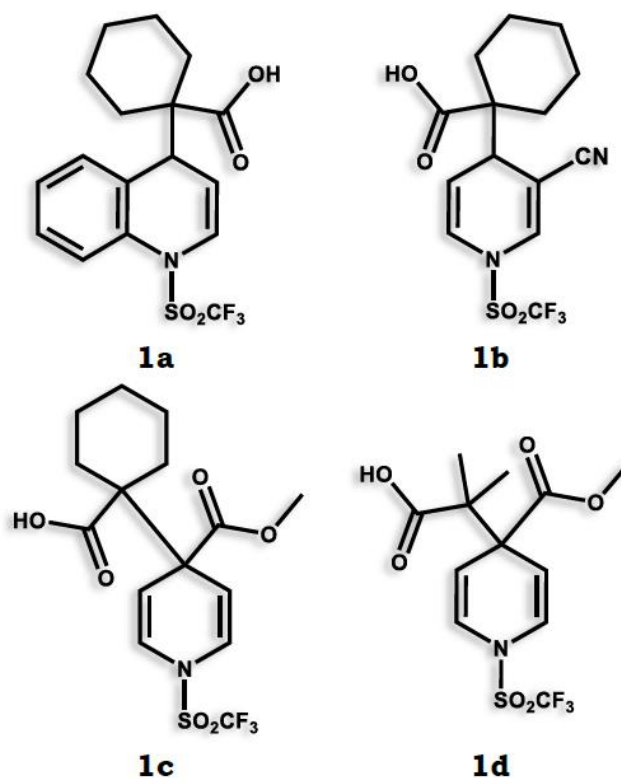
Tesis de Doctorado para optar al grado académico superior de Doctor en Ciencias Químicas – Premio AQA: “Dr. Enrique Herrero Ducloux 2023”. Dirección: Prof. Dr. Walter J. Peláez.

Instituto de Investigaciones en Fisicoquímica de Córdoba (INFIQC-CONICET),  
Departamento de Fisicoquímica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. e-mails: gfirmo@unc.edu.ar; gu.firpo@gmail.com

Recibido: 28 de septiembre de 2023

Aceptado: 30 de octubre de 2023

En el presente trabajo de tesis doctoral se informan los resultados obtenidos del estudio térmico y fotoquímico de cuatro dihidropiridinas: **1a**, **1b**, **1c** y **1d** sintetizadas por el grupo de investigación del Dr. Cecilio Álvarez-Toledano (UNAM) y exhibidas en la **Figura 1**.



**Figura 1:** Estructuras de las dihidropiridinas estudiadas en la tesis doctoral.

La presentación de los resultados en este trabajo de tesis doctoral se organizó en cuatro capítulos como indica el **Esquema 1**. El contenido de cada uno se desarrolla brevemente a continuación.

<b>Capítulo 1</b>	<b>Estudio térmico y fotoquímico de nuevas sulfonas derivadas de dihidroquinolina y dihidropiridina</b>	Fotólisis en solución a 254nm Termólisis estática en fase gaseosa (TEG) Termólisis inducida por microondas (MIP)
<b>Capítulo 2</b>	<b>Estudio térmico de dihidropiridinas en sistema estático, homogéneo y heterogéneo</b>	Termólisis estática en fase gaseosa Reacciones heterogéneas con zeolitas ácidas
<b>Capítulo 3</b>	<b>Identificación de productos de control cinético en reacciones de Flash Vacuum Pyrolysis</b>	Termólisis dinámica en fase gaseosa: <i>flash vacuum pyrolysis</i> (FVP) Productos de control cinético y termodinámico
<b>Capítulo 4</b>	<b>Evaluación del potencial antioxidante en dihidropiridinas por ensayo con DPPH*</b>	Ensayo antioxidante <i>in vitro</i> con 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH*) Análisis cinético y estequiométrico de reacción

**Esquema 1:** Contenidos de la presente Tesis Doctoral.

El primer capítulo presenta el estudio exhaustivo de la estabilidad térmica y fotoquímica de las dihidropiridinas **1a** y **1b**. Para ello se empleó la fotólisis en solución a 254 nm, la termólisis estática en fase gaseosa (TEG) y la termólisis inducida por microondas (TIM). Para las fotólisis, primero se realizó un estudio experimental y computacional detallado de las propiedades ópticas de **1a** y **1b**, a fin de determinar la naturaleza de sus transiciones electrónicas. Luego, se llevaron a cabo las reacciones fotolíticas seguidas en el tiempo por espectrofotometría UV-Vis, que permitieron estudiar la cinética de cada reacción. Por otro lado, las reacciones térmicas se efectuaron por dos metodologías diferentes, una en donde el reactivo se degradó estando en fase gaseosa (TEG) y otra en donde el calentamiento se generó por radiación de microondas (TIM). Los productos de descomposición se analizaron por CG-EM y RMN-<sup>1</sup>H.

En el Capítulo 2, se analiza la degradación térmica de las dihidropiridinas **1c** y **1d** a través de reacciones TEG en condiciones defase homogénea y heterogénea. Para esta última, se emplearon zeolitas ácidas a las cuales se evaluó su selectividad y capacidad de reutilización. El estudio térmico de estos compuestos mediante reacciones dinámicas en fase gaseosa, bajo

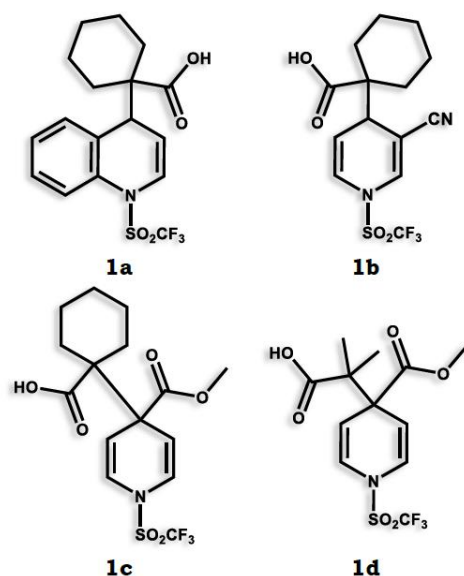
la metodología *flash vacuum pyrolysis* (FVP) se describe en el Capítulo 3. El cotejo de los productos obtenidos por las técnicas descritas en ambos capítulos permitió establecer cuáles son los productos formados por control cinético y cuáles por control termodinámico.

Finalmente, en el último capítulo se presentan los resultados de la determinación de la actividad antioxidante *in vitro* de las dihidropiridinas estudiadas. Para ello, se empleó el ensayo antioxidante *in vitro* de DPPH• que consiste en el seguimiento por espectrofotometría UV-Vis del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH•). Además de determinar la actividad antioxidante, se logró analizar el comportamiento cinético y la estequiometría de la reacción dihidropiridina-DPPH•.

--

### Thermal and photochemical study of new sulfones derived from dihydropyridines

In the present Ph.D. Thesis, the results from the thermal and photochemical study of four dihydropyridines are reported: **1a**, **1b**, **1c** and **1d** synthesized by the research group of Dr. Cecilio Álvarez-Toledano (UNAM) and displayed in **Figure 1**.



**Figure 1:** Structures of the dihydropyridines studied in the Ph. D. Thesis.

The presentation of the results in this Ph. D. Thesis was organized into four chapters as indicated in **Scheme 1**. The content of each one is briefly developed below

<b>Capítulo 1</b>	<b>Estudio térmico y fotoquímico de nuevas sulfonas derivadas de dihidroquinolina y dihidropiridina</b>	Fotólisis en solución a 254nm Termólisis estática en fase gaseosa (TEG) Termólisis inducida por microondas (MIP)
<b>Capítulo 2</b>	<b>Estudio térmico de dihidropiridinas en sistema estático, homogéneo y heterogéneo</b>	Termólisis estática en fase gaseosa Reacciones heterogéneas con zeolitas ácidas
<b>Capítulo 3</b>	<b>Identificación de productos de control cinético en reacciones de Flash Vacuum Pyrolysis</b>	Termólisis dinámica en fase gaseosa: <i>flash vacuum pyrolysis</i> (FVP) Productos de control cinético y termodinámico
<b>Capítulo 4</b>	<b>Evaluación del potencial antioxidante en dihidropiridinas por ensayo con DPPH*</b>	Ensayo antioxidante <i>in vitro</i> con 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH*) Análisis cinético y estequiométrico de reacción

**Scheme 1:** Contents of this Ph. D. Thesis.

The first chapter shows the exhaustive study of the thermal and photochemical stability of the dihydropyridines **1a** and **1b**. Therefore, the photolysis in solution at 254 nm, static thermolysis in the gas phase (TEG) and microwave-induced thermolysis (TIM) were used. For photolyses, a detailed experimental and computational study of the optical properties of **1a** and **1b** was first performed to determine the nature of their electronic transitions. Then, the photolytic reactions followed over time by UV-Vis spectrophotometry were carried out, which allowed the kinetics of each reaction to be studied. On the other hand, the thermal reactions were carried out by two different methodologies, one where the reagent was degraded while in the gas phase (TEG), and another one where the heating was generated by microwave radiation (TIM). The decomposition products were analyzed by GC-MS and <sup>1</sup>H-NMR.

In Chapter 2, the thermal degradation of dihydropyridines **1c** and **1d** through TEG reactions under homogeneous and heterogeneous phase conditions is analyzed. For the latter,

acid zeolites were used, whose selectivity and reuse capacity were evaluated. The thermal study of these compounds through dynamic reactions in the gas phase, under the flash vacuum pyrolysis (FVP) methodology, is described in Chapter 3. The comparison of the products obtained by the techniques described in both chapters allowed us to establish which products are formed by kinetic control and which by thermodynamic control.

Finally, in the last chapter the results of the determination of the *in vitro* antioxidant activity of the dihydropyridines studied are shown. Therefore, the DPPH● *in vitro* antioxidant assay was used, which consists of monitoring the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH●) by UV-Vis spectrophotometry. In addition to determining the antioxidant activity, it was possible to analyze the kinetic behavior and stoichiometry of the dihydropyridine-DPPH● reaction.

--

## **Estudio experimental y teórico de sales trifluorborato de potasio.**

Maximiliano Alberto Iramain

Tesis de Doctorado para optar al grado académico superior de Doctor en Ciencias Químicas – Premio AQA: “Dr. Enrique Herrero Ducloux 2023”. Directora de Tesis: Prof. Dra. Silvia Antonia Brandán.

Instituto de Química Inorgánica, Cátedra de Química General, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, Universidad Nacional de Tucumán. e-mail: miramain9@gmail.com

*Recibido: 11 de julio de 2023*

*Aceptado: 9 de agosto de 2023*

---

En este trabajo de tesis se realizó el estudio de las propiedades estructurales, electrónicas, topológicas y vibracionales de una serie de sales de potasio que contienen el grupo en común trifluorborato, combinando cálculos teóricos derivados de la teoría del funcional de la densidad (DFT) y sus espectros experimentales de Infrarrojo, Raman y Ultravioleta.

Los compuestos estudiados fueron las sales 3-furoil-trifluorborato de potasio, 5-hidroxipentanoil-trifluorborato de potasio, tres compuestos derivados del anillo de piridina, las sales 2-isonicotinoil-trifluorborato de potasio, 6-cloro-2-isonicotinoil-trifluorborato de potasio, 5-bromo-2-isonicotinoil-trifluorborato de potasio, y dos compuestos con un anillo bencénico en común, 2-fenilacetil-trifluorborato de potasio y 4-fluorbenzoil-trifluorborato de potasio.

Esta serie de compuestos presentan gran importancia en química de síntesis, ya que son relativamente fáciles de manipular, gracias a sus propiedades fisicoquímicas y resultan ser intermediarios muy útiles para la síntesis de productos naturales o de componentes básicos en la síntesis orgánica. Además son empleados en el desarrollo de nuevas metodologías para la formación de nuevos enlaces carbono-carbono, carbono-oxígeno, carbono-nitrógeno, y reacciones de formación de enlaces carbono-halógeno.

Se modelaron las estructuras teóricas con el programa *GaussView 5.0*, las cuáles fueron optimizadas con el programa *Gaussian 09*, empleando el método híbrido B3LYP y el conjunto de funciones base 6-311++G\*\*, en fase gaseosa, mientras que las mismas fueron realizadas en solución acuosa empleando el Método del Campo de Reacción Autoconsistente (SCRf) y el Modelo del Polarizado Continuo (PCM).

Se calcularon las estructuras más estables de cada sal, empleando curvas de energía potencial, estudiando la libre rotación de diferentes enlaces que describen importantes ángulos diedros. Se calcularon las energías relativas corregidas por Z.P.V.E, los volúmenes, momentos dipolares y las energías de solvatación corregidas

Se realizaron cálculos de orbitales naturales de enlace, empleando el programa NBO 5.1, para determinar las principales cargas atómicas, órdenes de enlace y energías de deslocalización electrónica, mientras que empleando el programa AIM2000 y la teoría de Bader, se determinaron las propiedades topológicas dependientes de la densidad de carga electrónica, las cuales resultaron muy útiles para predecir las interacciones iónicas y de enlaces de hidrógeno presentes en estos compuestos. Además se estudiaron las reactividades químicas empleando superficies de potencial electrostático, junto con los cálculos de orbitales moleculares de fronteras (HOMO-LUMO), su diferencia conocida como GAP y algunos descriptores químicos globales.

Se realizaron los completos análisis vibracionales, determinando todos los modos normales de vibración esperados para cada sal de potasio en ambos medios, y los respectivos campos de fuerza, empleando el programa MOLVIB y los campos de fuerza mecánico cuántico escalado de Pulay (SQMFF). Se compararon los espectros vibracionales experimentales de IR y Raman, realizados en fase sólida, con los correspondientes calculados en fase gaseosa. Además se asignaron las bandas observadas a los modos normales de vibración.

Finalmente se compararon los espectros UV, realizados en solución acuosa, con los correspondientes teóricos calculados en el mismo medio, asignándose las principales bandas observadas.

## **Conclusiones**

Se realizó el completo análisis de las propiedades estructurales, electrónicas de los compuestos planteados, determinando, prediciendo sus reactividades en fase gaseosa y en solución acuosa, determinando la mayor reactividad en solución acuosa para los derivados del anillo de piridina, mientras que el derivado hidrocarbonado resultó ser la estructura más estable.

Se reportaron los completos análisis vibracionales reportándose todos los modos normales de vibración esperados. Se asignaron las bandas observadas en los espectros vibracionales,



determinándose las bandas características observadas en la región de  $1000\text{ cm}^{-1}$ , las cuales fueron asignadas a los estiramientos antisimétricos del grupo triflúorborato.

Se asignaron las bandas observadas en los espectros ultravioleta, y se determinó que la banda observada en el espectro experimental alrededor de 190 nm, asignada a las transiciones electrónicas desde los pares libres de electrones del grupo triflúorborato hacia diferentes enlaces sigma antienlazantes, caracteriza a este tipo de compuestos.

## Referencias

- [1] Iramain M.A., Davies L., Brandán S.A. FTIR, FT-Raman and UV-visible spectra of potassium 3-furoyltrifluoroborate. *J. Mol. Struct.* 2018; 1158: 245-254.
- [2] Iramain M.A., Davies L., Brandán S.A. Structural and spectroscopic differences among the potassium 5-hydroxypentanoyltrifluoroborate salt and the furoyl and isonicotinoyl salts, *J. Mol. Struct.* 2019; 1176: 718-728.
- [3] Iramain M.A., Davies L., Brandán S.A. Evaluating structures, properties and vibrational and electronic spectra of the potassium 2-isonicotinoyltrifluoroborate salt. *J. Mol. Struct.* 2018; 1163: 41-53.
- [4] Iramain M.A., Ledesma A.E., Brandán S.A. Structural properties and vibrational analysis of potassium 5-Br-2-isonicotinoyltrifluoroborate salt. Effect of Br on the isonicotinoyl ring, *J. Mol. Struct.* 2019; 1184: 146-156.
- [5] Iramain M.A., Brandán S.A. Exploring properties of potassium 6-X-2-isonicotinoyltrifluoroborate (X= H, F, Cl, Br) salts and their anions by using *ab-initio* calculations. *J. Mol. Model.* 2019; 25: 348-364.
- [6] Iramain M.A., Brandán S.A. Role of halogen F---H bonds in potassium trifluoroborate salts. *Int. J. Curr. Adv. Res.* 2019; 8 (6): 19248-19253.
- [7] Dumas AM., Molander GA., Bode JW. Amide-forming ligation of acyltrifluoroborates and hydroxylamines in water, *Angew. Chem.* 2012; 51 (23): 5683-5686.
- [8] Pusterla I., Bode JW. The mechanism of the  $\alpha$ -ketoacid-hydroxylamine amide-forming ligation. *Angew. Chem.* 2012; 51 (2): 513-516.
- [9] Dumas AM., Molander GA., Bode JW. Amide-forming ligation of acyltrifluoroborates and hydroxylamines in water, *Angew. Chem.* 2012; 124 (23): 5781-5784.
- [10] Dumas AM., Bode JW. Synthesis of acyltrifluoroborates, *Org. Lett.* 2012; 14 (8): 2138-2141.
- [11] Noda H., Bode JW. Synthesis of chemically and configurationally stable monofluoro acylboronates: effect of ligand structure on their formation, properties, and reactivities. *J. Am. Chem. Soc.* 2015; 137 (11): 3958-3966.

--

## **Experimental and theoretical study of potassium trifluoroborate salts**

In this Ph. D. Thesis, the study of the structural, electronic, topological and vibrational properties of a series of potassium salts that contain the trifluoroborate group in common was carried out, combining theoretical calculations derived from density functional theory (DFT) and experimental Infrared, Raman and Ultraviolet spectra.

The compounds studied were the salts 3-furoyl-trifluoroborate of potassium, 5-hydroxypentanoyl-trifluoroborate of potassium, three compounds derived from the pyridine ring, the salts potassium 2-isonicotinoyl-trifluoroborate, potassium 6-chloro-2-isonicotinoyl-trifluoroborate, potassium 5-bromo-2-isonicotinoyl-trifluoroborate, and two compounds with a benzene ring in common, potassium 2-phenylacetyl-trifluoroborate and potassium 4-fluorobenzoyl-trifluoroborate.

This series of compounds is of great importance in synthetic chemistry, since they are relatively easy to manipulate, thanks to their physicochemical properties, and they turn out to be very useful intermediates for the synthesis of natural products or basic components in organic synthesis. They are also used in the development of new methodologies for the formation of new carbon-carbon, carbon-oxygen, carbon-nitrogen bonds, and carbon-halogen bond formation reactions.

The theoretical structures were modeled with the GaussView 5.0 program, which were optimized with the Gaussian 09 program, using the hybrid B3LYP method and the set of base functions 6-311++G\*\*, in the gas phase, while they were carried out in aqueous solution using the Self-Consistent Reaction Field Method (SCRF) and the Continuous Polarized Model (PCM).

The most stable structures of each salt were calculated, using potential energy curves, studying the free rotation of different bonds that describe important dihedral angles. The relative energies corrected by Z.P.V.E, the volumes, dipole moments and the corrected solvation energies were calculated.

Calculations of natural bonding orbitals were carried out, using the NBO 5.1 program, to determine the main atomic charges, bond orders and electronic delocalization energies, while using the AIM2000 program and Bader's theory, the topological properties dependent on the electronic charge density, which were very useful to predict the ionic and hydrogen bonding

interactions present in these compounds. In addition, chemical reactivities were studied using electrostatic potential surfaces, along with calculations of frontier molecular orbitals (HOMO-LUMO), their difference known as GAP and some global chemical descriptors.

Complete vibrational analyzes were carried out, determining all the normal modes of vibration expected for each potassium salt in both media, and the respective force fields, using the MOLVIB program and the Pulay scaled quantum mechanical force fields (SQMFF). The experimental IR and Raman vibrational spectra, carried out in the solid phase, were compared with the corresponding ones calculated in the gas phase. Furthermore, the observed bands were assigned to the normal modes of vibration.

Finally, the UV spectra, carried out in aqueous solution, were compared with the corresponding theoretical ones calculated in the same medium, assigning the main observed bands.

## **Conclusions**

The complete analysis of the structural and electronic properties of the proposed compounds was carried out, determining and predicting their reactivities in the gas phase and in aqueous solution, determining the highest reactivity in aqueous solution for the derivatives of the pyridine ring, while the hydrocarbon derivative was be the most stable structure.

Complete vibrational analyzes were reported, reporting all expected normal modes of vibration. The bands observed in the vibrational spectra were assigned, determining the characteristic bands observed in the  $1000\text{ cm}^{-1}$  region, which were assigned to the antisymmetric stretching of the triflurborate group.

The bands observed in the ultraviolet spectra were assigned, and it was determined that the band observed in the experimental spectrum around 190 nm, assigned to the electronic transitions from the lone pairs of electrons of the trifluoroborate group towards different antibonding sigma bonds, characterizes this type. of compounds.

## **References**

[1] Iramain M.A., Davies L., Brandán S.A. FTIR, FT-Raman and UV-visible spectra of potassium 3-furoyltrifluoroborate. *J. Mol. Struct.* 2018; 1158: 245-254.

- [2] Iramain M.A., Davies L., Brandán S.A. Structural and spectroscopic differences among the potassium 5-hydroxypentanyltrifluoroborate salt and the furoyl and isonicotinoyl salts, *J. Mol. Struct.* 2019; 1176: 718-728.
- [3] Iramain M.A., Davies L., Brandán S.A. Evaluating structures, properties and vibrational and electronic spectra of the potassium 2-isonicotinoyltrifluoroborate salt. *J. Mol. Struct.* 2018; 1163: 41-53.
- [4] Iramain M.A., Ledesma A.E., Brandán S.A. Structural properties and vibrational analysis of potassium 5-Br-2-isonicotinoyltrifluoroborate salt. Effect of Br on the isonicotinoyl ring, *J Mol. Struct.* 2019; 1184: 146-156.
- [5] Iramain M.A., Brandán S.A. Exploring properties of potassium 6-X-2-isonicotinoyltrifluoroborate (X= H, F, Cl, Br) salts and their anions by using *ab-initio* calculations. *J. Mol. Model.* 2019; 25: 348-364.
- [6] Iramain M.A., Brandán S.A. Role of halogen F---H bonds in potassium trifluoroborate salts. *Int. J. Curr. Adv. Res.* 2019; 8 (6): 19248-19253.
- [7] Dumas AM., Molander GA., Bode JW. Amide-forming ligation of acyltrifluoroborates and hydroxylamines in water, *Angew. Chem.* 2012; 51 (23): 5683-5686.
- [8] Pusterla I., Bode JW. The mechanism of the  $\alpha$ -ketoacid-hydroxylamine amide-Forming ligation. *Angew. Chem.* 2012; 51 (2): 513-516.
- [9] Dumas AM., Molander GA., Bode JW. Amide-forming ligation of acyltrifluoroborates and hydroxylamines in water, *Angew. Chem.* 2012; 124 (23): 5781-5784.
- [10] Dumas AM., Bode JW. Synthesis of acyltrifluoroborates, *Org. Lett.* 2012; 14 (8): 2138-2141.
- [11] Noda H., Bode JW. Synthesis of chemically and configurationally stable monofluoro acylboronates: effect of ligand structure on their formation, properties, and reactivities. *J. Am. Chem. Soc.* 2015; 137 (11): 3958-3966.

--

## **Descubrimiento de nuevos anticonvulsivos que actúan mediante interacciones con canales iónicos**

Manuel Augusto Llanos

Tesis de Doctorado para optar al grado académico superior de Doctor en Ciencias Exactas, área Ciencias Biológicas – Premio AQA: “Dr. Enrique Herrero Ducloux 2023”  
Directora: Prof. Dra. Luciana Gavernet. Co-director: Prof. Dr. Pedro Martín.

Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Bioactivos (LIDeB), Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.  
e-mail: manu.llanos@gmail.com

*Recibido: 29 de septiembre de 2023*

*Aceptado: 18 de octubre de 2023*

---

La epilepsia es una enfermedad caracterizada por la presencia recurrente de convulsiones, con las consecuencias neurobiológicas, cognitivas, psicológicas y sociales que esto implica. Esta patología afecta a más de 50 millones de personas en todo el mundo, lo que la convierte en la segunda enfermedad neurológica más común a nivel global. La gran mayoría de los afectados viven en países de bajos ingresos y como consecuencia, casi el 75% de ellos no reciben un tratamiento adecuado. Aun cuando la farmacoterapia es el tratamiento de primera línea para esta patología, aproximadamente un 30% de los pacientes no responden a las terapias farmacológicas existentes. Este contexto motiva la búsqueda constante de nuevos fármacos anticonvulsivos (FACs) más seguros y mejor tolerados que superen el problema de la farmacorresistencia.

Esta Tesis Doctoral se propuso como objetivo identificar compuestos *multitarget* con potencial actividad anticonvulsiva, que actúen simultáneamente sobre el receptor de potencial transitorio V1 (TRPV1) y el canal de sodio operado por voltaje isoforma 1.2 (NaV1.2).

Para ello, se recurrió a una estrategia de reposicionamiento de fármacos asistida por computadora. Específicamente, se desarrollaron modelos predictivos basados en la estructura de los ligandos (QSAR) y del receptor (docking molecular) para ambos blancos moleculares. Durante esta etapa, diversas estrategias de modelado y algoritmos fueron evaluados de manera sistemática, poniendo especial énfasis en la validación de los mismos. Finalmente, los mejores

modelos se aplicaron en una campaña de cribado virtual sobre la base de datos DrugBank, con el objetivo de reposicionar fármacos ya aprobados como FACs. Montelukast, Novobiocina y Cinarizina fueron seleccionados para ser evaluados experimentalmente mediante la técnica de Patch Clamp, en un sistema de expresión heterólogo en células HEK293.

Todos ellos demostraron una potente actividad inhibitoria sobre ambos canales iónicos, lo cual valida la capacidad predictiva de los modelos. La combinación de metodologías *in silico*, basadas en la estructura de los ligandos y del receptor demostró ser un enfoque útil para la identificación de compuestos *multitarget*, en el contexto de una enfermedad compleja como la epilepsia. En el caso particular del canal TRPV1, la estrategia de reposicionamiento propuesta permitió identificar tres nuevos quimiotipos de inhibidores, con una potencia nanomolar y sin efecto sobre la temperatura corporal en humanos.

La actividad anticonvulsiva de estos fármacos fue evaluada en tres modelos murinos de crisis agudas (MES, 6-hz y PTZ) y un modelo genético de crisis audiogénicas en hamsters (GASHSal). Todos ellos demostraron actividad en al menos uno de estos ensayos y ninguno presentó signos de neurotoxicidad evidenciada mediante el test de Rotorod.

Aun cuando puedan existir otros mecanismos de acción asociados a la actividad anticonvulsiva reportada para estas moléculas, la modulación conjunta de los canales TRPV1 y NaV1.2 emerge como una estrategia promisoriosa para el desarrollo de nuevos FACs, más eficaces, seguros y mejor tolerados.

--

### **Discovery of new anticonvulsants that act through interactions with ion channels**

Epilepsy is a disease characterized by the recurrent presence of seizures, with the neurobiological, cognitive, psychological and social consequences that this implies. It affects more than 50 million people worldwide, which makes it the second most common neurological disease globally. The vast majority of those affected live in low-income countries and as a consequence nearly 75% of them do not receive appropriate treatment. Pharmacotherapy is the first-line treatment for this pathology.

However, approximately 30% of patients do not respond to existing pharmacological therapies. This motivates the constant search for safer and better tolerated anticonvulsant drugs

(ACDs) that overcome the drug resistance problem. In this regard, this doctoral thesis aims to find multitarget compounds that act simultaneously on TRPV1 and NaV1.2 channels, with potential anticonvulsant activity *in vivo*, through a computer-aided drug repositioning strategy. For both molecular targets ligand- (QSAR) and structure-based (docking and molecular dynamics) predictive models were developed. The ensemble of models was applied in a virtual screening campaign over the DrugBank database, aiming to repurpose already approved drugs as ACDs, and three candidates were selected for experimental testing: Montelukast, Novobiocin and Cinnarizine. All of them demonstrated a potent inhibitory activity on both targets, measured by the patch clamp technique on a heterologous expression system in HEK293 cells. Additionally, the candidates were tested in four animal models of seizures: MES, 6-hz, PTZ, and GASH:Sal. All drugs exhibited anticonvulsant activity in at least one of these models, and none of them showed signs of neurotoxicity in the Rotorod test.

The combination of *in silico* methodologies, based on the structure of the ligands and the receptor, proved to be a useful approach for the identification of *multitarget* compounds in the context of a disease such as Epilepsy. Moreover, the joint modulation of TRPV1 and NaV1.2 channels emerge as a promising strategy for the development of novel ACDs.

—

## **Revalorización de la chía como fuente de antioxidantes naturales: Utilización sustentable del subproducto generado durante la extracción de su aceite**

Agustín Lucini Mas

Tesis de Doctorado para optar al grado académico superior de Doctor en Ciencias Químicas –  
Premio AQA: “Dr. Luis Guglielmelli 2023” (Área: Química Orgánica y Bio-Orgánica).  
Directora de Tesis: Prof. Dra. María Verónica Baroni.

Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos Córdoba (ICYTAC-UNC-CONICET), Departamento de  
Química Orgánica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba (UNC). e-mails:  
alucini@docente.ffyb.uba.ar; agustin.lucini@unc.edu.ar; agustinlucinimas@hotmail.com

*Recibido: 28 de septiembre de 2023*

*Aceptado: 18 de octubre de 2023*

---

La industria alimentaria es uno de los grandes pilares de la economía mundial. En ella, se produce una importante cantidad de residuos, lo cual tiene un fuerte impacto a nivel ambiental y económico. Sin embargo, este impacto negativo puede reducirse reutilizando los subproductos generados e incorporándolos en otros alimentos para mejorar su calidad nutricional.

En el presente trabajo de tesis doctoral se realizó el estudio de la fracción no lipídica de la semilla de chía resultante luego de la extracción industrial de su aceite. Este subproducto, al que llamamos harina de chía, es rico en compuestos polifenólicos, los cuales son conocidos principalmente debido a su actividad antioxidante; por lo que su inclusión en un alimento podría generar beneficios en el estado de la salud de quienes lo consuman. Sin embargo, el poder antioxidante del alimento dependerá de la identidad química de los compuestos presentes, de su concentración, y de los posibles sinergismos y antagonismos que presenten en conjunto. Por lo que los cambios ocurridos en estos compuestos, a causa del proceso productivo en la fabricación de un alimento y de la posterior digestión gastrointestinal al ser consumido; pueden modificar su actividad antioxidante.

Durante esta tesis, se determinó el perfil y contenido de compuestos polifenólicos de la harina de chía utilizando la técnica de cromatografía líquida de ultra-alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas (UPLC-MS/MS), encontrándose 25 compuestos diferentes y perteneciendo la mayoría a la familia de los ácidos hidroxicinámicos, como el ácido rosmarínico y su glicosilado.



Además, se suplementó una formulación de galleta dulce con diferentes proporciones de harina de chía en reemplazo de harina de trigo y se evaluaron los cambios en su calidad tecnológica y sensorial. Los diferentes agregados modificaron el color y aspecto superficial del producto final, pero no disminuyeron la calidad tecnológica general comparada con la formulación control. Asimismo, la galleta con 10% de reemplazo con harina de chía fue preferida en un análisis sensorial incluso por sobre la galleta control.

Sobre esta galleta preferida, se llevó a cabo el estudio de los cambios producidos en su contenido de compuestos polifenólicos por el procesamiento y su digestión gastrointestinal. Sólo 11 compuestos de los 25 presentes en la harina se encontraron en la galleta suplementada. Si bien la concentración relativa de cada uno de los compuestos fue diferente a la de la harina, la concentración total de polifenoles fue similar a la esperada. Luego del proceso de digestión gastrointestinal simulada, aproximadamente el 75% del contenido de polifenoles en la galleta serían absorbidos por difusión pasiva en el intestino delgado y grueso (observándose 7 compuestos en la primer fracción y 9 en la segunda).

Por otro lado, además del contenido de polifenoles se estudió la actividad antioxidante de las diferentes fracciones mediante ensayos sobre la línea celular hepática humana HepG2 en condiciones basales y de estrés oxidativo. En este sentido, la harina de chía demostró poseer actividad antioxidante disminuyendo los niveles de especies reactivas de oxígeno (EROs), aumentando los niveles de antioxidantes endógenos no enzimáticos (glutación o GSH) y disminuyendo el daño oxidativo en proteínas. Este efecto antioxidante en los niveles de EROs se mantuvo para la galleta suplementada y las fracciones resultantes de la digestión gastrointestinal simulada.

Por último, se evaluó la actividad antioxidante de la harina de chía por métodos *in vivo* utilizando modelos animales de ratón y codornices. En el primero de ellos, el factor de estrés utilizado fue una dieta de baja calidad nutricional alta en fructuosa y con gran proporción de ácidos grasos saturados, mientras que para el segundo, se expuso crónicamente a los animales a temperaturas elevadas. La suplementación de la dieta de ratones con 10% de harina de chía moduló la actividad de enzimas antioxidantes, y los niveles de EROs y GSH, resultando en una disminución del daño oxidativo en proteínas. En el caso de las codornices, la suplementación de la dieta con polifenoles extraídos de la harina de chía también moduló la actividad de enzimas antioxidantes ayudando a disminuir la peroxidación de lípidos. Además, ésta suplementación

mejoró la proporción de ácidos grasos en la yema, obteniéndose huevos de mejor calidad nutricional, con menor cantidad de ácidos grasos saturados y mayor de poliinsaturados.

En conclusión esta tesis constituye un importante aporte científico interdisciplinario que demuestra la necesidad del estudio y la investigación en el área de la ciencia de alimentos; permitiendo a su vez darle valor agregado a un subproducto industrial verdadero y fomentando la vinculación del sector científico-tecnológico-industrial en búsqueda de un mayor desarrollo de la economía circular.

--

### **Revaluation of chia as a source of natural antioxidants: sustainable use of the byproduct generated during the oil extraction**

Food industry is one of the most important pillars of the global economy. This industry produces large amounts of waste that can have strong ecological and economic impacts. However, this negative impact could be reduced by incorporating the by-products generated into other foodstuffs to improve their nutritional quality.

This Ph. D. Thesis focuses on the non-lipid fraction of chia seeds that comes from the industrial extraction of its oil. This by-product, named as chia defatted flour from now on, is rich in polyphenolic compounds, which are known mainly due to their antioxidant activity. Thus, its inclusion in foodstuffs could generate benefits in the health status of those who consume it. However, the antioxidant capacity of the product depends on the chemical identity of the compounds, their concentration, and the possible synergisms and antagonisms between them. Therefore, changes in polyphenol composition occurring due to the foodstuff manufacturing process and gastrointestinal digestion when consumed may modify its antioxidant activity.

During this study, the profile and content of polyphenolic compounds in chia defatted flour was determined using ultra-high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (UPLC-MS/MS), finding 25 different compounds, being hydroxycinnamic acids such as rosmarinic acid and its glycoside derivative, the major ones.

In addition, a sweet biscuit formulation was supplemented with chia defatted flour in replacement of wheat flour in different proportions, and changes in its technological and sensory

quality were evaluated. The supplementation in different amounts modified the color and surface appearance, but did not change the overall technological quality compared to the control formulation. In parallel, the cookie with 10% replacement of wheat flour with chia defatted flour was chosen as the preferred one in a sensorial analysis, even over the control cookie.

This preferred cookie was used to evaluate the changes in polyphenol content caused by processing and gastrointestinal digestion. Only 11 out of 25 compounds present in chia defatted flour were detected in the supplemented cookie. Although their relative concentration was different from that in chia byproduct, the total polyphenol content was nearly the expected. On the other hand, only 75% of the cookie polyphenol content would be absorbed by passive diffusion in the small and large intestine after the simulated gastrointestinal digestion.

Furthermore, the antioxidant activity of the different fractions were assessed in human hepatic cells (HepG2) subjected to oxidative stress. Chia defatted flour showed antioxidant activity since it increased endogenous non-enzymatic antioxidants (glutathione or GSH) and decreased reactive oxygen species (ROS) and oxidative damage in proteins. This antioxidant effect on ROS levels was maintained for the supplemented cookie and after simulated gastrointestinal digestion.

Finally, the antioxidant activity of chia defatted flour was also assessed *in vivo* using mice and quails models. In the first one, the stress stimulus was a low nutritional quality diet (high fructose and high proportion of saturated fatty acids), and in the latter one, animals were chronically exposed to high temperatures. In the case of mice, diet supplementation with 10% of chia defatted flour modulated the activity of antioxidant enzymes and ROS and GSH levels, resulting in a decrease of protein oxidative damage. In the case of quails, diet supplementation with polyphenols extracted from chia defatted flour also modulated the activity of antioxidant enzymes and decreased oxidative damage in lipids. Besides, it improved the yolk fatty acids content, obtaining better nutritional quality eggs with lower proportion of saturated fatty acids and higher polyunsaturated fatty acids.

In conclusion, this study represents an important interdisciplinary scientific contribution that demonstrates the need for study and research in food science; conferring added value to a real industrial by-product and promoting the linkage of the scientific-technological-industrial sector in search of a greater development of the circular economy.

## Nitroxilo (HNO): Complejos biomiméticos de porfirinas de hierro y nuevos métodos de generación

Agostina María Mazzeo

Tesis de Doctorado para optar al grado académico superior de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Química Inorgánica, Química Analítica y Química Física – Premio AQA: “Dr. Enrique Herrero Ducloux 2023”. Director de Tesis: Prof. Dr. Fabio Doctorovich. Director Adjunto de Tesis: Dr. Juan Pellegrino.

Instituto de Química Física de los Materiales, Medio Ambiente y Energía (INQUIMAE), Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química-Física, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.  
e-mails: agos.mazzeo@gmail.com; amazzeo@cbc.uba.ar; amazzeo@cibion.conicet.gov.ar

Recibido: 29 de septiembre de 2023

Aceptado: 30 de octubre de 2023

---

En las últimas décadas, la química biológicamente relevante del óxido nítrico (NO•) y su producto de reducción, el nitroxilo o azanona (HNO/NO<sup>-</sup>), ha sido intensamente explorada debido a sus demostrados efectos fisiológicos y su protagonismo como parte de complejos intermediarios enzimáticos clave del ciclo del nitrógeno. En este trabajo de Tesis se abarcaron distintos aspectos de la química y reactividad del nitroxilo.

Por un lado, se desarrollaron nuevos métodos de generación de esta especie en fase gaseosa. Para ello se estudiaron reacciones heterogéneas entre donores de HNO en estado sólido y bases gaseosas, así como también la generación térmica de HNO por calentamiento de donores en ausencia de base. Los resultados obtenidos sientan una base para el potencial desarrollo de métodos de administración terapéutica de HNO por inhalación, así como para la profundización de estudios de reactividad de esta elusiva especie en fase libre.

Por otro lado, se exploró la estabilidad de complejos de coordinación Fe-HNO y Fe-NO<sup>-</sup> en medio acuoso y orgánico, utilizando una porfirina de hierro como modelo biomimético de enzimas hémicas. Partiendo de la plataforma soluble en agua [Fe<sup>III</sup>(TPPS)]<sup>3-</sup> y donores de HNO, se aisló el complejo nitrosilado [Fe<sup>II</sup>(TPPS)(NO•)]<sup>4-</sup> con distintos contraiones, cuya estructura pudo ser determinada por difracción de rayos X. Se exploró su reducción a [Fe<sup>II</sup>(TPPS)(HNO)]<sup>4-</sup> y [Fe<sup>II</sup>(TPPS)(NO<sup>-</sup>)]<sup>5-</sup> en medio acuoso, caracterizándose ambas especies por espectrofotometría UV-visible. Se determinó el potencial de reducción de [Fe<sup>II</sup>(TPPS)(NO•)]<sup>4-</sup>

en función del pH mediante voltametrías cíclicas, estimándose el pKa del complejo Fe-HNO en 9.7. Este complejo mostró una estabilidad incrementada respecto a lo observado para complejos análogos en medio orgánico, efecto que puede explicarse a partir de la presencia de interacciones de puente de hidrógeno con el solvente. Su eventual reoxidación al nitrosilo de partida ( $t_{1/2} = 40$  s) ocurre mediante un proceso unimolecular propuesto por primera vez, que involucra una ruptura homolítica H-NO como paso determinante, y que según cálculos DFT, podría incluir la formación de un intermediario *florina* no aromático. Finalmente, se prepararon derivados organosolubles de esta especie, y al caracterizarse y explorarse su reactividad se encontró una marcada influencia del medio. En todo momento, los experimentos se llevaron a cabo en condiciones de estricta ausencia de oxígeno, dentro de una caja de guantes con atmósfera de nitrógeno o bien utilizando cuidadosamente líneas de vacío/argón y material de Schlenk.

**Palabras clave:** Nitroxilo; azanona; óxido nítrico; porfirinas; hierro; complejos de coordinación; química bioinorgánica; biomimética; técnicas de Schlenk; caja de guantes.

--

### **Nitroxyl (HNO): biomimetic complexes with iron porphyrins and new generation methods**

In the last decades, the biologically relevant chemistry of nitric oxide ( $\text{NO}^\bullet$ ) and its reduction product, nitroxyl or azanone ( $\text{HNO}/\text{NO}^-$ ), have been intensely studied due to their established physiological effects and their key importance as part of intermediate complexes in enzymatic processes of the nitrogen cycle. In this Ph. D. Thesis, different aspects of the chemistry and reactivity of nitroxyl have been explored.

On the one hand, new generation methods for gaseous nitroxyl have been developed. To this end, heterogeneous solid-gas reactions between solid HNO donors and gaseous bases have been studied, as well as thermal NO generation from donor heating in the absence of base. The obtained results establish the grounds for the potential development of therapeutic HNO administration methods by inhalation and for broadening the chemical understanding of this elusive species in the gas phase.

On the other hand, the stability of Fe-HNO and Fe- $\text{NO}^-$  coordination complexes was explored in aqueous and organic media using an iron porphyrin platform as a biomimetic model for heme

enzymes. From the reaction of ferric, water-soluble  $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{TPPS})]^{3-}$  with HNO donors, the nitrosyl complex  $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{TPPS})(\text{NO}^{\bullet})]^{4-}$  was isolated with different counterions, and structurally characterized via XRD. Its reduction to  $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{TPPS})(\text{HNO})]^{4-}$  and  $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{TPPS})(\text{NO}^-)]^{5-}$  was explored in aqueous media, and both species were characterized by UV-Vis spectrophotometry. The reduction potential of  $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{TPPS})(\text{NO}^{\bullet})]^{4-}$  was determined as a function of pH via cyclic voltammetry experiments, and the pKa for the Fe-HNO complex was estimated as 9.7. This complex showed enhanced stability compared to analogous complexes in organic media, which can be explained by the presence of stabilizing hydrogen-bond interactions with the solvent. Its eventual reoxidation to the starting nitrosyl ( $t_{1/2} = 40$  s) occurs via a unimolecular complex proposed for the first time, which includes the homolytic cleavage of the H-NO bond as the rate-limiting step. According to DFT calculations, this step might include the formation of a non-aromatic *phlorin* intermediate. Finally, organosoluble derivatives of  $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{TPPS})(\text{NO}^{\bullet})]^{4-}$  were prepared, and a strong influence of the solvent was evidenced from reactivity studies.

Strict oxygen-free conditions were maintained for all experiments, which were performed inside a nitrogen glovebox or using an argon/vacuum line and Schenk glassware.

**Keywords:** nitroxyl; azanone; nitric oxide; porphyrins; iron; coordination complexes; bioinorganic chemistry; biomimetics; Schlenk techniques: glovebox.

--

## **Nanoestructuras plasmónicas como dispositivos para la detección ultrasensible o fotodegradación de moléculas de interés agroalimenticio**

Pablo Agustín Mercadal

Tesis de Doctorado para optar al grado académico superior de Doctor en Ciencias Químicas – Premio AQA: “Dr. Enrique Herrero Ducloux 2023”. Director de Tesis: Prof. Dr. Eduardo A. Coronado.

Departamento de Fisicoquímica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.  
e-mails: pabloagustinmercadal@hotmail.com; pablo.mercadal@unc.edu.ar

*Recibido: 27 de septiembre de 2023*

*Aceptado: 10 de octubre de 2023*

---

La Tesis se realizó en el Departamento de Fisicoquímica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba y con Beca Doctoral de CONICET en el Instituto de Investigaciones en Fisicoquímica de Córdoba (INFIQC). Esta Tesis abarca el diseño, fabricación y estudio de las propiedades ópticas de sistemas compuestos de nanopartículas metálicas puras o formando un híbrido con óxido de hierro magnético. El eje central de la misma desarrolla una novedosa metodología que permite la determinación de la composición estructural de muestras formadas por diferentes fracciones de agregados de nanopartículas plasmónicas en dispersión coloidal. A lo largo de la Tesis se demuestra como la implementación de esta metodología permite develar tanto aspectos fundamentales de la Fisicoquímica de Nanopartículas, que contribuyen a la comprensión de las propiedades ópticas de nanoestructuras plasmónicas, como su aplicación para la detección o fotodegradación de moléculas de interés agroindustrial.

En particular, los sistemas estudiados están compuestos por diversos tipos de nanoestructuras metálicas en dispersión coloidal: agregados de nanopartículas de metales nobles (Au, Ag) de forma aproximadamente esféricas, agregados de nanopartículas anisotrópicas (nanovarillas) y nanoestructuras híbridas, en este caso, conformadas por un núcleo de magnetita con nanopartículas de Au en su superficie (nanopartículas tipo núcleo-NPs satélites).

Las nanoestructuras formadas fueron caracterizadas utilizando diversas técnicas espectroscópicas, así como también, técnicas de microscopía electrónica y de difracción de Rayos X. La respuesta óptica experimental de cada uno de los nanosistemas fabricados fue correlacionada e interpretada mediante simulaciones electrodinámicas utilizando la teoría de Mie

o DDA (del inglés, *Discrete Dipole Approximation*). Para ello, se desarrolló un modelo matemático que, junto con los cálculos electrodinámicos y los espectros UV-Visible experimentales, se pueden determinar las fracciones y concentraciones molares de los diferentes agregados de nanopartículas en cualquier tiempo  $t$  (ej: dímeros, trímeros, etc.).

Es decir que, a partir de la correlación entre experimentos y teoría, fue posible determinar en dispersión coloidal las distintas concentraciones y fracciones de cada una de las poblaciones de nanoestructuras presentes en los sistemas de estudio.

Esta herramienta aporta nueva información que permite comprender la respuesta experimental obtenida para cada nanodispositivo, así como también definir sus futuras aplicaciones.

Una característica de las nanopartículas metálicas es que pueden funcionalizarse con diversas moléculas. En particular, la conjugación de biomoléculas con nanopartículas permite generar materiales que combinan las propiedades ópticas plasmónicas con la capacidad de bioreconocimiento altamente específico de las biomoléculas. En la Tesis se demuestra que utilizando este nuevo enfoque para determinar la fracción y las concentraciones molares de agregados de nanopartículas de plata en conjunto con su capacidad de conjugación con el par biomolecular biotina-estreptavidina se estudió un nanosensor que, mediante espectroscopia UV-Visible, permite la detección ultrasensible de gliadina, analito de gran relevancia en la Ciencia de los Alimentos.

Otra aplicación de este modelo matemático y utilizando el par biomolecular anteriormente mencionado es el desarrollo de un enfoque plasmónico para estudiar, mediante espectroscopía UV-Vis, la cinética de unión de las interacciones proteína-ligando ancladas a la superficie de nanopartículas. Estudiar la cinética de unión de complejos proteínas/ligando-nanopartículas permite el desarrollo de bionanosensores de afinidad para el monitoreo y diagnóstico de enfermedades en la atención médica, la investigación y las aplicaciones industriales.

A su vez, la especificidad y alta afinidad de la interacción del par biotina-estreptavidina permitió la fabricación de dímeros de nanopartículas de oro con una distancia interpartícula controlada. Los dímeros fueron utilizados, mediante espectroscopía vibracional Raman Incrementada por Superficie (SERS, del inglés, *Surface Enhanced Raman Spectroscopy*), como plataforma para la detección ultrasensible, directa e indirecta de anticuerpos biotinilados específicos para gliadina y ara h1 (proteína de interés para las personas alérgicas al maní).



Otro aspecto de interés analizado es cómo correlacionar en forma rigurosa los factores de incrementos SERS experimentales en agregados de nanopartículas con los factores de incrementos calculados usando simulaciones electrodinámicas. La importancia en determinar la concentración y fracciones de los agregados de nanopartículas es que permite obtener información sobre la concentración de cada tipo de nanoagregados formado y de esta manera estimar el número de moléculas que efectivamente contribuyen a la señal SERS. Este es un tópico de gran relevancia ya que cuando se generan agregados de nanopartículas utilizando puentes moleculares, las moléculas que contribuyen en forma significativa a la señal SERS son aquellas que se encuentran en la región interpartícula donde el campo eléctrico que se genera es mucho mayor que en el resto de la nanoestructura. Determinar el número o concentración de moléculas situadas en estas regiones, requiere determinar el número o concentraciones de monómeros, dímeros, trímeros, etc., formados luego del agregado de la molécula que induce la agregación. En la Tesis se demuestra cómo mediante simulaciones de los espectros de extinción se puede obtener información sobre la concentración de cada tipo de nanoagregados formado y de esta manera estimar el número de moléculas que efectivamente contribuyen a la señal SERS. Esta nueva aproximación permite determinar el factor de incremento intrínseco de sustratos SERS el cual es un parámetro que define su calidad como nanosensor.

Finalmente, se estudiaron algunos factores de naturaleza plasmónica que controlan y mejoran las propiedades fotocatalíticas de nanoestructuras híbridas de magnetita-oro en el proceso de degradación fotoinducida de azul de metileno, un antiséptico ampliamente utilizado en la acuicultura.

--

### **Plasmonic nanostructures as devices for the ultrasensitive detection or photodegradation of molecules of agri-food interest.**

This Ph. D. Thesis was carried out in the Department of Physical Chemistry of the Faculty of Chemical Sciences from the National University of Córdoba (Departamento de Fisicoquímica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba), and with a CONICET Doctoral Scholarship at the Physicochemistry Research Institute of Córdoba (Instituto de Investigaciones en Fisicoquímica de Córdoba: INFIQC). This Ph. D. Thesis covers the design,

manufacturing, and study of the optical properties of systems composed of pure metallic nanoparticles or forming a hybrid with magnetic iron oxide. The central axis develops a novel methodology that allows the determination of the structural composition of samples formed by different fractions of aggregates of plasmonic nanoparticles in colloidal dispersion. Throughout the Ph. D. Thesis it is demonstrated how the implementation of this methodology leads to reveal both fundamental aspects of the Physicochemistry of Nanoparticles, which contribute to the understanding of the optical properties of plasmonic nanostructures, and the application for the detection or photodegradation of molecules of agroindustrial interest.

In particular, the systems studied are composed of various types of metallic nanostructures in colloidal dispersion: aggregates of noble metal nanoparticles (Au, Ag) of approximately spherical shape, aggregates of anisotropic nanoparticles (nanorods), and hybrid nanostructures, in this case, shaped by a magnetite core with Au nanoparticles on its surface (core-type nanoparticles-satellite NPs).

The formed nanostructures were characterized using various spectroscopic techniques, as well as electron microscopy and X-ray diffraction techniques. The experimental optical response of each of the manufactured nanosystems was correlated and interpreted through electrodynamic simulations using Mie theory or DDA. (*Discrete Dipole Approximation*). Therefore, a mathematical model was developed that, together with electrodynamic calculations and experimental UV-Visible spectra, can determine the fractions and molar concentrations of the different nanoparticle aggregates at any time  $t$  (e.g. dimers, trimers, etc.).

That is to say that, based on the correlation between experiments and theory, it was possible to determine in colloidal dispersion the different concentrations and fractions of each of the populations of nanostructures present in the study systems.

This tool provides new information to understand the experimental response obtained for each nanodevice, as well as to define its future applications.

A characteristic of metal nanoparticles is that they can be functionalized with various molecules. In particular, the conjugation of biomolecules with nanoparticles leads to the generation of materials that combine plasmonic optical properties with the highly specific biorecognition capacity of biomolecules. In this Ph. D. Thesis it is demonstrated that using this new approach to determine the fraction and molar concentrations of aggregates of silver nanoparticles in conjunction with their conjugation capacity with the biomolecular pair biotin-

streptavidin, a nanosensor was studied that, through UV-Visible spectroscopy, allows the ultrasensitive detection of gliadin, an analyte of great relevance in Food Science.

Another application of this mathematical model and using the aforementioned biomolecular pair is the development of a plasmonic approach to study, through UV-Vis spectroscopy, the binding kinetics of protein-ligand interactions anchored to the surface of nanoparticles. Studying the binding kinetics of protein/ligand-nanoparticle complexes enables the development of affinity bionanosensors for disease monitoring and diagnosis in healthcare, research, and industrial applications.

In turn, the specificity and high affinity of the interaction of the biotin-streptavidin pair led to the fabrication of gold nanoparticle dimers with a controlled interparticle distance. The dimers were used, by *Surface Enhanced Raman Spectroscopy* (SERS), as a platform for the ultrasensitive, direct and indirect detection of biotinylated antibodies specific for gliadin and ara h1 (protein of interest for humans allergic to peanuts).

Another aspect of interest analyzed is how to rigorously correlate the experimental SERS increment factors in nanoparticle aggregates with the increment factors calculated using electrodynamic simulations. This Ph. D. Thesis demonstrates how, through simulations of extinction spectra, information can be obtained about the concentration of each type of nanoaggregates formed and in this way estimate the number of molecules that effectively contribute to the SERS signal. This is a topic of great relevance since when nanoparticle aggregates are generated using molecular bridges, the molecules that contribute significantly to the SERS signal are those that are found in the interparticle region where the electric field that is generated is much greater than in the rest of the nanostructure. Determining the number or concentration of molecules located in these regions requires determining the number or concentrations of monomers, dimers, trimers, etc., formed after the addition of the molecule that induces aggregation. This new approach allows us to determine the intrinsic increase factor of SERS substrates, which is a parameter that defines their quality as a nanosensor.

Finally, some factors of a plasmonic nature were studied that control and improve the photocatalytic properties of hybrid magnetite-gold nanostructures in the photoinduced degradation process of methylene blue, an antiseptic widely used in aquaculture.

--

**Síntesis y caracterización de nanomateriales híbridos de carbono con propiedades de reconocimiento molecular: Nuevas plataformas electroanalíticas para la detección de marcadores de relevancia clínica, forense y ambiental.**

Antonella Evelin Montemerlo

Tesis de Doctorado para optar al grado académico superior de Doctor en Ciencias Químicas – Premio AQA: “Dr. Enrique Herrero Ducloux 2023”. Directora de Tesis: Prof. Dra. María Dolores Rubianes.

Instituto de Investigaciones en Fisicoquímica de Córdoba (INFIQC), Departamento de Fisicoquímica; Universidad Nacional de Córdoba. e-mail: amontemerlo@gmail.com

*Recibido: 28 de septiembre de 2023*

*Aceptado: 18 de octubre de 2023*

---

El presente trabajo de Tesis Doctoral se trata de un trabajo interdisciplinario centrado en el desarrollo pionero e innovador de sistemas electro-analíticos para la cuantificación de analitos de gran actualidad y que pretenden responder a los requerimientos de la Química Analítica Moderna.

Se abordó de manera crítica la síntesis, caracterización y optimización de nuevos nanomateriales híbridos de diferente naturaleza y complejidad, los cuales fueron empleados en el desarrollo de sensores electroquímicos tendientes a la cuantificación de analitos de interés clínico, como la dopamina que se encuentra íntimamente relacionada con procesos de neurotransmisión; forense, como el plomo y el antimonio, que pueden estar presentes en sospechosos, víctimas y en las superficies colindantes luego del disparo de un arma de fuego; y medioambiental, como el glifosato, el herbicida más utilizado y de mayor controversia en la actualidad.

La primera plataforma sensora desarrollada se basa en el estudio y caracterización de un híbrido 1D compuesto por nanotubos de carbono (CNT) funcionalizados vía no covalente con un bio-polímero como polietilenimina (PEI). Se estudiaron las propiedades electroquímicas del nanomaterial resultante, luego de su inmovilización sobre electrodos de carbono vítreo (GCE), y se caracterizó tanto espectroscópicamente como microscópicamente para comprender sus propiedades y alcances. GCE/CNT-PEI dio como resultado una plataforma

con excelentes propiedades electrocatalíticas y alta estabilidad hacia la oxidación de dopamina (DA), importantísimo neurotransmisor del Sistema Nervioso Central (SNC), permitiendo su detección a niveles submicromolares, sin efecto matriz ni pasivación del electrodo. GCE/CNT-PEI fue empleado exitosamente para estudiar como se ve afectado el proceso de recaptación de DA en muestras obtenidas del SNC de animales de laboratorio con diversas patologías neurodegenerativas de manera sencilla, rápida y económica.

Por otro lado, se sintetizó un nuevo nanomaterial híbrido 2D resultante de la reducción de óxido de grafeno (RGrO) *in situ*, mediante la formación de polímeros melánicos a partir monómeros como L-Dopa (Poly-L-Dopa) por ultrasonido. La caracterización espectroscópica y microscópica del material resultante, confirma la formación del polímero y la reducción simultánea de las láminas de grafeno. RGrO-Poli-L-Dopa presenta excelentes propiedades para la óxido-reducción de diferentes analitos, confirmadas mediante diversos experimentos electroquímicos. Se exponen los resultados obtenidos para la cuantificación inédita y sumamente novedosa y de bajo costo de residuos de disparos de armas de fuego como plomo y antimonio en muestras obtenidas en un polígono forense. Se propone una forma sencilla de obtención y procesado de muestras de residuos de disparo de diferentes armas de fuego, con distintos cartuchos y variando la distancia de deflagración. Es de suma importancia destacar que estos resultados permiten incursionar, por primera vez, en un campo no explorado y de gran actualidad en nuestro país, como lo es la balística-forense.

Finalmente, se plantea la síntesis mediante metodologías electroquímicas, top down y botton up, de dos materiales 1D y 0D de naturaleza carbonácea: grafeno electroquímicamente expandido (GEQE) y Carbon Quantum Dots (CQDots). Se estudian de manera crítica las condiciones de síntesis óptimas para la obtención de ambos nanomateriales y se correlacionan con las respuestas electroquímicas observadas. Se describe la obtención de un novedoso nanomaterial híbrido, formado a partir de estas nanoestructuras 2D y 0D sintetizadas, que combina las propiedades electroquímicas renovadas y superiores de los nanomateriales individuales. Se presenta el empleo del nanohíbrido para el desarrollo de un sensor tendiente a la detección indirecta de glifosato con un amplio intervalo lineal, lo que posibilita su cuantificación en muestras de origen muy diverso, tales como muestras de agua, así como también en muestras de formulaciones de productos fitosanitarios, dando como resultado un sensor apto para el control de calidad medioambiental o industrial de respuesta rápida y de bajo costo.

Los resultados presentados en este trabajo de tesis concluyen que una crítica selección de los materiales que conforman los nanohíbridos estudiados, que combinan nanomateriales de carbono con biopolímeros de diferente naturaleza y del esquema de transducción, posibilita el desarrollo de sensores altamente sensibles y selectivos para la cuantificación de analitos de gran relevancia clínica, forense y ambiental.

Este trabajo de Tesis resulta pionero e innovador en la aplicación de técnicas electroquímicas para la cuantificación de analitos de candente actualidad, permitiendo dar respuesta a problemas reales de la sociedad relacionados tanto a la química clínica y farmacológica, como así también sienta las bases en el área forense, aportando por primera vez herramientas para resolver actos criminales. Por otra parte, contribuye con nuevas metodologías para el control ambiental permitiendo no solo la detección, sino que también la cuantificación de herbicidas polémicos ampliamente utilizados en la actualidad.

### **Capítulos de la Tesis y Palabras Clave**

El principal desafío de la Química Analítica en la actualidad se centra en el diseño y preparación de nuevas plataformas sensoras altamente sensibles, reproducibles, robustas, miniaturizables, portables y capaces de cuantificar de forma rápida, selectiva y simultánea diversos analitos en escenarios antes impensados. En ese sentido, este trabajo de Tesis se centra en el desarrollo pionero de sistemas electro-analíticos basados en el diseño racional de diferentes soportes electródicos nanosestructurados que permitan la cuantificación sensible y selectiva de analitos de relevancia clínica, forense y medioambiental facilitando la toma de decisiones inmediata con la información obtenida. Para ello, se estudió la síntesis criteriosa de diversos tipos de nanomateriales híbridos a partir de nanoestructuras de carbono y polímeros. Los nuevos materiales se inmovilizaron sobre sustratos de carbono vítreo (GCE) con el objetivo de construir plataformas analíticas para el desarrollo de sensores electroquímicos tendientes a la cuantificación de analitos de relevancia en áreas de candente actualidad, como lo son las enfermedades neurodegenerativas, la determinación forense de residuos de disparo de armas de fuego y la detección de herbicidas polémicos y ampliamente utilizados con implicancias no solo en la salud sino que también a nivel medioambiental.

El CAPÍTULO 1 presenta una introducción general acerca de las propiedades y metodologías de síntesis de novedosos nanomateriales híbridos tendientes al diseño de sensores electroquímicos. Se describen las diferentes estrategias y metodologías empleadas

para la incorporación de los nanomateriales sobre sustratos conductores que permitirán la posterior detección altamente sensible y selectiva de los analitos de interés.

El CAPÍTULO 2 discute los fundamentos y las técnicas más representativas empleadas para el desarrollo del presente trabajo de Tesis y las metodologías utilizadas para la obtención de los resultados.

En el CAPÍTULO 3 se presenta la síntesis, mediante funcionalización no covalente, y caracterización de un híbrido 1D compuesto por nanotubos de carbono (CNT) con un biopolímero como polietilenimina (PEI). Se discuten las propiedades electroquímicas del nanomaterial resultante, luego de su VIII inmovilización sobre GCE, y la caracterización tanto espectroscópica como microscópica de CNT-PEI las cuales permiten comprender sus propiedades y alcances. Se propone el empleo del sensor GCE/CNT-PEI para la cuantificación de manera sencilla, con bajos límites de detección y en presencia de muestras de cerebro de animales de laboratorio, con diversas patologías neurodegenerativas, con resultados sumamente promisorios para dilucidar los cambios en la recaptación de dopamina (DA) en sistema nervioso central (SNC). Cabe destacar que el trabajo interdisciplinario en esta área de investigación es lo que posibilitó la utilización de GCE/CNT-PEI para estudios clínicos y farmacológicos que permitieron validar estudios tendientes a ser utilizados como herramienta para el tratamiento de diversos trastornos del SNC.

El CAPÍTULO 4 presenta el desarrollo de un nuevo nanomaterial híbrido 2D resultante de la reducción de óxido de grafeno (RGrO) *in situ*, mediante la formación de polímeros melánicos a partir monómeros como L-Dolpa (Poly-L-Dopa) por ultrasonido. Se analiza el efecto de las condiciones de síntesis sobre la respuesta electroquímica de la plataforma y se presenta la caracterización espectroscópica y microscópica del material resultante.

En el CAPÍTULO 5 se propone el uso de RGrO-Poly-L-Dopa para la construcción de una plataforma sensora para la detección de peróxido de hidrógeno en muestras de interés fármaco-bromatológico. Por otra parte, se discute la optimización de los parámetros experimentales (tiempo de preconcentración, potencial de reducción, tiempo de reducción y composición del medio reductor) para la aplicación del sensor en la cuantificación simultánea y sin interferencia de plomo y antimonio en el orden de ppb. Se exponen los resultados obtenidos para la cuantificación novedosa y de bajo costo de estos metales en muestras forenses. Se propone una forma sencilla de obtención y procesado de muestras de residuos de disparo de diferentes armas de fuego, con distintos cartuchos y variando la distancia de deflagración, todas ellas obtenidas en polígono forense por peritos criminalistas. Es de suma

importancia destacar que estos resultados permiten incursionar, por primera vez, en un campo muy poco explorado y de gran actualidad, como lo es la balística-forense.

El CAPÍTULO 6 plantea la síntesis mediante metodologías electroquímicas, *top down* y *bottom up*, de dos materiales de naturaleza carbonácea: grafeno electroquímicamente expandido (GEQE) y Carbon Quantum Dots (CQDots). Se estudian de manera crítica las condiciones de síntesis óptimas para la obtención de ambos nanomateriales y se correlacionan con las respuestas electroquímicas observadas. Se describe la obtención de un novedoso nanomaterial híbrido, formado a partir de estas nanoestructuras 2D y 0D sintetizadas, que combina las propiedades electroquímicas renovadas y superiores de los nanomateriales individuales.

En el CAPÍTULO 7 se presenta el empleo del nanohíbrido, inmovilizado sobre GCE, para el desarrollo de un sensor tendiente a la detección indirecta de glifosato (Gly) con un amplio intervalo lineal, lo que posibilita el empleo del mismo para la cuantificación del analito de interés en muestras de origen muy diverso, tales como muestras de agua, así como también en muestras de formulaciones de productos fitosanitarios, dando como resultado un sensor apto para el control de calidad medioambiental o industrial de respuesta rápida y de bajo costo.

Finalmente, el CAPÍTULO 8 expone las conclusiones generales del presente trabajo de Tesis Doctoral.

**Palabras clave:** *Sensor electroquímico; nanohíbrido; nanomateriales de carbono; nanotubos de carbono; óxido de grafeno; grafeno electroquímicamente expandido; Carbon Quantum Dots; monómero; polímero; dopamina; plomo; antimonio; glifosato; enfermedades neurodegenerativas; balística forense; control medioambiental.*

--

## **Synthesis and characterization of hybrid carbon nanomaterials with molecular recognition properties: new electroanalytical platforms for the detection of markers of clinical, forensic and environmental relevance**

This Ph. D. Thesis is an interdisciplinary work focused on the pioneering and innovative development of electro-analytical systems for the quantification of highly topical analytes that aim to respond to the requirements of Modern Analytical Chemistry.

The synthesis, characterization and optimization of new hybrid nanomaterials of different nature and complexity were critically addressed, which were used in the development of electrochemical sensors aimed at the quantification of analytes of clinical interest, such as dopamine, which is closely related to neurotransmission processes; forensic, such as lead and antimony, which may be present in suspects, victims and on surrounding surfaces after a



firearm is discharged; and environmental, such as glyphosate, the most used and most controversial herbicide today.

The first sensor platform developed is based on the study and characterization of a 1D hybrid composed of carbon nanotubes (CNT) functionalized non-covalently with a bio-polymer such as polyethyleneimine (PEI). The electrochemical properties of the resulting nanomaterial were studied, after its immobilization on glassy carbon electrodes (GCE), and it was characterized both spectroscopically and microscopically to understand its properties and scope. GCE/CNT-PEI resulted in a platform with excellent electrocatalytic properties and high stability towards the oxidation of dopamine (DA), a very important neurotransmitter of the Central Nervous System (CNS), allowing its detection at submicromolar levels, without matrix effect or electrode passivation. GCE/CNT-PEI was successfully used to study how the DA reuptake process is affected in samples obtained from the CNS of laboratory animals with various neurodegenerative pathologies in a simple, rapid and economical way.

On the other hand, a new 2D hybrid nanomaterial was synthesized resulting from the reduction of graphene oxide (RGrO) in situ, through the formation of melanic polymers from monomers such as *L*-Dopa (Poly-*L*-Dopa) by ultrasound. The spectroscopic and microscopic characterization of the resulting material confirms the formation of the polymer and the simultaneous reduction of the graphene sheets. RGrO-Poly-*L*-Dopa presents excellent properties for the oxidation-reduction of different analytes, confirmed by various electrochemical experiments. The results obtained for the unprecedented and extremely novel and low-cost quantification of firearm gunshot residues such as lead and antimony in samples obtained from a forensic polygon are presented. A simple way to obtain and process samples of gunshot residue from different firearms, with different cartridges and varying the deflagration distance, is proposed. It is extremely important to highlight that these results allow us to venture, for the first time, into an unexplored field that is very current in our country, such as forensic ballistics.

Finally, the synthesis is proposed using electrochemical methodologies, top down and bottom up, of two 1D and 0D materials of carbonaceous nature: electrochemically expanded graphene (GEQE) and Carbon Quantum Dots (CQDots). The optimal synthesis conditions for obtaining both nanomaterials are critically studied and correlated with the observed electrochemical responses. The obtaining of a novel hybrid nanomaterial, formed from these synthesized 2D and 0D nanostructures, is described, which combines the renewed and superior electrochemical properties of the individual nanomaterials. The use of the

nanohybrid is presented for the development of a sensor aimed at the indirect detection of glyphosate with a wide linear range, which allows its quantification in samples of very diverse origin, such as water samples, as well as in formulation samples. of phytosanitary products, resulting in a sensor suitable for environmental or industrial quality control with a quick response and low cost.

The results presented in this thesis conclude that a critical selection of the materials that make up the nanohybrids studied, which combine carbon nanomaterials with biopolymers of different nature and transduction scheme, enables the development of highly sensitive and selective sensors for quantification of analytes of great clinical, forensic and environmental relevance.

This Ph. D. Thesis is pioneering and innovative in the application of electrochemical techniques for the quantification of hot topical analytes, allowing us to respond to real problems of society related to both clinical and pharmacological chemistry, as well as laying the foundations in the area. forensic, providing for the first time tools to solve criminal acts. On the other hand, it contributes with new methodologies for environmental control allowing not only the detection, but also the quantification of controversial herbicides widely used today.

### **Chapters of this Ph. D. Thesis and Keywords**

The main challenge of Analytical Chemistry today focuses on the design and preparation of new highly sensitive, reproducible, robust, miniaturizable, portable sensor platforms capable of quickly, selectively and simultaneously quantifying various analytes in previously unthinkable scenarios. In this sense, this Thesis work focuses on the pioneering development of electro-analytical systems based on the rational design of different nanostructured electrode supports that allow the sensitive and selective quantification of analytes of clinical, forensic and environmental relevance, facilitating decision making. immediately with the information obtained. To this end, the careful synthesis of various types of hybrid nanomaterials from carbon and polymer nanostructures was studied. The new materials were immobilized on glassy carbon (GCE) substrates with the aim of building analytical platforms for the development of electrochemical sensors aimed at the quantification of analytes of relevance in hot topical areas, such as neurodegenerative diseases, forensic determination of gunshot residues and the detection of controversial and widely used herbicides with implications not only for health but also at an environmental level.

CHAPTER 1 shows a general introduction about the properties and synthesis methodologies of novel hybrid nanomaterials aimed at the design of electrochemical sensors. The different strategies and methodologies used for the incorporation of nanomaterials on conductive substrates are described, which will allow the subsequent highly sensitive and selective detection of the analytes of interest.

CHAPTER 2 discusses the foundations and the most representative techniques used for the development of this Ph. D. Thesis and the methodologies used to obtain the results.

CHAPTER 3 shows the synthesis, through non-covalent functionalization, and characterization of a 1D hybrid composed of carbon nanotubes (CNT) with a bio-polymer such as polyethyleneimine (PEI). The electrochemical properties of the resulting nanomaterial are discussed, after its immobilization on GCE, and both the spectroscopic and microscopic characterization of CNT-PEI which allow us to understand its properties and scope. The use of the GCE/CNT-PEI sensor is proposed for quantification in a simple way, with low detection limits and in the presence of brain samples from laboratory animals, with various neurodegenerative pathologies, with extremely promising results to elucidate the changes in the reuptake of dopamine (DA) in the central nervous system (CNS). It should be noted that interdisciplinary work in this area of research is what made possible the use of GCE/CNT-PEI for clinical and pharmacological studies that allowed the validation of studies aimed at being used as a tool for the treatment of various CNS disorders.

CHAPTER 4 presents the development of a new 2D hybrid nanomaterial resulting from the reduction of graphene oxide (RGrO) in situ, through the formation of melanic polymers from monomers such as *L*-Dolpa (Poly-*L*-Dopa) by ultrasound. The effect of the synthesis conditions on the electrochemical response of the platform is analyzed and the spectroscopic and microscopic characterization of the resulting material is presented.

In CHAPTER 5, the use of RGrO-Poly-*L*-Dopa is proposed for the construction of a sensor platform for the detection of hydrogen peroxide in samples of pharmaco-bromatological interest. On the other hand, the optimization of the experimental parameters (preconcentration time, reduction potential, reduction time and composition of the reducing medium) is discussed for the application of the sensor in the simultaneous and interference-free quantification of lead and antimony in the order of ppb. The results obtained for the novel and low-cost quantification of these metals in forensic samples are presented. A simple way to obtain and process samples of gunshot residue from different firearms, with different

cartridges and varying the deflagration distance, is proposed, all of them obtained in a forensic polygon by criminal experts. It is extremely important to highlight that these results allow us to venture, for the first time, into a very little explored and highly topical field, such as forensic ballistics.

CHAPTER 6 proposes the synthesis using electrochemical methodologies, top down and bottom up, of two carbonaceous materials: electrochemically expanded graphene (GEQE) and Carbon Quantum Dots (CQDots). The optimal synthesis conditions for obtaining both nanomaterials are critically studied and correlated with the observed electrochemical responses. The obtaining of a novel hybrid nanomaterial, formed from these synthesized 2D and 0D nanostructures, is described, which combines the renewed and superior electrochemical properties of the individual nanomaterials.

CHAPTER 7 presents the use of the nanohybrid, immobilized on GCE, for the development of a sensor aimed at the indirect detection of glyphosate (Gly) with a wide linear range, which makes it possible to use it for the quantification of the analyte of interest in samples of very diverse origin, such as water samples, as well as in samples of phytosanitary product formulations, resulting in a sensor suitable for environmental or industrial quality control with a quick response and low cost.

Finally, CHAPTER 8 presents the general conclusions of this Ph. D. Thesis.

**Keywords:** *electrochemical sensor; nanohybrid; carbon nanomaterials; carbon nanotubes; graphene oxide; electrochemically expanded grapheme; Carbon Quantum Dots; monomer; polymer; dopamine; lead; antimony; glyphosate; neurodegenerative diseases; forensic ballistics; environmental control.*

---

## **Estudio del efecto de flavonoides naturales sobre la bomba de calcio de membrana plasmática.**

Mallku Qhapaj Ontiveros

Tesis de Doctorado para optar al grado académico superior de Doctor en Bioquímica – Premio AQA: “Dr. Enrique Herrero Ducloux 2023”. Directora de Tesis: Prof. Dra. Mariela Ferreira Gomes. Directora Adjunta: Dra. Irene Mangialavori.

Instituto de Química y Físicoquímica Biológicas “Prof. Dr. Alejandro C. Paladini”, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. e-mail: chemaiky@hotmail.com; mallkuontiveros@gmail.com

Recibido: 28 de junio de 2023

Aceptado: 27 de julio de 2023

---

El  $\text{Ca}^{2+}$  es uno de los segundos mensajeros más importantes y forma parte de numerosas vías de señalización celular. Su concentración citosólica en la célula en reposo se encuentra finamente regulada dentro de un rango estrecho de valores (100-200 nM) de manera tal de mantener el gradiente electroquímico y así la homeostasis del catión. Alteraciones de los mecanismos de regulación del  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático pueden llevar a su aumento y finalmente repercutir en numerosos procesos celulares. En este sentido, es importante estudiar tanto los mecanismos involucrados en la remoción del  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático como los moduladores de los mismos, ya que estos podrían impactar sobre las vías de señalización dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Las proteínas integrales de membrana representan algunos de los mecanismos involucrados en la remoción del  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático. Dentro de este tipo de proteínas, las P-ATPasas cumplen una función importante en el mantenimiento de la homeostasis celular, localizándose de manera ubicua en las células eucariotas. La bomba de calcio de la membrana plasmática o PMCA (*Plasma Membrane Calcium ATPase*) representa uno de los mecanismos principales en la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático, manteniendo la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático mediante su transporte hacia el exterior celular contra el gradiente electroquímico, impulsado por la hidrólisis de ATP por cada catión transportado.

Los compuestos polifenólicos como los flavonoides, han sido ampliamente estudiados y relacionados a múltiples efectos mediante su capacidad de modular la actividad catalítica de una amplia variedad de enzimas, aunque en algunos casos no se conoce con certeza cuáles son los mecanismos moleculares mediante los cuales ejercen su efecto. Los flavonoides son un grupo

muy amplio de compuestos fitoquímicos con innumerables efectos sobre la fisiología celular. Debido a su consumo en la dieta humana, han sido objeto de estudio en diversas áreas de investigación tanto en el campo de la ciencia básica como en la ciencia aplicada. Entre sus múltiples efectos, han sido relacionados con la modulación de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático.

Estudios en sistemas aislados determinaron que los flavonoides pueden inhibir la actividad de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa del retículo sarcoplasmático (SERCA), proteína ligada íntimamente a la regulación del  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático, además de afectar a otras P-ATPasas como la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa y la  $\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPasa. Existen evidencias del efecto de algunos flavonoides sobre la PMCA, aunque no se detallan los mecanismos de inhibición, ni se profundiza sobre los efectos en sistemas más complejos, como una célula, de forma tal de evaluar si existe una relación entre los efectos en la PMCA aislada y la regulación del  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático.

La presente Tesis Doctoral tiene como objetivos el estudio de la PMCA y los flavonoides naturales, comprendiendo (i) la caracterización del efecto de flavonoides naturales sobre la PMCA purificada como un sistema aislado y (ii) la correlación con experimentos a nivel celular que permitirán evaluar *in vivo* el efecto de los flavonoides sobre la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático y su relación con la función de la PMCA, de modo tal de establecer el alcance fisiológico de esta regulación.

Los resultados obtenidos muestran que: Mediante un ensayo *screening* de flavonoides y posterior análisis de relación estructura-actividad se determinó que los compuestos más activos como inhibidores de la actividad  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de la PMCA fueron aquellos flavonoles con al menos dos  $-\text{OH}$  en el anillo B como la quercetina, con excepciones como el glucósido gospina y la epigallocatequina-3-galato (EGCG). La caracterización de la inhibición de la PMCA por estos flavonoides evidenció la existencia de diferentes mecanismos por los cuales afectaban la actividad de la PMCA. La inhibición de la actividad  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de la PMCA por quercetina y gospina fue potenciada por el aumento de la concentración de  $\text{Mg}^{2+}$ , mientras que la inhibición por EGCG no exhibió una inhibición dependiente del aumento de  $\text{Mg}^{2+}$ .

La relación entre la inhibición por quercetina y gospina con la concentración de  $\text{Mg}^{2+}$  indicó un efecto sinérgico debido a la interacción del flavonoide con el  $\text{Mg}^{2+}$  formando un complejo flavonoide- $\text{Mg}^{2+}$ . En base a que los flavonoides pueden formar complejos con diversos metales, se estudió la formación y estabilidad de los complejos quercetina- $\text{Mg}^{2+}$  y gospina- $\text{Mg}^{2+}$

mediante espectroscopía UV-visible, estableciendo que estas especies se formaban en las mismas condiciones experimentales utilizadas para determinar la actividad de la bomba.

La integración de estos resultados con los obtenidos de los estudios funcionales de la PMCA permitió establecer que los complejos flavonoide-Mg<sup>2+</sup> serían los verdaderos inhibidores de la actividad de la PMCA con una afinidad en el orden de nM. Por otro lado, las características ácido-base de los flavonoides permitieron observar la influencia del pH sobre la formación y estabilidad de los complejos quercetina-Mg<sup>2+</sup> y gossipina-Mg<sup>2+</sup>, obteniendo las primeras evidencias de un doble mecanismo de inhibición de los flavonoides. De este modo, los flavonoides pueden inhibir a la PMCA mediante una interacción directa a pH 6,8, independiente de la formación de complejo, pero también mediante una interacción como complejo flavonoide-Mg<sup>2+</sup> a pH  $\geq 7,4$ .

El estudio del mecanismo de inhibición de la quercetina y gossipina libre, sus complejos y EGCG en relación a las reacciones parciales del ciclo catalítico de la PMCA, determinó que a pH 6,8, la quercetina y gossipina libres inhiben la actividad de la PMCA afectando la fosforilación de la enzima (EP). A pH 7,8 el complejo quercetina-Mg<sup>2+</sup> inhibe la actividad de la PMCA favoreciendo el EP. La gossipina en estas condiciones exhibió un comportamiento bifásico, es decir, favoreciendo la formación de EP pero seguido de una disminución de la misma. Este efecto bifásico también se observó a pH 7,4 tanto con quercetina como con gossipina, lo que sugiere que la inhibición de la actividad de la PMCA es producto de una combinación de mecanismos dados por la coexistencia de dos especies químicas, el flavonoide libre y el complejo flavonoide-Mg<sup>2+</sup>. La EGCG inhibe la actividad de la PMCA con un aumento de los niveles de EP, porque la interacción del complejo con la enzima permite la unión del ATP y posterior fosforilación de la misma.

El estudio del efecto de la quercetina y gossipina y sus complejos sobre los intermediarios fosforilados (EP), mostró que a pH 6,8, la quercetina y gossipina libres inhiben la actividad de la PMCA disminuyendo los niveles de EP. A pH 7,8, condición donde estaría favorecida la inhibición de la actividad por el complejo quercetina-Mg<sup>2+</sup> se observó un aumento de los niveles de EP. Por otro lado, la gossipina en tales condiciones exhibió un comportamiento bifásico, es decir, aumentando los niveles de EP a bajas concentraciones seguido de una disminución de los niveles de EP a concentraciones mayores. De acuerdo con lo observado a pH 6,8, es posible que

la disminución de los niveles de *EP*, este dada por la acción del flavonoide libre. Este efecto bifásico también se observó a pH 7,4 tanto con quercetina como con gopipina, lo que sugiere que la inhibición de la actividad de la PMCA es producto de una combinación de mecanismos dados por la coexistencia de dos especies químicas, el flavonoide libre y el complejo flavonoide-Mg<sup>2+</sup>. En el caso de la EGCG, se observó un aumento de los niveles de *EP* en condiciones donde este flavonoide inhibe la actividad de la PMCA.

El aumento de los niveles de *EP* en condiciones donde la actividad de la bomba está inhibida indica que el paso de desfosforilación está bloqueado generando una acumulación de los intermediarios *EP*. Estas observaciones sugieren que tanto EGCG como los complejos quercetina-Mg<sup>2+</sup> y gopipina-Mg<sup>2+</sup> podrían unirse a un sitio diferente del sitio del ATP o si se unieran al sitio de ATP tendría que ser posterior a la fosforilación de la enzima.

Para estudiar si el efecto observado en sistemas aislados podría suceder en una célula viva, se realizaron estudios en cultivos de células HEK293T (*Human Embryonic Kidney 293T*). En primer lugar, se evaluó la capacidad de ingreso a las células que tienen los flavonoides y, en segundo lugar, el impacto de tales flavonoides sobre la dinámica del Ca<sup>2+</sup> citoplasmático cuando las células sobreexpresan la isoforma 4b de la PMCA humana (hPMCA4b). Los resultados obtenidos muestran que: la quercetina y la gopipina pueden ingresar al interior de las células HEK293T, distribuyéndose a través de la membrana plasmática hasta el citoplasma y llegando a las membranas internas hasta el núcleo. Además, en células HEK293T que sobreexpresan la hPMCA4b, la quercetina, gopipina y EGCG afectaron la eficiencia de remoción de Ca<sup>2+</sup> citoplasmático ante un estímulo dado, resultando efectivos para reducir la remoción de Ca<sup>2+</sup> citoplasmático. Dadas las condiciones experimentales del sistema, este efecto se relaciona a la inhibición de la PMCA sobreexpresada ya sea de manera directa o indirecta.

Tal efecto, se evidenció como una inhibición de la actividad de la hPMCA4b en las células. Estos resultados sugieren que los efectos de quercetina, gopipina y EGCG observados en la PMCA purificada podrían tener lugar en el citoplasma, donde los flavonoides interaccionan con los dominios citoplasmáticos de la PMCA de manera directa o mediante complejos de Mg<sup>2+</sup>. Sin embargo, dada la complejidad de una célula no es posible descartar que el efecto observado pueda ser indirecto.

Más allá de la complejidad del mecanismo biológico de los flavonoides en las células, los resultados indican que estos compuestos podrían comportarse como moduladores de la



concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático, y finalmente impactar sobre las vías de señalización dirigidas por el  $\text{Ca}^{2+}$  como segundo mensajero e influir sobre el desarrollo de patologías ligadas a la pérdida de la homeóstasis de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular.

--

### **Study of the effect of natural flavonoids on the plasma membrane calcium pump**

$\text{Ca}^{2+}$  is one of the most important second messengers and is part of numerous cell signaling pathways. Its cytosolic concentration in the resting cell is finely regulated within a narrow range of values (100-200 nM) in such a way as to maintain the electrochemical gradient and thus, cation homeostasis. Alterations in the cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  regulation mechanisms can lead to an increase in cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  and ultimately impact numerous cellular processes. In this sense, it is important to study both the mechanisms involved in the removal of cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  and their modulators, since these could impact  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent signaling pathways.

Integral membrane proteins represent some of the mechanisms involved in the removal of cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$ . Within this type of proteins, P-ATPases play an important role in maintaining cellular homeostasis, being ubiquitously located in eukaryotic cells. The plasma membrane calcium pump or PMCA (Plasma Membrane Calcium ATPase) represents one of the main mechanisms in the homeostasis of cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$ , keeping cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration by transporting it out of the cell against the electrochemical gradient, driven by the ATP hydrolysis for each cation transported.

Polyphenolic compounds such as flavonoids have been widely studied and related to multiple effects through their ability to modulate the catalytic activity of a wide variety of enzymes, although in some cases it is not known with certainty which are the molecular mechanisms involved. Flavonoids are a very broad group of phytochemical compounds with countless effects on cellular physiology. Due to flavonoid consumption in the human diet, they have been the subject of study in various research areas both in the field of basic science and applied science. Among multiple effects, flavonoids have been related to the modulation of cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis.

Studies in isolated systems determined that flavonoids can inhibit the activity of the sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA), a protein closely linked to the regulation of

cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$ , in addition to affecting other P-ATPases such as  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase and  $\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPase. There is evidence of the effect of some flavonoids on PMCA, although the inhibition mechanisms are not detailed, nor are the effects in more complex systems, such as a cell, in order to evaluate whether there is a relationship between the effects on the isolated PMCA and the regulation of cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$ .

The aims of this Ph. D. Thesis are the study of PMCA and natural flavonoids, including (i) the characterization of the effect of natural flavonoids on purified PMCA as an isolated system, and (ii) the correlation with experiments at the cellular level that will allow the evaluation *in vivo* of the effect of flavonoids on the cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$  concentration and its relationship with the function of PMCA in order to establish the physiological scope of this regulation.

The results show that: through a flavonoid screening assay and subsequent structure-activity relationship analysis, it was determined that the most active compounds as inhibitors of the  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity of PMCA were those flavonols containing at least two OH in B-ring, such as quercetin, except for the glucoside gossypin and epigallocatechin-3-gallate (EGCG). The characterization of the inhibition of PMCA by these flavonoids showed the existence of different mechanisms by which they affected the activity of PMCA. The inhibition of the  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity of PMCA by quercetin and gossypin was potentiated by the increase in  $\text{Mg}^{2+}$  concentration, while inhibition by EGCG did not exhibit an inhibition dependent on increasing  $\text{Mg}^{2+}$ .

The relationship between inhibition by quercetin and gossypin with  $\text{Mg}^{2+}$  concentration indicated a synergistic effect due to the interaction of the flavonoid with  $\text{Mg}^{2+}$  forming a flavonoid-  $\text{Mg}^{2+}$  complex. The formation and stability of the quercetin- $\text{Mg}^{2+}$  and gossypin-  $\text{Mg}^{2+}$  complexes was studied by UV-visible spectroscopy, establishing that these species are the true inhibitor of PMCA. The acid-base characteristics of the flavonoids allowed us to observe the influence of pH on the formation and stability of the complexes, obtaining the first evidence of a double inhibition mechanism of the flavonoids. Thus, flavonoids can inhibit PMCA through a direct interaction, independent of complex formation, but also through an interaction as a flavonoid- $\text{Mg}^{2+}$  complex. Based on the fact that flavonoids can form complexes with various metals, the formation and stability of the quercetin- $\text{Mg}^{2+}$  and gossypin- $\text{Mg}^{2+}$  complexes were studied using UV-visible spectroscopy, establishing that these species were formed under the same experimental conditions used to determine the pump activity.

The integration of these results with those obtained from the functional studies of PMCA led to establish that the flavonoid-Mg<sup>2+</sup> complexes would be the true inhibitors of PMCA activity with an affinity in the nM order. On the other hand, the acid-base characteristics of the flavonoids allowed us to study the influence of pH on the formation and stability of the quercetin-Mg<sup>2+</sup> and gossypin-Mg<sup>2+</sup> complexes, thus obtaining the first evidence of a double inhibition mechanism of the flavonoids. Therefore, flavonoids can inhibit PMCA through a direct interaction at pH 6.8, independent of complex formation, but also through an interaction as a flavonoid-Mg<sup>2+</sup> complex at pH  $\geq 7.4$ .

The study of the inhibition mechanism of free quercetin and gossypin, their complexes and EGCG in relation to the partial reactions of the PMCA catalytic cycle, determined that at pH 6.8, free quercetin and gossypin inhibit PMCA activity, affecting enzyme phosphorylation (*EP*). At pH 7.8, the quercetin-Mg<sup>2+</sup> complex inhibits PMCA activity, favoring *EP*. Under these conditions, gossypin exhibited a biphasic behavior, that is, favoring *EP* formation, but followed by a decrease in it. This biphasic effect was also observed at pH 7.4 with both quercetin and gossypin, suggesting that the inhibition of PMCA activity is the product of a combination of mechanisms given by the coexistence of two chemical species, the free flavonoid and the flavonoid-Mg<sup>2+</sup> complex. EGCG inhibits PMCA activity with an increase in *EP* levels, because the interaction of the complex with the enzyme allows the binding of ATP and its subsequent phosphorylation.

The increase in *EP* levels in conditions where pump activity is inhibited indicates that the dephosphorylation step is blocked, generating an accumulation of *EP* intermediates. These observations suggest that both EGCG and the quercetin-Mg<sup>2+</sup> and gossypin-Mg<sup>2+</sup> complexes could bind to a site different from the ATP site or if they were to bind to the ATP site it would have to occur after enzyme phosphorylation.

To study whether the effect observed in isolated systems could happen in a living cell, studies were carried out in cultures of HEK293T (*Human Embryonic Kidney 293T*) cells. First, the ability of flavonoids to enter cells was evaluated and, second, the impact of such flavonoids on the dynamics of cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> when cells overexpress the 4b isoform of human PMCA (hPMCA4b). Results show that quercetin and gossypin can enter the interior of HEK293T cells, distributing through the plasma membrane to the cytoplasm and reaching the internal membranes to the nucleus. Furthermore, in HEK293T cells that overexpress hPMCA4b, quercetin, gossypin and EGCG affected (decreased) the efficiency of cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> removal under a given stimulus. Given the experimental conditions of

the system, this effect is related to the inhibition of overexpressed PMCA either directly or indirectly.

This effect was evidenced as an inhibition of the activity of hPMCA4b in the cells. These results suggest that the effects of quercetin, gossypin and EGCG observed in purified PMCA could take place in the cytoplasm, where flavonoids could interact with the cytoplasmic domains of PMCA directly or through  $Mg^{2+}$  complexes. However, given the complexity of a cell, it is not possible to rule out that the observed effect could be indirect.

Beyond the complexity of the biological mechanism of flavonoids in cells, the results indicate that these compounds could behave as modulators of cytoplasmic  $Ca^{2+}$  concentration, and finally, impact the signaling pathways directed by  $Ca^{2+}$  as a second messenger and influence the development of pathologies linked to the loss of intracellular  $Ca^{2+}$  homeostasis.

---

## **Estudio didáctico epistemológico sobre la enseñanza y el aprendizaje de temas de biología celular y química biológica.**

### **Parte A: Estudios con la mediación de un videojuego ambientado en una célula 3D.**

### **Parte B: Análisis de obstáculos comunicacionales en el procesamiento de la información de un texto sobre desnaturalización proteica**

Natalia Ospina Quintero

Tesis de Doctorado para optar al grado académico superior de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Química Biológica - Premio AQA: "Investigación en Educación en Química 2023".  
Directoras de Tesis: Prof. Dra. Lydía Galagovsky y Prof. Dra. Graciela Merino.

Instituto de Investigaciones en Didáctica de las Ciencias Naturales y la Matemática (CEFIEC),  
Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FCEN), Universidad  
de Buenos Aires (UBA). e-mail: natalia.ospina@unisimonbolivar.edu.co

*Recibido: 10 de julio de 2023*

*Aceptado: 15 de agosto de 2023*

---

La presente Tesis Doctoral constituye una contribución original respecto de las complejidades subyacentes a la enseñanza y el aprendizaje de modelos de Biología Celular y de Química Biológica.

Considerando como punto de partida que el procesamiento de información depende de los marcos teóricos preexistentes en cada sujeto, la investigación presenta evidencias sobre dos tipos de dificultades que operan en los fenómenos de adquisición de conocimientos específicos: en la Parte A se profundiza sobre obstáculos epistemológicos de aprendizaje de los modelos de célula, lisosomas y endocitosis, y mitocondrias y síntesis de ATP. En la Parte B se muestran dificultades en la comprensión a partir de la lectura de un texto sobre desnaturalización reversible de proteínas.

La investigación se configuró en dos instancias metodológicas claramente diferentes, de tipo cualitativo, en correspondencia con los objetivos de sendas Partes A y B. Las poblaciones convocadas para el análisis también fueron diferentes: en la Parte A se convocaron estudiantes que desconocían contenidos de Biología Celular y -posteriormente- estudiantes avanzados de Profesorados en Biología y Química. En la Parte B, se convocaron estudiantes de primer y segundo año de las carreras universitarias de Biología (FCEN-UBA) y Bioquímica (Facultad de Farmacia y Bioquímica (FFyB)-UBA), y a cuatro expertos, tres en Química Biológica y uno en Físico-Química.

Los dispositivos didácticos mediadores de los discursos de enseñanza fueron: un videojuego educativo ambientado en un modelo de célula 3D, en la Parte A; y, un apartado de

un texto de Bioquímica utilizado en materias de introducción a la Bioquímica universitaria, en la Parte B.

Las fallas de aprendizaje detectadas en la Parte A derivaron en necesarias reflexiones histórico-epistemológicas para la reconstrucción de los modelos científicos de célula, lisosoma y endocitosis, y mitocondria y síntesis de ATP, desde las fuentes literarias donde fueron comunicadas inicialmente, hasta el análisis de la evolución de dichos modelos en textos de enseñanza. La complejidad del texto sobre desnaturalización reversible de proteínas detectada en la Parte B condujo a la reconstrucción histórico-epistemológica sobre la construcción de dicho modelo. Para dichas reconstrucciones debieron analizarse numerosos artículos científicos publicados durante décadas de investigaciones, muchas de ellas de investigadores merecedores de Premios Nobel.

Las hipótesis planteadas en cada parte de la Tesis derivaron en conclusiones didáctico-epistemológicas originales, que son fuertes sugerencias innovadoras para utilizar tanto para la enseñanza de conceptos centrales de la Biología Celular, como fuentes de reflexión para la escritura de textos de Bioquímica.

***Palabras clave:** Enseñanza; Célula; Lisosomas y endocitosis; Mitocondrias y síntesis de ATP; Desnaturalización reversible de proteínas; Didáctica de la Bioquímica.*

--

## **Epistemological didactic study on teaching and learning topics in cell biology and biological chemistry.**

### **Part A: Studies mediated by a video game set in a 3D cell.**

### **Part B: Analysis of communication obstacles in the processing of information from a text on protein denaturation**

The present Ph. D. Thesis constitutes an original contribution regarding the underlying complexities to the teaching and learning of particular Cell Biology and Biochemistry models.

Considering as a starting point that the information processing depends on the pre-existing learnt frameworks in each person, the research presents pieces of evidence on two kinds of difficulties that operate in the acquisition of specific knowledge phenomena:

Part A introduces the epistemological obstacles during teaching and learning of cell, lysosomes and endocytosis, and mitochondria and ATP synthesis. Part B shows understanding difficulties while reading a text about reversible denaturation of proteins.

The research was set up in two clearly different qualitative type methodological instances, according to the research objectives of Parts A and B. The populations convened for the analysis were also different: in Part A, involved both students who did not know Cell Biology contents and advanced students to be Biology and Chemistry teachers. In Part B, were convened students from first and second year of two university careers: Biology (FCEN-UBA) and Biochemistry (FFyB-UBA), and four experts, three of them in Biological Chemistry and one in Physical Chemistry.

The teaching devices used to trigger subject's discourses were: an educational videogame set in a 3D cell model, in Part A; and, a brief Biochemistry text belonging to an introductory book used in university Biochemistry courses, in Part B.

The learning failures detected in Part A conducted to historical-epistemological reflections about the construction of the scientific models on cell, lysosome and endocytosis, and mitochondria and ATP synthesis (Part A) and reversible denaturation of proteins (Part B). Studies analysed original literary sources of scientific communication, as well as the evolution of those models in teaching textbooks. Numerous scientific articles published during decades of research had to be analyzed, many of them belonging to Nobel Prize-winning scientists.

The hypotheses raised in each part of this Ph. D. Thesis have derived in original science education conclusions, which are strong innovative suggestions to apply in the teaching of Cellular Biology central concepts as well as reflective ideas for the writing of Biochemistry texts.

**Keywords:** *Teaching; Cell; Lysosomes and endocytosis; Mitochondria and ATP synthesis; Reversible protein denaturation; Biochemistry Education.*

--

## **Estudio didáctico epistemológico sobre la enseñanza y el aprendizaje de aspectos redox de la respiración celular**

Martín Sebastián Pégola

Tesis de Doctorado para optar al grado académico superior de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Química Biológica - Premio AQA: "Investigación en Educación en Química 2023".

Directora de Tesis: Dra. Lydia Galagovsky.

Instituto de Investigaciones en Didáctica de las Ciencias Naturales y la Matemática – CEFIEC, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. e-mails: [martinpergola@gmail.com](mailto:martinpergola@gmail.com); [martinpergola@ccpems.exactas.uba.ar](mailto:martinpergola@ccpems.exactas.uba.ar)

*Recibido: 10 de julio de 2023*

*Aceptado: 15 de agosto de 2023*

---

La presente Tesis Doctoral constituye una investigación respecto de la enseñanza y el aprendizaje de temas de Química Biológica insertos en la respiración celular de eucariotas. Para llevar adelante el presente estudio se implementaron métodos de investigación tanto cuantitativos como cualitativos. Se trabajó, principalmente, con tres poblaciones de estudiantes: una de nivel secundario y dos de nivel universitario, del Ciclo Básico Común (primer año universitario) y de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, ambas de la Universidad de Buenos Aires.

Los marcos teóricos utilizados han provenido de la Didáctica de las Ciencias, en tanto contexto multidisciplinario que engloba visiones epistemológicas, históricas y sobre la comunicación entre expertos y novatos. Los modelos, las argumentaciones, los lenguajes, y la evolución de los conocimientos científicos han sido premisas para el análisis de discursos explicativos –de textos de enseñanza– sobre la analogía entre respiración química y reacción global de la respiración celular, y sobre la cadena de transporte de electrones en mitocondrias. Asimismo, los marcos teóricos han sostenido el diseño de dispositivos de indagación originales, que fueron aplicados para relevar eficiencias en el aprendizaje de estudiantes de primer y cuarto año universitarios sobre dichos contenidos.

En la Parte A de la Tesis se presenta el diseño de una propuesta original de enseñanza de Química en contexto sobre el concepto de combustión química. Su aplicación en población de estudiantes de nivel secundario muestra resultados muy satisfactorios, al mismo tiempo que revela obstáculos implícitos subyacentes en los docentes frente a desafíos de metodologías innovadoras de enseñanza.



En la Parte B se realiza, por un lado, un análisis histórico-epistemológico de la analogía entre respiración celular y combustión de la glucosa; y, por otro lado, el uso de dicha analogía en clases y libros de texto de nivel universitario. Finalmente, se indaga sobre el impacto de la aplicación de dicha analogía en la enseñanza, encontrándose obstáculos epistemológicos de aprendizaje, particularmente en los estudiantes del primer año universitario.

En la Parte C de la Tesis se presenta un análisis histórico-epistemológico sobre aspectos redox de la respiración celular en mitocondrias desde el siglo XVIII hasta la actualidad, con particular énfasis en el análisis del modelo de Cadena de Transporte de Electrones, sus componentes estructurales y la participación de cofactores. Asimismo, se indaga sobre el impacto de la enseñanza universitaria de estos temas, encontrándose nuevos y reiterados obstáculos epistemológicos de aprendizaje, particularmente en estudiantes del primer año universitario.

En la Parte D de la Tesis se presenta una propuesta de enseñanza para poner en evidencia el transporte de electrones en la respiración celular, mediante experimentos que simulan un mecanismo de respiración aeróbica para bacterias anaeróbicas (que no poseen mitocondrias), en dispositivos conocidos como Celdas de Combustibles Microbianas Sedimentarias.

Esta Tesis realiza aportes histórico-epistemológico-didácticos originales en dos dimensiones, una vinculada con las visiones integradas para la enseñanza de aspectos redox de la respiración celular, y la otra sobre el diseño de instrumentos.

Si bien estos instrumentos son utilizados en el presente contexto para la indagación sobre aprendizajes de las respectivas temáticas, podrán ser utilizados también como dispositivos de enseñanza, por su posible potencia didáctica para suscitar reflexiones metacognitivas y ayudar a los estudiantes a superar obstáculos conceptuales durante sus respectivos procesos de aprendizaje.

### **Trabajos publicados derivados de la presente investigación**

Los resultados de la presente investigación han sido comunicados en revistas científicas del área de la enseñanza de las ciencias, química y química biológica. Una parte importante de la investigación presentada en esta Tesis aún no fue publicada y resta organizar publicaciones y presentaciones que den cuenta del análisis, resultados y conclusiones presentado en este trabajo.

Las publicaciones y presentaciones en eventos científicos realizadas hasta el presente son:

## Publicaciones en revistas científicas con referato

- Pégola M., Galagovsky L. Estudio didáctico-epistemológico sobre la relación entre los modelos de respiración celular y de combustión. *Revista de Educación en Biología* 2020; 23 (1): 49-63. ISSN: 0329-5192, ISSN (online): 2344-9225. Recuperado de <https://revistas.unc.edu.ar/index.php/revistaadbia/article/view/28149>.
- Pégola M., Galagovsky L. Enseñanza en contexto: la importancia de revelar obstáculos implícitos en docentes. *Enseñanza de Las Ciencias* 2020; 38 (2): 45–64. ISSN: 0212-4521, ISSN (digital): 2174-6486. doi.org/10.5565/rev/ensciencias.2822.
- Sánchez Díaz I., Pégola M., Valente B., Galagovsky L., Di Fuccia D. Chemie im Kontext Adaption in Spain and Argentina: The Students View. *Scientia in Educatione* 2018; 9 (2): 131-145. Praga, República Checa. ISSN 1804-7106. <https://ojs.cuni.cz/scied/article/view/1028/905>.
- Bonetto M.C., Cortón E., Pégola M., Sacco M. Biosensores y celdas de combustible microbianas: Ciencia con texto. *Química Viva* 2017; 17 (1), Depto. de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina. ISSN 1666-7948 <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/v17n1/E0098.html>.
- Pégola M., Galagovsky L. Química en Contexto. Una experiencia didáctica en Argentina. *Revista de Enseñanza de las Ciencias* 2017; Vol. Extraordinario, Septiembre 2017 ISSN: 0212-4521, ISSN (digital): 2174-6486.
- Valente B., Pégola M., Galagovsky L. Experiencia didáctica a partir del tema hidrocarburos en la materia Química, de quinto año de escuela secundaria. *The Journal of the Argentine Chemical Society – Anales de la Asociación Química Argentina* 2016; 103 (1-2): January-December 2016. ISSN: 1852-1207.
- Pégola M., Goyeneche M.A., Rodríguez M.L., Sánchez Díaz I., Di-Fuccia D., Galagovsky L. Investigación sobre enseñanza en contexto del tema petróleo: Aportes de estudiantes de profesorado. *The Journal of the Argentine Chemical Society - Anales de la Asociación Química Argentina* 2015; 102 (1-2): 593-596. ISSN: 1852-1207.
- Pégola M., Valente B., Sánchez Díaz I., Di-Fuccia D., Galagovsky L. Investigación sobre enseñanza de petróleo en contexto: Aportes de estudiantes de una escuela secundaria. *The Journal of the Argentine Chemical Society - Anales de la Asociación Química Argentina* 2015; 102 (1-2): 600-604. ISSN: 1852-1207.

--

### Epistemological didactic study on teaching and learning redox aspects of cellular respiration

This Ph. D. Thesis constitutes an investigation regarding the teaching and learning of Biological Chemistry topics inserted in the cellular respiration of eukaryotes. To carry out this study, both quantitative and qualitative research methods were implemented. We worked mainly with three populations of students: one at the secondary level and two at the university level, from the Common Basic Cycle (first year of university) and from the Faculty of Exact and Natural Sciences, both from the University of Buenos Aires.

The theoretical frameworks used have come from Science Didactics, as a multidisciplinary context that encompasses epistemological, historical and communication views between experts and novices. The models, arguments, languages, and the evolution of scientific

knowledge have been premises for the analysis of explanatory discourses – of teaching texts – on the analogy between chemical respiration and the global reaction of cellular respiration, and on the chain of Electron transport in mitochondria. Likewise, the theoretical frameworks have supported the design of original inquiry devices, which were applied to reveal efficiencies in the learning of first and fourth year university students about said contents.

In Part A of this Ph. D. Thesis, the design of an original proposal for teaching Chemistry in context on the concept of chemical combustion is presented. Its application in a population of secondary level students shows very satisfactory results, at the same time that it reveals underlying implicit obstacles in teachers facing the challenges of innovative teaching methodologies.

In Part B, on the one hand, a historical-epistemological analysis of the analogy between cellular respiration and glucose combustion is carried out; and, on the other hand, the use of said analogy in university-level classes and textbooks. Finally, the impact of the application of said analogy in teaching is investigated, finding epistemological learning obstacles, particularly in first-year university students.

In Part C of this Ph. D. Thesis, a historical-epistemological analysis is presented on redox aspects of cellular respiration in mitochondria from the 18th century to the present, with particular emphasis on the analysis of the Electron Transport Chain model, its structural components and the participation of cofactors. Likewise, the impact of university teaching on these topics is investigated, finding new and repeated epistemological learning obstacles, particularly in first-year university students.

In Part D of this Ph. D. Thesis, a teaching proposal is presented to highlight the transport of electrons in cellular respiration, through experiments that simulate an aerobic respiration mechanism for anaerobic bacteria (which do not have mitochondria), in devices known as Cells. of Sedimentary Microbial Fuels.

This Ph. D. Thesis makes original historical-epistemological-didactic contributions in two dimensions, one linked to integrated visions for teaching redox aspects of cellular respiration, and the other on the design of instruments.

Although these instruments are used in the present context for research on learning the respective topics, they may also be used as teaching devices, due to their possible didactic power to provoke metacognitive reflections and help students overcome conceptual obstacles during their respective learning processes.

**Publications derived from this research:**

The results of this research have been reported in scientific journals in the area of science education, chemistry and biological chemistry. An important part of the research presented in this Ph. D. Thesis has not yet been published and it remains to organize publications and presentations that reflect the analysis, results and conclusions presented in this work.

The publications carried out to date are:

**Publications in peer-reviewed scientific journals:**

- Pégola M., Galagovsky L. Estudio didáctico-epistemológico sobre la relación entre los modelos de respiración celular y de combustión. *Revista de Educación en Biología* 2020; 23 (1): 49-63. ISSN: 0329-5192, ISSN (online): 2344-9225. Recuperado de <https://revistas.unc.edu.ar/index.php/revistaadbia/article/view/28149>.
- Pégola M., Galagovsky L. Enseñanza en contexto: la importancia de revelar obstáculos implícitos en docentes. *Enseñanza de Las Ciencias* 2020; 38 (2): 45–64. ISSN: 0212-4521, ISSN (digital): 2174-6486. doi.org/10.5565/rev/ensciencias.2822.
- Sánchez Díaz I., Pégola M., Valente B., Galagovsky L., Di Fuccia D. Chemie im Kontext Adaption in Spain and Argentina: The Students View. *Scientia in Educatione* 2018; 9 (2): 131-145. Praga, República Checa. ISSN 1804-7106. <https://ojs.cuni.cz/scied/article/view/1028/905>.
- Bonetto M.C., Cortón E., Pégola M., Sacco M. Biosensores y celdas de combustible microbianas: Ciencia con texto. *Química Viva* 2017; 17 (1), Depto. de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina. ISSN 1666-7948 <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/v17n1/E0098.html>.
- Pégola M., Galagovsky L. Química en Contexto. Una experiencia didáctica en Argentina. *Revista de Enseñanza de las Ciencias* 2017; Vol. Extraordinario, Septiembre 2017 ISSN: 0212-4521, ISSN (digital): 2174-6486.
- Valente B., Pégola M., Galagovsky L. Experiencia didáctica a partir del tema hidrocarburos en la materia Química, de quinto año de escuela secundaria. *The Journal of the Argentine Chemical Society – Anales de la Asociación Química Argentina* 2016; 103 (1-2): January-December 2016. ISSN: 1852-1207.
- Pégola M., Goyeneche M.A., Rodríguez M.L., Sánchez Díaz I., Di-Fuccia D., Galagovsky L. Investigación sobre enseñanza en contexto del tema petróleo: Aportes de estudiantes de profesorado. *The Journal of the Argentine Chemical Society - Anales de la Asociación Química Argentina* 2015; 102 (1-2): 593-596. ISSN: 1852-1207.
- Pégola M., Valente B., Sánchez Díaz I., Di-Fuccia D., Galagovsky L. Investigación sobre enseñanza de petróleo en contexto: Aportes de estudiantes de una escuela secundaria. *The Journal of the Argentine Chemical Society - Anales de la Asociación Química Argentina* 2015; 102 (1-2): 600-604. ISSN: 1852-1207.

--

## **Biomateriales en la nanoescala. Síntesis de Moléculas y Polímeros Dendríticos para la Obtención de Nanogeles con Potencial Aplicación en Nanomedicina**

Anabella Patricia Rosso

Tesis de Doctorado para optar al grado académico superior de Doctor en Ciencias Químicas.  
Premio AQA: “Dr. Luis Guglielmelli 2023” (Área: Química Orgánica y Bio-Orgánica).  
Directora de Tesis: Prof. Dra. Marisa Martinelli.

Instituto de Investigación y Desarrollo en Ingeniería de Procesos y Química Aplicada (IPQA – CONICET), Laboratorio de Materiales Poliméricos, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. e-mail: [arosso@unc.edu.ar](mailto:arosso@unc.edu.ar)

*Recibido: 28 de septiembre de 2023*

*Aceptado: 19 de octubre de 2023*

---

Aunque los biomateriales aplicados en Biomedicina existen desde hace 9000 años, actualmente el número de aplicaciones ha crecido, son cada vez más versátiles y permanentemente existe una búsqueda para superar más cantidad de limitaciones médicas y/o farmacológicas. Particularmente, ha ido en aumento el interés en los nanomateriales dada las numerosas ventajas que han demostrado tener. Pero el gran desafío se encuentra en lograr el diseño de un buen nanomaterial que cumpla su cometido, y para esto, es necesario apelar a la creatividad de los científicos. Ellos son los que trabajan en el desarrollo de nuevas técnicas de síntesis, aprovechan la posibilidad de utilizar materiales de bajo costo y alta biocompatibilidad o incorporan bloques de construcción novedosos que aumentan el valor agregado al material final.

Es por esto que, el presente trabajo de Tesis, se enfocó en el desarrollo de diferentes estrategias de síntesis y modificación de moléculas dendríticas y polímeros, tanto de origen natural como sintético, para la obtención de biomateriales altamente novedosos de tamaño nanométrico, como así también su caracterización y posibles aplicaciones en campos relacionados con la Biomedicina. En todos los casos, el análisis de los resultados se basó en el estudio de la relación estructura-propiedad.

El trabajo de investigación se dividió en tres etapas principales. En un primer lugar, se planteó la síntesis, purificación y caracterización de diferentes moléculas dendríticas a partir de la modificación de dendrones comerciales, para poder ser utilizados en un futuro como bloques de construcción de diversos biomateriales.

En una segunda etapa, se planteó el diseño y la síntesis de distintos nanomateriales que se dividieron en tres clases: a) nanogeles dendríticos inteligentes, con respuesta a pH y/o temperatura, a partir de monómeros convencionales y un monómero dendrítico, b) nanogeles dendronizados a base de polímeros naturales y c) nanogeles híbridos en los cuales se combinaron materiales de origen natural y sintético. Para el desarrollo de estos nanomateriales se utilizaron diferentes técnicas de síntesis y se utilizaron numerosas técnicas de caracterización físico-químicas.

La última etapa, consistió en estudios de aplicación en biomedicina de algunos de los nanogeles sintetizados, más específicamente orientados a la liberación controlada de fármacos y la utilización de los nanogeles para el desarrollo de microbicidas tópicos para la inhibición del virus del VIH-1.

Los resultados alcanzados han evidenciado la importancia de la funcionalización, particularmente la presencia de un bloque dendrítico, en la relación estructura-propiedad de los nanogeles sintetizados.

El desarrollo de esta Tesis Doctoral destaca la importancia de realizar un correcto diseño de síntesis y una profunda caracterización de los nanomateriales, para lograr una correcta deducción tanto de la arquitectura estructural del sistema como de sus posibles aplicaciones a futuro. El trabajo presentado ha sido posible gracias a la labor interdisciplinaria y al aporte realizado por investigadores de distintas áreas. Debido a la relevancia de los resultados, se espera la continuidad del estudio de aquellos sistemas que demostraron mejor desempeño con potencialidad para el diseño de nuevas plataformas con aplicaciones en Nanomedicina y generar la posibilidad de que finalmente puedan ser utilizados en algunas de las aplicaciones para los que fueron diseñados.

### **BIOMATERIALS AT THE NANOSCALE. Synthesis of Dendritic Molecules and Polymers to Obtain Nanogels with Potential Application in Nanomedicine**

Although biomaterials applied in Biomedicine have existed for 9000 years, currently the number of applications has grown, they are increasingly versatile, and there is constantly a search to overcome more medical and/or pharmacological limitations. In particular, there has been increasing interest in nanomaterials given the numerous advantages they have proven to have. But the great challenge lies in achieving the design of a good nanomaterial that meets its task, and for this, it is necessary to appeal to the creativity of scientists. New synthesis

techniques have been developed to take advantage of the possibility of using low-cost and highly biocompatible materials and incorporating innovative building blocks that increase the added value of the final material.

**This is why this Ph.D. Thesis is focused on the development of different synthesis strategies and modification of dendritic molecules and polymers, both of natural and synthetic origin, to obtain highly novel biomaterials of nanometric size, as well as its characterization and possible applications in fields related to Biomedicine. In all cases, the analysis of the results was based on the study of the structure-property relationship.**

The research was divided into three main stages. In the first place, the synthesis, purification, and characterization of different dendritic molecules from the modification of commercial dendrons were proposed, in order to use them in a future as building blocks of various biomaterials.

In a second stage, the design and synthesis of different nanomaterials were proposed, which were divided into three classes: a) intelligent dendritic nanogels, with response to pH and/or temperature, from conventional monomers and a dendritic monomer; b) dendronized nanogels based on natural polymers, and c) hybrid nanogels in which materials of natural and synthetic origin were combined. For the development of these nanomaterials, different synthesis techniques were used and numerous physical-chemical characterization techniques.

The last stage consisted of application studies in biomedicine of some of the synthesized nanogels, more specifically oriented to the controlled release of drugs and the use of nanogels for the development of topical microbicides for the inhibition of the HIV-1 virus.

The results achieved have shown the importance of functionalization, particularly the presence of a dendritic block, in the structure-property relationship of the synthesized nanogels.

The development of this Ph.D. Thesis highlights the importance of carrying out a correct synthesis design and a deep characterization of the nanomaterials, to achieve a correct deduction of both the structural architecture of the system and its possible future applications. The present research has been possible thanks to the interdisciplinary work and the contribution of researchers from different areas.

Due to the relevance of the results, the continuity of the study is expected for those systems that demonstrated better performance with potential for the design of new platforms with applications in Nanomedicine and that generate the possibility of being used in some of the applications for which they were designed.

## **Papeles cerámicos catalíticos basados en cobalto y cerio impregnados con el método de spray húmedo para ser empleados en filtros de partículas diesel.**

Nicolás Alejandro Sacco

Tesis de Doctorado para optar al grado académico superior de Doctor en Química en el campo de: Catálisis Ambiental – Premio AQA: “Dr. Enrique Herrero Ducloux 2023”. Director de Tesis: Prof. Dr. Ezequiel Banús. Co-Director: Prof. Dr. Juan Pablo Bortolozzi.

Instituto de Investigaciones en Catálisis y Petroquímica (INCAPE, UNL-CONICET), Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral, Ciudad de Santa Fe, Provincia de Santa Fe. e-mails: nsacco@fiq.unl.edu.ar; nicolas.sacco@gmail.com

*Recibido: 11 de julio de 2023*

*Aceptado: 15 de agosto de 2023*

---

Este trabajo de Tesis está orientado al desarrollo de catalizadores estructurados, específicamente papeles cerámicos catalíticos, para su aplicación como filtros de partículas emitidas por motores diesel. La preparación de los catalizadores se realizó en colaboración con el grupo del Instituto de Tecnología Celulósica (ITC), donde se prepararon los sustratos cerámicos. Para ello, se recurrió a un método de preparación de papeles celulósicos convencionales, aunque reemplazando una porción de fibras celulósicas por fibras cerámicas y agregando suspensión coloidal de  $\text{CeO}_2$  como agente ligante de las fibras. Esta primera etapa fue previamente optimizada en otros trabajos de tesis desarrollados en el grupo.

La metodología de trabajo consistió en primera instancia en el desarrollo y optimización del método de impregnación de los precursores catalíticos a escala laboratorio y la evaluación catalítica de las estructuras resultantes en la oxidación de hollín diesel. Luego, se escaló el proceso de preparación y se generaron papeles cerámicos catalíticos para su aplicación como filtros de partículas diesel en un banco de pruebas instalado en la Escuela Industrial Superior. Para el proceso de escalado fue necesario optimizar la síntesis de los papeles cerámicos mediante el incremento de la cantidad de ligante empleada, para la generación de estructuras con mayor resistencia mecánica y flexibilidad adecuada.

Se estudió el efecto de la tensión superficial del solvente de impregnación, y el uso de ácido cítrico en la distribución de la fase activa sobre el sustrato cerámico. La optimización del método



de impregnación se realizó empleando Co-Ce como fases activas y luego, se reprodujeron las condiciones de impregnación para la generación de catalizadores basados en Mn-Ce. Ambos sistemas fueron caracterizados mediante diferentes técnicas analíticas para estudiar las fases presentes y distribución de las mismas sobre los sustratos.

Para los ensayos en banco de pruebas los catalizadores se dispusieron dentro de una carcasa metálica y se siguieron procedimientos estandarizados para evaluar la capacidad de filtración de los mismos empleando un analizador de gases. La carcasa metálica conteniendo los papeles cerámicos catalíticos se conectó a la salida de un motor diesel FIAT. Luego de cada ensayo se obtuvieron valores de opacidad y se compararon con aquellos establecidos por los entes regulatorios y, además sobre cada filtro se depositó una capa de hollín que permitió su posterior evaluación catalítica en laboratorio.

Se lograron preparar catalizadores estructurados activos y eficientes en la combustión y filtración de material particulado diesel respectivamente. Las temperaturas de máxima velocidad de combustión obtenidas con ambas formulaciones (alrededor de 400°C) resultaron mucho menores que aquella correspondiente a la combustión no catalítica del hollín (600°C). Además, los catalizadores resultaron en estructuras estables térmica y químicamente.

Por otra parte, si bien el escalado del método de preparación resultó en catalizadores con cargas metálicas y especies químicas similares a las obtenidas a escala laboratorio, las diferentes variables de preparación (tensión superficial de la solución precursora o uso de ácido cítrico) influyeron considerablemente en la distribución del catalizador en el espesor del sustrato, lo cual, a su vez, influyó en el tipo de contacto hollín-catalizador en las diferentes escalas. Esto, sumado a la diferente naturaleza del hollín obtenido en las diferentes escalas reveló que la performance catalítica de los sistemas preparados no fuese la misma.

Finalmente, mediante los valores de opacidad se pudo concluir que los filtros constituidos a partir de los papeles cerámicos catalíticos desarrollados en esta tesis son altamente eficientes en la retención de material particulado. Además, teniendo en cuenta los valores de caída de presión (en el orden de aquellos registrados para filtros de partículas diesel comerciales), estas estructuras resultan prometedoras para su aplicación como filtros de material particulado.

--

## **Catalytic ceramic papers based on cobalt and cerium impregnated with the wet spray method to be used in diesel particulate filters.**

This Ph. D. Thesis is aimed at the development of structured catalysts, specifically ceramic catalytic papers, for their application as particle filters emitted by diesel engines. The preparation of the catalysts was carried out in collaboration with the group from the Institute of Cellulosic Technology (*Instituto de Tecnología Celulósica: ITC*), where the ceramic substrates were prepared. Therefore, a method for preparing conventional cellulosic papers was used, although replacing a portion of the cellulosic fibers with ceramic fibers, and adding a colloidal suspension of  $\text{CeO}_2$  as a binding agent for the fibers. This first stage was previously optimized in other Ph. D. Thesis developed in the research group.

The methodology consisted, in the first instance, of the development and optimization of the impregnation method for the catalytic precursors on a laboratory scale, and the catalytic evaluation of the structures resulting in the oxidation of diesel soot. Then, the preparation process was scaled up and catalytic ceramic papers were generated for application as diesel particulate filters in a test bench installed at the Higher Industrial School (*Escuela Industrial Superior*). For the scaling process, it was necessary to optimize the synthesis of ceramic papers by increasing the amount of binder used, to generate structures with greater mechanical resistance and adequate flexibility.

The effect of the surface tension of the impregnation solvent, and the use of citric acid on the distribution of the active phase on the ceramic substrate were studied. The optimization of the impregnation method was carried out using Co-Ce as active phases and then, the impregnation conditions were reproduced for the generation of catalysts based on Mn-Ce. Both systems were characterized using different analytical techniques to study the phases present and their distribution on the substrates.

For the testing bench, the catalysts were placed inside a metal casing, and standardized procedures were followed to evaluate their filtration capacity using a gas analyzer. The metal casing containing the catalytic ceramic papers was connected to the output of a FIAT diesel engine. After each test, opacity values were obtained and compared with those established by regulatory entities and, in addition, a layer of soot was deposited on each filter that allowed its subsequent catalytic evaluation in the laboratory.

Active and efficient structured catalysts were prepared in the combustion and filtration of diesel particulate matter, respectively. The maximum combustion speed temperatures obtained with both formulations (around 400°C) were much lower than that corresponding to the non-catalytic combustion of soot (600°C). Furthermore, the catalysts resulted in thermally and chemically stable structures.

On the other hand, although the scaling of the preparation method resulted in catalysts with metallic loads and chemical species similar to those obtained at laboratory scale, the different preparation variables (surface tension of the precursor solution or use of citric acid) considerably influenced the distribution of the catalyst in the thickness of the substrate, which, in turn, influenced the type of soot-catalyst contact at the different scales. This, added to the different nature of the soot obtained at the different scales, revealed that the catalytic performance of the prepared systems was not the same.

Finally, using the opacity values it was possible to conclude that the filters made from the catalytic ceramic papers developed in this thesis are highly efficient in retaining particulate material. Furthermore, taking into account the pressure drop values (in the order of those recorded for commercial diesel particulate filters), these structures are promising for their application as particulate material filters.

--

## Empleo de catalizadores mesoporosos en la reacción de alquilación de isobutano con butenos

Lucas Gabriel Tonutti

Tesis de Doctorado para optar al grado académico superior de Doctor en Ingeniería Química en el campo de Catálisis Heterogénea – Premio AQA: “Dr. Pedro N. Arata 2023” (Área: Química Industrial). Dirección de Tesis: Dr. Bruno Oscar Dalla Costa. Co-dirección: Dr. Carlos Alberto Querini.

Instituto de Investigaciones en Catálisis y Petroquímica (UNL-CONICET), Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral, Ciudad de Santa Fe, Provincia de Santa Fe. E-mail: ltonutti@fiq.unl.edu.ar

Recibido: 31 de octubre de 2023

Aceptado: 28 de noviembre de 2023

---

En el ámbito de las refinerías, se conoce como *producto alquilado* a una mezcla de isoparafinas multiramificadas obtenidas a partir de hidrocarburos más livianos provenientes de las unidades de craqueo catalítico (FCC). Esta mezcla presenta un elevado número de octanos (*research octane number*, RON, y *motor octane number*, MON), baja presión de vapor y no contiene azufre, compuestos aromáticos ni olefinas, por lo que resulta un aditivo muy valioso para incorporar en las naftas reformuladas. En particular, dadas las crecientes restricciones al contenido de compuestos oxigenados, aromáticos y azufre, otros aditivos para las gasolinas se ven limitados en su empleo, entre ellos el metil-tertbutil-éter (MTBE) por ser contaminante en napas de aguas, el etanol por su elevada presión de vapor y los cortes de reformado por su contenido de aromáticos.

La reacción involucrada en este proceso es la alquilación, y consiste en la adición de alquenos (1-buteno, 2-buteno, isobuteno) a alcanos (isobutano) para dar lugar, isomerización mediante, a isoocitanos (trimetilpentanos, TMPs), que son los compuestos que presentan las propiedades beneficiosas ya mencionadas. Esta reacción es catalizada por ácidos fuertes y en la actualidad predominan las unidades que operan con ácido fluorhídrico (HF) o ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) como catalizadores, alcanzando capacidades instaladas superiores a dos millones de barriles por día a nivel mundial. Estas unidades resultan ineficientes por su elevado consumo de ácidos y los costos adicionales de separación y tratamiento de los mismos para su disposición. Por otro lado, su operación representa un riesgo medioambiental, requiriendo costosos sistemas de mitigación en caso de fugas, en particular con HF. Para subsanar esto, se han desarrollado catalizadores sólidos, que, si bien han logrado buenas actividades y selectividades, han presentado muy baja estabilidad como para ser aplicados a

nivel industrial en forma masiva. Entre ellos se incluyen heteropoliácidos soportados, catalizadores basados en circonia, y zeolitas. En particular, de estas últimas se ha estudiado en más detalle la familia de las faujasitas (FAU), aunque también se han evaluado sólidos de las familias de las mordenitas (MOR), las zeolitas beta (\*BEA), EMT y ZSM-5 (MFI), entre otras. La desactivación obedece a un mecanismo de depósito de coque, para el cual los factores más influyentes son el tamaño de los poros y la fuerza ácida. El primero afecta la capacidad de difusión de los precursores de coque y la facilidad con la que la estructura porosa se bloquea, mientras que la segunda provee a la capacidad de craqueo de los compuestos pesados, dando lugar a compuestos más livianos que pueden difundir más rápidamente.

*El objetivo de este trabajo de Tesis fue aportar conocimientos relacionados con el comportamiento catalítico de materiales obtenidos con técnicas avanzadas de síntesis, y su relación con el tipo de acidez y estructura porosa. Se buscó mejorar el entendimiento del sistema y posibilitar el desarrollo de nuevos materiales adecuados para catalizar la reacción y ser competitivos con los procesos existentes a nivel industrial, solucionando los problemas operativos, ambientales y de seguridad asociados a estos procesos.*

En esta Tesis se estudió la síntesis de materiales mesoporosos y de acidez regulada con el objetivo de mejorar la estabilidad y selectividad logradas en catalizadores microporosos previamente evaluados en la reacción. Se analizaron dos enfoques para la generación de mesoporosidad: *bottom-up*, consistente en la formación de un sólido por condensación de precursores alrededor de una plantilla orgánica (*template*), que al removerse deja poros que usualmente resultan ordenados y uniformes en forma y tamaño; y *top-down*, consistente en atacar parcialmente la estructura de un sólido con bases (o alternativamente con ácidos, vapor de agua o agentes oxidantes) para generar mesoporos. Por otra parte, un tercer enfoque consistió en la regulación de acidez en zeolitas, la cual fue realizada por intercambio iónico, empleando cationes lantano en distintas proporciones. En todos los casos, se optimizaron los parámetros de síntesis y se sometieron los materiales resultantes a caracterización fisicoquímica (sortimetría, difracción/dispersión de rayos X, termogravimetría, fluorescencia de rayos X, espectroscopía infrarroja, oxidación a temperatura programada), a pruebas de interacción con distintas moléculas sonda (titulación potenciométrica, pulsos de buteno, desorción de piridina y colidina, espectroscopía infrarroja con adsorción de piridina y con buteno) y a reacciones test de alquilación de isobutano con butenos y de esterificación de glicerol con ácido acético. Esta segunda reacción se incluyó en el estudio como una herramienta adicional para evaluar el comportamiento de los sitios ácidos presentes en el

catalizador. La alquilación de isobutano fue evaluada en un reactor de lecho fijo en fase gas, mientras que la esterificación de glicerol en un reactor *batch* en fase líquida. En ambos casos se siguió la evolución temporal mediante cromatografía gaseosa y se caracterizaron los catalizadores recuperados del medio de reacción.

Como parte del primer enfoque, se estudió la síntesis de sílices mesoporosas tipo SBA-15 con grupos sulfónicos. Se halló que pueden obtenerse materiales de elevada acidez ( $\approx 1$  mmol/g), tamaño de poros grande ( $\approx 10$  nm) y buen ordenamiento mediante un proceso de co-condensación de la fuente de silicio con el precursor funcional por 4 horas, seguido por un envejecimiento de 24 h en autoclave y finalizando con una extracción del surfactante en un aparato Soxhlet. Los materiales así obtenidos presentaron actividad para la esterificación de glicerol con ácido acético comparable a la de catalizadores ácidos homogéneos (como sulfúrico, metanosulfónico y paratoluensulfónico). La actividad normalizada por cantidad de sitios disminuye al aumentar la carga de grupos funcionales debido principalmente a impedimentos estéricos. Asimismo, se probó que las sílices no pierden actividad al reutilizarse, requiriendo solo un lavado con solvente anhidro entre ciclos de uso. Sin embargo, los materiales no fueron activos para las reacciones de alquilación de isobutano, y tampoco fueron observados productos de polimerización o craqueo. La única reacción detectada fue la isomerización de 1-buteno hacia *cis*- y *trans*-2-buteno. La incorporación de grupos hidrofóbicos a la superficie del catalizador mediante diferentes métodos resultó en leves mejorías de la capacidad de adsorción de hidrocarburos. Sin embargo, estos materiales solo pudieron catalizar la isomerización, cuya extensión dependió tanto de la hidrofobicidad como de la cantidad de sitios ácidos disponibles.

Únicamente el material preparado por co-condensación de grupos ácidos e hidrofóbicos fue superior en actividad catalítica a la sílice puramente sulfónica. Es importante resaltar que, en estos materiales, los grupos ácidos están ubicados en los mesoporos y claramente son sitios de tipo Brønsted, y aun así no se logra actividad para la alquilación de isobutano.

En el marco del segundo enfoque para generar materiales mesoporosos se estudiaron los efectos sobre las propiedades texturales, ácidas y catalíticas de la desilicación por tratamiento alcalino en zeolitas de distinta estructura y contenido de aluminio. Se halló que la generación de mesoporos, preservando la cristalinidad del material de partida, sólo es posible en rangos estrechos de concentración de álcali y temperatura, y con una duración limitada. Una zeolita de tipo MFI con relación Si/Al = 15 requiere condiciones más agresivas que una zeolita MFI de Si/Al = 40 por el efecto protector de los átomos de aluminio sobre los átomos de silicio en los tetraedros adyacentes. Asimismo, una zeolita \*BEA de Si/Al = 12,5 requiere condiciones

algo más suaves por su alta cantidad de defectos, que favorecen la desilicación. En las condiciones adecuadas, se formaron poros de alrededor de 10 nm y se incrementó más de un 300% el volumen de mesoporos. La cantidad de sitios ácidos fue preservada e incluso se incrementó, a causa de la remoción selectiva de silicio. Sin embargo, el estudio de la desorción de bases de distinto diámetro cinético mostró que los mesoporos formados no poseen sitios activos en sus paredes, las que resultan parcialmente amorfizadas a causa del ataque alcalino, es decir, que han perdido la regularidad estructural característica de la zeolita de partida, que es clave para el tipo y la fuerza de los sitios activos. Inclusive, se pierden sitios presentes sobre el área externa de la zeolita de partida por el tratamiento alcalino. En zeolitas de bajo contenido de aluminio, se observa la remoción no intencional de aluminio y la generación de defectos y zonas amorfizadas en el sólido, los cuales conforman sitios ácidos accesibles en los mesoporos, pero de menor fuerza y mayormente de tipo Lewis, que no son beneficiosos para las reacciones de interés.

La falta de sitios Brønsted moderados y fuertes que sean accesibles en los mesoporos confina la actividad catalítica a los microporos preexistentes, por lo cual se comprueba que no existen cambios en la selectividad a los distintos productos de alquilación de isobutano con butenos sobre las zeolitas MFI, en las cuales el tamaño de poros juega un papel preponderante al permitir solo la formación de determinados estados de transición. Esta conclusión se ve reforzada por el estudio de la esterificación de glicerol con ácido acético, para la cual se observó una nula actividad atribuible a los catalizadores sólidos, dado que los ésteres sufren de impedimentos para su formación dentro de los microporos. Sin embargo, en la reacción de isobutano con butenos, la existencia de los mesoporos permitió una mejor difusión de los productos de alquilación y polimerización, retrasando la formación de coque y el bloqueo de los sitios ácidos, prolongando así el tiempo de vida de los catalizadores. En la zeolita \*BEA, la generación de mesoporosidad no alcanza a compensar la falta de sitios ácidos fuertes, que da lugar a una rápida acumulación de coque que desactiva el catalizador en mucho menos tiempo que en las zeolitas MFI.

Como tercer enfoque para evitar la desactivación en la reacción de alquilación, se estudió la sustitución parcial de iones amonio por cationes lantano como ion de compensación en zeolita \*BEA, seguida luego de calcinación para obtener las formas protónicas, con el fin de modificar la naturaleza de los sitios ácidos presentes, de modo de favorecer las reacciones de transferencia de hidruro y craqueo, y evitar la acumulación de productos de polimerización y alquilación múltiple. Se lograron grados de intercambio de entre 10 y 55% (considerando al

100% como al contenido de lantano que compensa la carga de todos los tetraedros de aluminio, es decir, tal que  $\text{La/Al} = 1/3$ ). Dicha incorporación de lantano presentó un impacto leve a moderado sobre las propiedades texturales y estructurales, pero afectó considerablemente la proporción de sitios Brønsted y Lewis y la distribución de fuerza ácida de los sitios detectados mediante TPD de piridina. Bajos grados de incorporación crearon sitios Lewis a expensas de los sitios Brønsted de la zeolita, pero a mayores grados la cantidad de sitios Brønsted aumentó nuevamente. Los catalizadores con mayor proporción de sitios Lewis presentaron la menor actividad, mientras que el material de partida, con la mayor proporción de sitios Brønsted, se desactivó más rápido y toleró un menor contenido de coque. La incorporación de una pequeña cantidad de lantano produce una fracción de sitios ácidos fuertes, en menor cantidad que los presentes en el material de partida, pero de mayor fuerza, lo que da lugar a un catalizador estable, pero demasiado activo hacia el craqueo, resultando en un bajo rendimiento a TMP. El contacto con solución de  $\text{La}(\text{NO}_3)_3$  en un 300% de exceso respecto al contenido de aluminio de la zeolita permitió el intercambio de alrededor de un 50% de los protones de la zeolita por  $\text{La}^{3+}$  y dio lugar a un mayor número total de sitios ácidos y de sitios fuertes, así como también un incremento en los sitios Brønsted, logrando la mayor actividad y estabilidad. Un segundo intercambio no aportó un mayor contenido de lantano y conllevó pérdidas de sitios y fuerza ácidos, así como también deterioro de las propiedades texturales, perdiéndose parte de la estabilidad lograda en el material intercambiado una única vez.

En conclusión, se adoptaron tres enfoques para obtener materiales ácidos porosos, catalíticos para la alquilación de isobutano con butenos. El primero involucró la síntesis de sílices mesoporosas ordenadas con grupos sulfónicos como sitios ácidos, que resultaron inactivas para la reacción en estudio. Se concluyó que esto se debe a la imposibilidad de estabilizar el estado de transición, basado en la interacción observada con las olefinas y en la elevada actividad presentada para reacciones de esterificación. El segundo enfoque consistió en la generación de mesoporos en zeolitas mediante tratamiento alcalino. Los materiales obtenidos presentaron mejoras en la estabilidad, pero la selectividad hacia los productos de interés fue inalterada. Experimentos de accesibilidad y el estudio de reacciones de esterificación permitieron concluir que los mesoporos formados no presentan sitios activos y que, entonces, la formación de TMPs sigue restringida por el tamaño de los microporos originales. El tercer enfoque implicó la incorporación parcial de iones lantano ( $\text{La}^{3+}$ ) en



zeolita beta, un material microporoso, lo que dio lugar a cambios en la naturaleza de los sitios ácidos.

Materiales en los cuales alrededor de un 50% de los protones fueron intercambiados presentaron un incremento notable de la estabilidad y una mayor producción de TMPs. El conjunto de materiales estudiados en la reacción de alquilación permitió obtener conclusiones valiosas, como por ejemplo que sitios ácidos ubicados en una estructura mesoporosa y alejados de la superficie (como los anclados con un grupo propilo), no son activos, mientras que los sitios ácidos ubicados en microporos si lo son, lo que sugiere que en el primer caso no se puede estabilizar el complejo de transición mientras que el efecto electrónico generado en las cavidades de los microporos permite estabilizar estos complejos.

*Este trabajo permite establecer criterios para orientar la búsqueda de materiales hacia características particulares, como por ejemplo poros pequeños (para estabilizar el complejo de transición), estructura porosa tridimensional y cristales pequeños (para facilitar la difusión y limitar el bloqueo de poros), sitios ubicados en la superficie (debido a efectos electrónicos de la estructura sobre los compuestos adsorbidos), sitios ácidos de fuerza moderada (para favorecer la selectividad) y densidad de sitios intermedia (para evitar excesiva polimerización).*

*Se concluye que el trabajo de Tesis es un aporte al diseño racional de catalizadores, en este caso para la reacción de alquilación de isobutano, de gran interés industrial para la producción de combustibles reformulados.*

--

## **Capítulos de esta Tesis**

En el **Capítulo 1** se realiza una introducción a los procesos industriales de alquilación y los últimos desarrollos en el ámbito, así como también a los antecedentes de aplicación de sólidos ácidos hallados en la bibliografía y los mecanismos de reacción más aceptados.

En el **Capítulo 2** se pormenorizan los procedimientos experimentales realizados para la síntesis, caracterización y evaluación catalítica de los materiales estudiados en esta tesis.

En el **Capítulo 3** se presenta el tratamiento alcalino de zeolitas MFI (Si/Al 15 y 40) y \*BEA (Si/Al 12,5), abarcando el estudio de las condiciones más favorables para llevarlo a cabo y el análisis de la localización y accesibilidad de los sitios ácidos, así como su correlación con la actividad catalítica en reacciones de alquilación y esterificación.

En el **Capítulo 4** se muestran los resultados del intercambio iónico de zeolita \*BEA (Si/Al 12,5) con cationes lantano, haciendo hincapié en la influencia del grado de incorporación de

los cationes sobre las propiedades ácidas y, con ello, sobre la actividad catalítica.

El **Capítulo 5** se dedica a las sílices mesoporosas ordenadas tipo SBA-15, enfocándose primero en las condiciones de síntesis del material puramente silíceo, luego en la incorporación de grupos ácidos y, finalmente, en la modificación de la hidrofobicidad de la superficie. Se destaca la comparación de la actividad catalítica entre las reacciones de alquilación de isobutano con butenos en fase gas y la esterificación de glicerol con ácido acético.

Finalmente, en el **Capítulo 6** se resumen las principales conclusiones y se proyectan las actividades futuras que se plantean a partir de los resultados de esta Tesis.

Se destaca en este trabajo el desarrollo de un modelo cinético para la reacción de esterificación de glicerol con ácido acético y la implementación de un algoritmo evolutivo para su evaluación y la obtención de las constantes cinéticas correspondientes, el cual se presenta en la sección 3.2.5.2 y se aplica nuevamente en la sección 5.2.3.2.

## Objetivos

El objetivo general del trabajo de Tesis es el estudio de catalizadores sólidos para la reacción de alquilación de isobutano con olefinas de cuatro átomos de carbono, analizando el comportamiento en reacción y correlacionándolo con las propiedades fisicoquímicas del catalizador.

Los objetivos particulares son los siguientes:

- Preparar catalizadores mesoporosos con sitios ácidos en su superficie. Se estudiarán zeolitas modificadas por tratamiento alcalino y sílices tipo SBA-15, SBA-16 y MCM-41, funcionalizados de diferentes maneras para obtener distintas fuerza y densidad de sitios, como así también características hidrofóbicas de la superficie.
- Emplear diferentes técnicas de caracterización de materiales sólidos, para obtener información de la estructura y propiedades ácidas.
- Evaluar la performance catalítica en la reacción de alquilación de isobutano con butenos en fase gaseosa.
- Analizar la influencia de la estructura porosa en la velocidad de desactivación, comparando con resultados previos en zeolitas microporosas.
- Determinar la estabilidad y regenerabilidad de los catalizadores evaluados.
- Estudiar otras reacciones catalizadas por ácidos para dilucidar la influencia de las propiedades superficiales sobre la actividad.

## **Use of mesoporous catalysts in the alkylation reaction of isobutane with butenes**

In the field of refineries, a mixture of multibranched isoparaffins obtained from lighter hydrocarbons from catalytic cracking units (FCC) is known as an alkylated product. This mixture has a high octane number (research octane number, RON, and motor octane number, MON), low vapor pressure and does not contain sulfur, aromatic compounds or olefins, making it a very valuable additive to incorporate into gasoline. reformulated. In particular, given the growing restrictions on the content of oxygenated, aromatic and sulfur compounds, other gasoline additives are limited in their use, including methyl *tert*-butyl ether (MTBE) because it pollutes water tables, ethanol due to its high vapor pressure and reforming cuts due to its aromatic content.

The reaction involved in this process is alkylation, and consists of the addition of alkenes (1-butene, 2-butene, isobutene) to alkanes (isobutane) to give rise, through isomerization, to isooctanes (trimethylpentanes, TMPs), which are the compounds that show the beneficial properties already mentioned. This reaction is catalyzed by strong acids and currently units that operate with hydrofluoric acid (HF) or sulfuric acid (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) as catalysts predominate, reaching installed capacities of more than two million barrels per day worldwide. These units are inefficient due to their high consumption of acids and the additional costs of separating and treating them for disposal. On the other hand, its operation represents an environmental risk, requiring expensive mitigation systems in case of leaks, particularly with HF. To correct this, solid catalysts have been developed, which, although they have achieved good activities and selectivities, have shown too little stability to be applied on a massive industrial level. These include supported heteropolyacids, zirconia-based catalysts, and zeolites. In particular, of the latter, the faujasite family (FAU) has been studied in more detail, although solids from the mordenite (MOR), beta zeolites (\*BEA), EMT, and ZSM-5 (MFI) families have also been evaluated., among others. Deactivation is due to a coke deposition mechanism, for which the most influential factors are pore size and acid strength. The first affects the diffusion capacity of coke precursors, and the ease with which the porous structure blocks, while the second provides the cracking capacity of heavy compounds, giving rise to lighter compounds that can diffuse more quickly.

*The aim of this Ph. D. Thesis was to provide knowledge related to the catalytic behavior of materials obtained with advanced synthesis techniques, and its relationship with the type of*

*acidity and porous structure. The goal was to improve the understanding of the system and enable the development of new materials suitable to catalyze the reaction and be competitive with existing processes at an industrial level, solving the operational, environmental and safety problems associated with these processes.*

In this Ph. D. Thesis, the synthesis of mesoporous materials with regulated acidity was studied with the aim of improving the stability and selectivity achieved in microporous catalysts previously evaluated in the reaction. Two approaches were analyzed for the generation of mesoporosity: *bottom-up*, consisting of the formation of a solid by condensation of precursors around an organic template (template), which when removed leaves pores that are usually ordered and uniform in shape and size; and *top-down*, consisting of partially attacking the structure of a solid with bases (or alternatively with acids, water vapor or oxidizing agents) to generate mesopores. On the other hand, a third approach consisted of regulating acidity in zeolites, which was carried out by ion exchange, using lanthanum cations in different proportions. In all cases, the synthesis parameters were optimized and the resulting materials were subjected to physicochemical characterization (sortometry, X-ray diffraction/scattering, thermogravimetry, X-ray fluorescence, infrared spectroscopy, oxidation at programmed temperature), interaction tests with different probe molecules (potentiometric titration, butene pulses, desorption of pyridine and collidine, infrared spectroscopy with adsorption of pyridine and with butene), and test reactions of alkylation of isobutane with butenes and esterification of glycerol with acetic acid. This second reaction was included in the study as an additional tool to evaluate the behavior of the acid sites present in the catalyst. The alkylation of isobutane was evaluated in a fixed bed reactor in the gas phase, while the esterification of glycerol in a batch reactor in the liquid phase. In both cases, the temporal evolution was followed by gas chromatography and the catalysts recovered from the reaction medium were characterized.

As part of the first approach, the synthesis of SBA-15 type mesoporous silicas with sulfonic groups was studied. It was found that materials with high acidity ( $\approx 1$  mmol/g), large pore size ( $\approx 10$  nm) and good ordering can be obtained through a co-condensation process of the silicon source with the functional precursor for 4 hours, followed by aging for 24 hours in an autoclave and ending with extraction of the surfactant in a Soxhlet apparatus. The materials thus obtained showed activity for the esterification of glycerol with acetic acid comparable to that of homogeneous acid catalysts (such as sulfuric, methanesulfonic and paratoluenesulfonic). The activity normalized by number of sites decreases with increasing loading of functional groups due mainly to steric hindrances. Likewise, it was proven that

silicas do not lose activity when reused, requiring only a wash with anhydrous solvent between use cycles. However, the materials were not active for isobutane alkylation reactions, nor were polymerization or cracking products observed. The only reaction detected was the isomerization of 1-butene toward *cis*- and *trans*-2-butene. The incorporation of hydrophobic groups to the surface of the catalyst by different methods resulted in slight improvements in the hydrocarbon adsorption capacity. However, these materials were only able to catalyze isomerization, the extent of which depended on both hydrophobicity and the number of available acidic sites.

Only the material prepared by co-condensation of acidic and hydrophobic groups was superior in catalytic activity to purely sulfonic silica. It is important to highlight that, in these materials, the acidic groups are located in the mesopores and are clearly Brønsted-type sites, and even so, activity for isobutane alkylation is not achieved.

Within the framework of the second approach to generate mesoporous materials, the effects on the textural, acidic, and catalytic properties of desilication by alkaline treatment in zeolites of different structure and aluminum content were studied. It was found that the generation of mesopores, preserving the crystallinity of the starting material, is only possible in narrow ranges of alkali concentration and temperature, and with a limited duration. An MFI type zeolite with a Si/Al ratio = 15 requires more aggressive conditions than an MFI zeolite with Si/Al = 40 due to the protective effect of the aluminum atoms on the silicon atoms in the adjacent tetrahedra. Likewise, a \*BEA zeolite of Si/Al = 12.5 requires somewhat milder conditions due to its high number of defects, which favor desilication. Under the appropriate conditions, pores of around 10 nm were formed and the volume of mesopores increased by more than 300%. The amount of acidic sites was preserved and even increased, due to the selective removal of silicon. However, the study of the desorption of bases of different kinetic diameter showed that the mesopores formed do not have active sites on their walls, which are partially amorphized due to the alkaline attack, that is, they have lost the structural regularity characteristic of the starting zeolite, which is key to the type and strength of the active sites. Sites present on the external area of the starting zeolite are even lost due to the alkaline treatment. In zeolites with low aluminum content, the unintentional removal of aluminum and the generation of defects and amorphous zones in the solid are observed, which form accessible acid sites in the mesopores, but of lower strength and mostly of the Lewis type, which do not are beneficial for the reactions of interest.

The lack of moderate and strong Brønsted sites that are accessible in the mesopores confines the catalytic activity to the preexisting micropores, which is why it is verified that there are no changes in the selectivity to the different alkylation products of isobutane with butenes on the MFI zeolites, in which the pore size plays a predominant role by only allowing the formation of certain transition states. This conclusion is reinforced by the study of the esterification of glycerol with acetic acid, for which no activity attributable to solid catalysts was observed, given that the esters suffer from impediments to their formation within the micropores. However, in the reaction of isobutane with butenes, the existence of mesopores allowed better diffusion of the alkylation and polymerization products, delaying the formation of coke and the blocking of acid sites, thus prolonging the life time of the catalysts. In the \*BEA zeolite, the generation of mesoporosity is not enough to compensate for the lack of strong acid sites, which gives rise to a rapid accumulation of coke that deactivates the catalyst in much less time than in MFI zeolites.

As a third approach to avoid deactivation in the alkylation reaction, the partial replacement of ammonium ions by lanthanum cations as compensation ion in zeolite \*BEA was studied, followed later by calcination to obtain the proton forms, in order to modify the nature of the acid sites present, in order to favor hydride transfer and cracking reactions, and avoid the accumulation of polymerization and multiple alkylation products. Exchange degrees of between 10 and 55% were achieved (considering 100% as the lanthanum content that compensates the charge of all aluminum tetrahedra, that is, such that  $\text{La/Al} = 1/3$ ). This lanthanum incorporation had a slight to moderate impact on the textural and structural properties, but considerably affected the proportion of Brønsted and Lewis sites and the acid strength distribution of the sites detected by pyridine TPD. Low degrees of incorporation created Lewis sites at the expense of the Brønsted sites of the zeolite, but at higher degrees the number of Brønsted sites increased again. The catalysts with the highest proportion of Lewis sites showed the lowest activity, while the starting material, with the highest proportion of Brønsted sites, deactivated faster and tolerated lower coke content. The incorporation of a small amount of lanthanum produces a fraction of strong acid sites, in smaller quantities than those present in the starting material, but of greater strength, which gives rise to a stable catalyst, but too active towards cracking, resulting in poor performance at TMP. Contact with  $\text{La}(\text{NO}_3)_3$  solution in 300% excess of the aluminum content of the zeolite allowed the exchange of around 50% of the zeolite protons for  $\text{La}^{3+}$  and gave rise to a greater total number of acid sites and strong sites, as well as an increase in Brønsted sites, achieving the greatest activity and stability. A second exchange did not provide higher

lanthanum content, and led to losses of acid sites and strength, as well as deterioration of textural properties, losing part of the stability achieved in the material exchanged only once.

In conclusion, three approaches were adopted to obtain porous, acidic materials catalytic for the alkylation of isobutane with butenes. The first involved the synthesis of ordered mesoporous silicas with sulfonic groups as acid sites, which were inactive for the reaction under study. It was concluded that this is due to the impossibility of stabilizing the transition state, based on the interaction observed with olefins and the high activity presented for esterification reactions. The second approach consisted of the generation of mesopores in zeolites by alkaline treatment. The materials obtained showed improvements in stability, but the selectivity towards the products of interest was unchanged. Accessibility experiments and the study of esterification reactions allowed us to conclude that the mesopores formed do not present active sites and that, therefore, the formation of TMPs continues to be restricted by the size of the original micropores. The third approach involved the partial incorporation of lanthanum ions ( $\text{La}^{3+}$ ) into zeolite beta, a microporous material, which resulted in changes in the nature of the acidic sites.

Materials in which around 50% of the protons were exchanged showed a notable increase in stability and a greater production of TMPs. The set of materials studied in the alkylation reaction allowed valuable conclusions to be obtained, such as that acid sites located in a mesoporous structure and far from the surface (such as those anchored with a propyl group), are not active, while acid sites located in micropores, they are, which suggests that in the first case the transition complex cannot be stabilized while the electronic effect generated in the cavities of the micropores allows these complexes to be stabilized.

*This work led to establish criteria to guide the search for materials towards particular characteristics, such as small pores (to stabilize the transition complex), three-dimensional porous structure, and small crystals (to facilitate diffusion and limit pore blockage), sites located on the surface (due to electronic effects of the structure on the adsorbed compounds), acid sites of moderate strength (to favor selectivity), and intermediate site density (to avoid excessive polymerization).*

*It is concluded that this Ph. D. Thesis is a contribution to the rational design of catalysts, in this case for the isobutane alkylation reaction, of great industrial interest for the production of reformulated fuels.*

## Chapters of this Ph. D. Thesis

Chapter 1 provides an introduction to industrial alkylation processes and the latest developments in the field, as well as the background on the application of acidic solids found in the literature and the most accepted reaction mechanisms.

Chapter 2 details the experimental procedures carried out for the synthesis, characterization and catalytic evaluation of the materials studied in this Ph. D. Thesis.

Chapter 3 presents the alkaline treatment of MFI zeolites (Si/Al 15 and 40) and \*BEA (Si/Al 12.5), covering the study of the most favorable conditions to carry it out and the analysis of the location and accessibility of acid sites, as well as its correlation with catalytic activity in alkylation and esterification reactions.

Chapter 4 shows the results of the ion exchange of zeolite \*BEA (Si/Al 12.5) with lanthanum cations, emphasizing the influence of the degree of incorporation of the cations on the acidic properties and, therefore, on the catalytic activity.

Chapter 5 is dedicated to ordered mesoporous silicas type SBA-15, focusing first on the synthesis conditions of the purely siliceous material, then on the incorporation of acid groups and, finally, on the modification of the hydrophobicity of the surface. The comparison of the catalytic activity between the alkylation reactions of isobutane with butenes in the gas phase and the esterification of glycerol with acetic acid is highlighted.

Finally, Chapter 6 summarizes the main conclusions and projects future activities that arise from the results of this Ph. D. Thesis.

Highlighted in this work is the development of a kinetic model for the esterification reaction of glycerol with acetic acid and the implementation of an evolutionary algorithm for its evaluation, and obtaining the corresponding kinetic constants, which is presented in section 3.2.5.2 and is applied again in section 5.2.3.2.

## Goals

The general aim of this Ph. D. Thesis is the study of solid catalysts for the alkylation reaction of isobutane with olefins of four carbon atoms, analyzing the reaction behavior and correlating it with the physicochemical properties of the catalyst.

The particular aims are the following:

➤ Prepare mesoporous catalysts with acid sites on their surface. Zeolites modified by alkaline treatment and silicas type SBA-15, SBA-16 and MCM-41 will be studied,



functionalized in different ways to obtain different strength and density of sites, as well as hydrophobic characteristics of the surface.

- Use different characterization techniques for solid materials to obtain information on the structure and acid properties.
- Evaluate the catalytic performance in the alkylation reaction of isobutane with butenes in the gas phase.
- Analyze the influence of the porous structure on the deactivation rate, comparing with previous results in microporous zeolites.
- Determine the stability and regenerability of the evaluated catalysts.
- Study other reactions catalyzed by acids to elucidate the influence of surface properties on activity.

--