

Vol. 109 N° 1-2



ISSN 2545-8655

ANALES DE LA ASOCIACIÓN QUÍMICA ARGENTINA



Enero-Diciembre 2022

Anales de la Asociación Química Argentina

Editada desde 1913

Editor en Jefe

Dr. Alberto Lazarowski

Vicedirectora Ejecutiva

Dra. Marisa Gabriela Repetto

Comité Asesor de Dirección de la Revista

Dr. Alan Talevi

Dr. Pablo Duchowicz

Comité Editorial

Dra. Alicia Fernández Cirelli

Dra. Alicia B. Pomilio

Dr. Angel Alonso

Dr. Alberto L. Capparelli

Dr. Eduardo A. Castro

Dra. Norma B. D'Accorso

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. Jorge Ronco (CONICET -UNLP)

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

Dra. Noemí E. Walsöe 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

TE/FAX: 54-11-4822-4886

Contenido

Vol. 109 N° 1-2, Enero-Diciembre de 2022

CONTENIDO	Pág.
Editorial.....	4
Estudio QSAR de la toxicidad aguda de pesticidas en la lombriz <i>Eisenia foetida</i>	5-19
<i>Pablo R. Duchowicz, Daniel O. Bennardi y José F. Aranda</i>	
Síntesis y caracterización de SnO ₂ nanocrystalino, dopado, aplicado en sensores de gases de alta sensibilidad para detectar ppm de H ₂ S (g) en aire.....	20-38
<i>M. P. Poiasina, M. F. Bianchetti, E. Heredia, H. Canepa y N. E. Walsöe de Reca</i>	
Structural and spectroscopic properties of some triple metal Oxalates.....	39-45
<i>María M. Torres, Daniel Palacios, Vicente L. Barone, Ana C. González-Baró, and Enrique J. Baran</i>	
Evaluación de la resistencia a la corrosión de aleaciones Ni-W electrodepositadas sobre acero al carbono en un medio conteniendo aniones cloruro.....	46-56
<i>Gerardo R. Ocampo, Facundo E. Herrera, Patricio A. Orrillo y Susana B. Ribotta</i>	
Biomarcadores plasmáticos de diagnóstico y de progresión de la enfermedad de Alzheimer por espectrometría de masa	57-89
<i>Alicia B. Pomilio, Arturo A. Vitale y Alberto J. Lazarowski</i>	
Synthesis and reactivity of glutaraldehyde diperoxide in isopropanol solution.....	90-101
<i>Alexander G. Bordón, María J. Jorge, Lilian C. Jorge, Mariela I. Profeta, Jorge M. Romero, and Nelly L. Jorge</i>	
Estudio estructural y conformacional de las antocianinas: pelargonidia, cianidina y delfinidina.....	102-122
<i>Nicolas A. Szewczuk, Rosana M. Lobayan, Pablo R. Duchowicz y Alicia B. Pomilio</i>	
Indice en inglés.....	123

Editorial

Estimados Lectores de Anales de la Asociación Química Argentina:

En primer lugar, desde la Comisión Directiva de AQA, y en nombre de todos los miembros de nuestra asociación, queremos agradecer a la Dra. Susana A. Larrondo, por la ardua tarea desarrollada en la Dirección Editorial, de los Anales de la Asociación Química Argentina.

A su vez, damos la bienvenida a nuevos colaboradores en la Dirección Editorial como la Dra Marisa G. Repetto, y los Dres. Dr. Alan Talevi y Dr. Pablo R. Duchowicz.

También, nos hemos tomado el atrevimiento de modificar la carátula de tapa de la revista, y esperamos resulte de su agrado.

La amplia gama de temas abordados en el contenido de los artículos incluidos en este último número 109 de la revista, refleja fielmente el inmenso espectro de subdisciplinas de la Química que se desarrollan en nuestro país, y que nos enorgullece poder difundirlos en nuestra revista.

No queda más que repetir las palabras editoriales de la Dra. Susana A. Larrondo y esperamos que disfruten de este nuevo número y contarlos como colaboradores en próximos números de la revista.

Atte.

Prof. Dr. Alberto J. Lazarowski

Editor en Jefe

QSARs study & acute toxicity of pesticides

ESTUDIO QSAR DE LA TOXICIDAD AGUDA DE PESTICIDAS EN LA LOMBRIZ *EISENIA FOETIDA*

Pablo R. Duchowicz*^a, Daniel O. Bennardi^b y José F. Aranda^a

^a Instituto de Investigaciones Físicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA), CONICET, Universidad Nacional de La Plata (UNLP), Diag. 113 y 64, C.C. 16, Sucursal 4, 1900 La Plata, Argentina.

^b Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata (UNLP), 60 y 119, B1904AAN La Plata, Argentina.

*Autor Corresponsal: prduchowicz@gmail.com

Recibido: 31 de mayo de 2022

Aceptado: 15 de julio de 2022

Resumen

El objetivo de este trabajo fue el desarrollo de relaciones cuantitativas estructura-actividad (QSAR) predictivas con el fin de predecir la toxicidad aguda de los plaguicidas en lombrices de tierra (*Eisenia foetida*). Los datos de toxicidad experimentales fueron obtenidos de la base de datos de propiedades de pesticidas (PPDB) desarrollada en la Universidad de Hertfordshire. Se dibujaron las estructuras moleculares con ACD/ChemSketch. Los descriptores moleculares no conformacionales se calcularon mediante los programas PaDEL, Mold², DataWarrior y QuBiLs-MAS. Tras la exclusión de los descriptores constantes, linealmente dependientes y de valores únicos se obtuvieron un total de 2055 variables estructurales. Se usó el Método de Subconjuntos Balanceados (BSM) para dividir el conjunto molecular (58 moléculas) en 3 grupos de calibración, validación y predicción. Se llevaron a cabo regresiones lineales QSAR de 1-5 descriptores, mediante un algoritmo matemático, el Método de Reemplazo. Se encontró un modelo de regresión lineal de 4 descriptores que poseía los mejores resultados de validación. Posteriormente se utilizó este modelo para predecir la toxicidad de 21 plaguicidas cuyos valores experimentales eran no verificados o menos confiables. Las predicciones fueron por lo general próximas a los valores reportados no verificados.

Palabras clave: *Plaguicidas; Eisenia foetida; QSAR; regresión lineal multivariable; validación; Método de Reemplazo.*

Abstract

The aim of this work was the development of predictive quantitative structure–activity relationships (QSARs) in order to predict the acute toxicity of pesticides in earthworms (*Eisenia foetida*). Experimental toxicity data were obtained from the Pesticide Properties Database (PPDB) developed at the University of Hertfordshire. Molecular structures were drawn with ACD/ChemSketch. Non-conformational molecular descriptors were calculated using PaDEL, Mold², DataWarrior and QuBiLS-MAS programs. After excluding the constant, linearly dependent, and unique value descriptors, a total of 2,055 structural variables were obtained. The Balanced Subset Method (BSM) was used to divide the molecular set (58 molecules) into 3 groups for calibration, validation and prediction. QSAR linear regressions of 1-5 descriptors were carried out using a mathematical algorithm, the Replacement Method. A 4-descriptor linear regression model was found to have the best validation results. This model was then used to predict the toxicity of 21 pesticides whose experimental values were unverified or less reliable. The predictions were generally close to the unverified reported values.

Keywords: Pesticides; *Eisenia foetida*; QSAR; multivariable linear regression; validation; Replacement Method.

1. Introducción

Los plaguicidas se utilizan ampliamente en la agricultura para la protección de las plantas y para aumentar los rendimientos de producción y la calidad de los productos agrícolas. Sin embargo, tienen una gran desventaja, la toxicidad [1]. Como resultado de su uso excesivo, se encuentran como residuos en el medio ambiente, ocasionando un riesgo para los seres humanos, los animales y otros organismos [2,3]. Una de las formas de medir el riesgo para el medio ambiente y los seres humanos es determinar la toxicidad aguda de los plaguicidas. Estos se prueban contra una variedad de animales, incluidos mamíferos, aves, peces e invertebrados [4]. Las lombrices como *Eisenia foetida* pueden usarse con éxito como bioindicadores para la evaluación de la toxicidad aguda de los plaguicidas en los ecosistemas terrestres [5-7]. Se han desarrollado varios protocolos para evaluar los efectos de los plaguicidas en *Eisenia foetida*, entre los cuales el más conocido es la guía 207 de la OCDE, que consiste en una prueba de suelo artificial de 14 días [8,9].

Lamentablemente, la determinación experimental de la toxicidad, además de requerir un tiempo considerable, es costosa y genera un dilema ético (demandas para reducir o abolir las pruebas en animales) [4,10]. El uso de métodos predictivos basados en

herramientas computacionales es una opción rápida, económica y ética para evaluar la toxicidad de los plaguicidas en animales [11,12]. Estos métodos comprenden las relaciones cuantitativas estructura-actividad (QSAR).

La teoría QSAR establece una relación cuantitativa entre la estructura molecular y el efecto final como la actividad biológica, lo que permite predecir la bioactividad de compuestos con datos experimentales desconocidos. Estos cálculos basados en la estructura molecular consideran el empleo de descriptores moleculares, que son variables numéricas que contienen información específica y relevante sobre las características constitucionales, topológicas, geométricas, hidrofóbicas y/o electrónicas de los compuestos investigados [13-16].

Hasta ahora, se ha desarrollado una gran cantidad de modelos QSAR para predecir la toxicidad aguda de los plaguicidas [10, 17-21]. En un reciente estudio QSAR informado por Ghosh *et al.* [22], los autores desarrollaron un modelo de regresión lineal para predecir la toxicidad de los plaguicidas en las lombrices de tierra *Eisenia foetida*, empleando el método de Mínimos Cuadrados Parciales (PLS). El conjunto de plaguicidas que utilizaron fue dividido en dos grupos: conjunto de calibración o training set (43 compuestos) para el desarrollo del modelo, y conjunto de prueba o test set (14 compuestos) para validación del mismo. Calcularon un total de 501 descriptores moleculares empleando los programas Dragon 6 y PaDEL-Descriptor. El mejor modelo que obtuvieron contiene ocho descriptores, es robusto y predictivo.

En este trabajo proponemos un modelo alternativo QSAR de regresión lineal multivariable (MLR) para la predicción de la toxicidad aguda de los plaguicidas en *Eisenia foetida*. Para el desarrollo del mismo empleamos descriptores moleculares independientes de la conformación. Estos tienen la ventaja de que se basan únicamente en los aspectos constitucionales y topológicos de las moléculas. El propósito de nuestro estudio es contribuir al cuidado del medio ambiente brindando una guía racional para el diseño de plaguicidas con menor toxicidad.

2. Metodología

Los datos de toxicidad experimentales fueron obtenidos de la base de datos de propiedades de pesticidas (PPDB) desarrollada en la Universidad de Hertfordshire [23]. La actividad fue expresada como concentración letal media (CL_{50}): corresponde a la concentración ($mg \cdot kg^{-1}$) de pesticida que conduce a la muerte del 50% de la lombriz *Eisenia foetida*. Los valores de toxicidad aguda fueron convertidos en $\log CL_{50}$. Se

extrajeron de la base de datos PPDB 79 pesticidas pertenecientes a diferentes familias químicas y con distintos usos, dividiéndoselos en 2 grupos. El primero estuvo constituido por 58 compuestos que incluían datos verificados por la base PPDB y por lo tanto tenían mayor grado de confianza. Este conjunto se utilizó para establecer el modelo QSAR. El segundo grupo de pesticidas estuvo formado por 21 compuestos con datos no verificados o menos confiables y fue utilizado como conjunto de ensayo. En la **Tabla 1X** del apéndice se incluyen los detalles de los compuestos estudiados, algunos de los cuales se muestran en la **Fig. 1**.

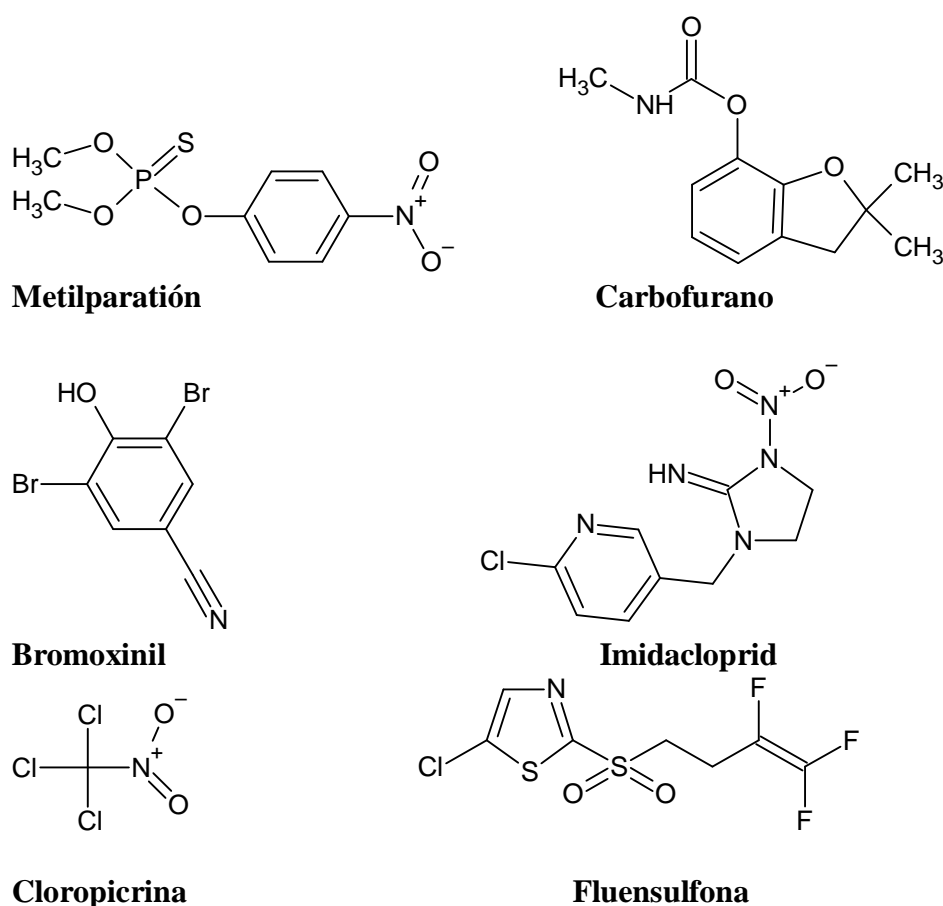


Figura 1. Estructuras moleculares pertenecientes a algunos de los pesticidas estudiados.

Se dibujaron las estructuras químicas con ACD ChemSketch [24] con el formato molecular en MDL mol (V2000). La conversión de las moléculas se realizó con el programa para Windows Open Babel [25].

Los descriptores moleculares se calcularon mediante los programas gratuitos y de libre acceso: PaDEL [26,27], Recon [28], Mold² [29,30], DataWarrior [31] y QuBiLs-MAS [32,33]. Se obtuvieron un total de 23971 descriptores independientes de la

conformación. Esta cantidad se redujo a 2055 tras la exclusión de los descriptores constantes, casi constantes, y linealmente dependientes.

Se efectuó la partición del conjunto molecular ($N = 58$ moléculas) en tres subconjuntos. Uno de estos, calibración ($N_{cal} = 41$), se empleó para seleccionar los mejores descriptores del modelo MLR. El subconjunto validación ($N_{val} = 8$) se usó para evitar la presencia de sobreajuste del modelo durante la selección de descriptores efectuada. Mientras que el de predicción ($N_{pred} = 9$) se utilizó para determinar la capacidad predictiva del modelo (validación externa). Para llevar a cabo la partición mencionada se utilizó la técnica “Método de Subconjuntos Balanceados” (BSM) [34-36].

Se llevaron a cabo regresiones lineales QSAR de 1-5 descriptores, mediante un algoritmo matemático basado en la técnica MLR, el “Método del Reemplazo” (RM) [37,38], que permite seleccionar los mejores descriptores a partir un gran número de variables, de manera que se minimice la raíz cuadrada de la desviación cuadrática media de calibración ($RMSE_{cal}$). Aparte de utilizar un conjunto de validación externo, el mejor modelo obtenido fue validado internamente por medio de las técnicas validación cruzada ‘dejar-uno-afuera’ (*loo*) y aleatorización-y (*rand*) [39-42].

Para estimar la confiabilidad de las predicciones QSAR, se determinó el dominio de aplicabilidad (AD) del modelo a través del enfoque de influencia [43-45], por el cual el conjunto de predicción debe tener un valor de influencia calculado (h) menor que el valor de influencia de control (h^*). De esta manera la propiedad predicha no es el resultado de una extrapolación sustancial (predicción poco confiable).

Todos los algoritmos de Octave [46] se desarrollaron en nuestro grupo y están disponibles.

3. Resultados y discusión

Las mejores regresiones lineales QSAR de $d = 1-5$ descriptores, obtenidas mediante RM, involucran a los descriptores de la **Tabla 1**.

Tabla 1. Modelos lineales para la toxicidad aguda en *Eisenia foetida*.

D	Descriptores	R^2_{cal}	$RMSE_{cal}$	R^2_{val}	$RMSE_{val}$	R^2_{pred}	$RMSE_{pred}$
1	<i>D017</i>	0,21	0,69	0,14	0,72	0,54	0,44
2	<i>GATS4m; APC8NX</i>	0,48	0,56	0,09	0,65	0,60	0,48

3	<i>GATS4m; SHBint4; APC8NX</i>	0,61	0,48	0,67	0,40	0,60	0,42
4	<i>GATS4m; nBondsD; SHBint4; APC8NX</i>	0,72	0,41	0,70	0,38	0,87	0,31
5	<i>HybRatio; VEID; MCS133; PC590; APC8NX</i>	0,82	0,33	0,07	0,88	0,76	0,31

Al tratarse de pocas moléculas estudiadas, el mejor modelo elegido de la **Tabla 1** debe cumplir con la relación práctica $N_{cal}/d \geq 6$ [47]; una relación lineal de 4 descriptores cumple con este requisito y posee además los mejores resultados de validación (mayor R^2_{val} y menor $RMSE_{val}$) evitando la presencia de sobreajuste del modelo:

$$\log CL_{50} = -0,56GATS4m + 0,15 nBondsD - 0,17 SHBint4 - 0,88APC8NX + 2,36 \quad (1)$$

$$N_{cal} = 41, \quad R^2_{cal} = 0,72, \quad RMSE_{cal} = 0,41$$

$$R^2_{ij\ max} = 0,03, \quad o_{2,5} = 0, \quad R^2_{rand} = 0,52, \quad RMSE_{rand} = 0,54 \text{ (100000 casos)}$$

$$R^2_{loo} = 0,66, \quad RMSE_{loo} = 0,46$$

$$N_{val} = 8, \quad R^2_{val} = 0,70 \quad RMSE_{val} = 0,38$$

$$N_{pred} = 9, \quad R^2_{pred} = 0,87, \quad RMSE_{pred} = 0,31$$

R^2_{cal} , R^2_{val} , R^2_{pred} son los coeficientes de determinación correspondientes a los conjuntos de calibración, validación y predicción. R^2_{loo} , R^2_{rand} son los coeficientes de determinación obtenidos mediante las técnicas de validación cruzada ‘dejar-uno-afuera’ (*loo*) y aleatorización-y (*rand*). $RMSE_{cal}$, $RMSE_{val}$, $RMSE_{pred}$ son las raíces cuadradas de la desviación cuadrática media correspondientes a los conjuntos de calibración, validación y predicción. $RMSE_{loo}$, $RMSE_{rand}$ son las raíces cuadradas de la desviación cuadrática media obtenidas mediante las técnicas de validación cruzada ‘dejar-uno-afuera’ (*loo*) y aleatorización-y (*rand*).

$R^2_{ij\ max}$ es el cuadrado del coeficiente de correlación máximo entre pares de descriptores del modelo [48]. El bajo valor obtenido ($R^2_{ij\ max} = 0,03$) revela que no existe superposición de información estructural entre ellos.

La relación cuantitativa estructura-actividad representada por la ecuación 1 (**Ec. 1**) cumple con la técnica aleatorización-y, ya que después de 100000 casos de aleatorización de la actividad experimental, los parámetros alcanzados son $R^2_{cal} > R^2_{rand}$

y $RMSE_{cal} < RMSE_{rand}$ para el peor caso posible de aleatorización, indicando la ausencia de correlación casual. El modelo es estable y predictivo puesto que aprueba los parámetros estadísticos de validación cruzada ($R^2_{loo} > 0,5$) [49] y externa (valor mínimo de $R^2_{val} = 0,7$ y $R^2_{pred} > 0,7$) [50-52], con valores ligeramente mejores a los obtenidos en el estudio realizado por Ghosh *et al.* [22] ($R^2_{loo} = 0,614$ y $R^2_{pred} = 0,734$). Cabe destacar que la **Ec. 1** es un modelo más simple ya que involucra 4 descriptores en lugar de los 8 del citado trabajo. Asimismo se cumplen las siguientes condiciones establecidas por Golbraikh y Tropsha [49] para establecer el poder predictivo del modelo:

$$1 - R^2_o / R^2_{pred} < 0,1 \text{ (0,024)}; \quad 1 - R'^2_o / R'^2_{pred} < 0,1 \text{ (3,63.10}^{-5}\text{)};$$

$$0,85 \leq k \leq 1,15 \text{ (1,11)}; \quad 0,85 \leq k' \leq 1,15 \text{ (0,89)}$$

Donde k y k' son las pendientes de las rectas de regresión a través del origen de las actividades predichas *versus* experimentales y viceversa, respectivamente y R^2_o y R'^2_o son los coeficientes de correlación elevados al cuadrado asociados.

En las **Figs. 2 y 3** se grafican los resultados de las predicciones de $\log CL_{50}$ y dispersión de residuos. Se observa que con estos 4 descriptores moleculares se describe de manera aceptable a los conjuntos de validación y predicción. Según sugieren estas figuras, ningún compuesto del conjunto de calibración posee un residuo mayor a $2,5 S_{cal}$.

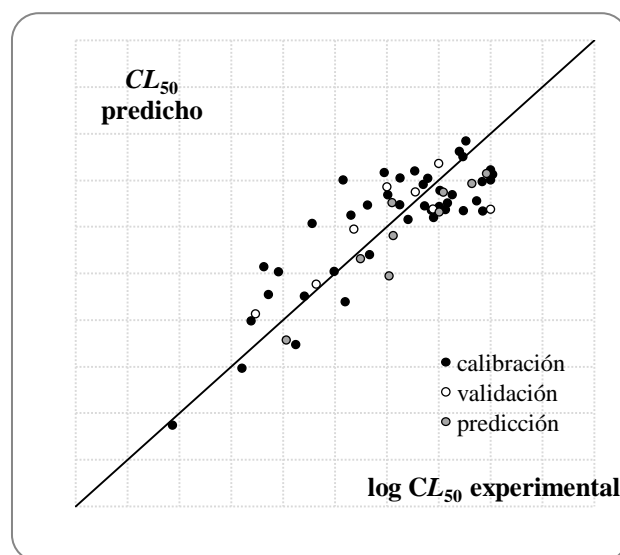


Figura 2. Valores de $\log CL_{50}$ predichos *versus* experimentales según el modelo QSAR.

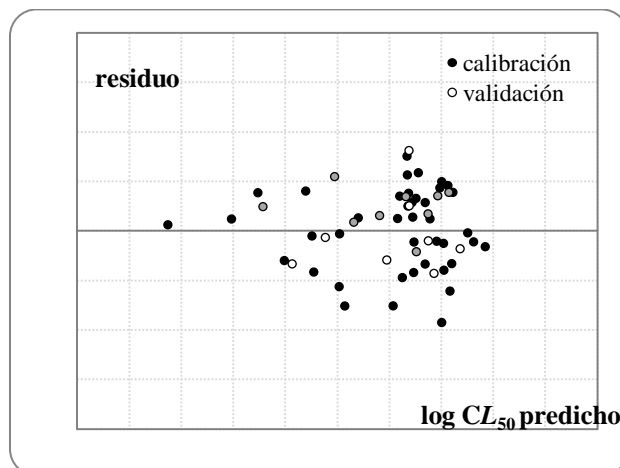


Figura 3. Gráfico de dispersión de residuos para el modelo QSAR.

Los 4 descriptores no-conformacionales se clasifican de la siguiente manera:

- un descriptor de autocorrelación 2D: $GATS4m$, autocorrelación de Geary-distancia 4 / ponderada por la masa
- un descriptor constitucional: $nBondsD$, el número de enlaces dobles
- un descriptor electrotopológico: $SHBint4$, suma de descriptores de fuerza del estado-E para enlaces hidrógeno potenciales de camino de longitud 4
- un descriptor indicador de pares de átomos: $APC8NX$, la cuenta de enlaces N-X a la distancia topológica 8

Los valores numéricos de los descriptores de los pesticidas se incluyen en la **Tabla 2X**.

Dado que un pesticida es más tóxico en la lombriz *Eisenia foetida* cuanto menor sea su valor de concentración letal media, es posible proponer la siguiente guía QSAR para la búsqueda de estructuras con valores determinados de esta propiedad. Según el signo de los coeficientes de regresión de la **Ec. 1**, cuanto mayores sean simultáneamente los valores numéricos de $GATS4m$, $SHBint4$, $APC8NX$ y menor el valor de $nBondsD$, mayor toxicidad aguda presentará el pesticida.

Con respecto al dominio de aplicación de la **Ec. 1**, en la **Fig. 4** están graficados los residuos estandarizados en función del valor de influencia. Puede verse que solo una única molécula de predicción posee un valor de influencia ligeramente superior al límite h^* : imidacloprid, aunque puede considerarse que su predicción es confiable por situarse cerca de ese límite.

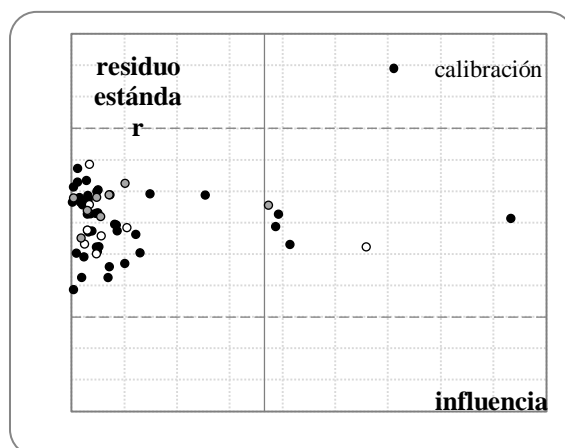


Figura 4. Gráfico de Williams para la **Ec. 1**. Valor de influencia límite $h^* = 0,366$.

El siguiente paso del estudio fue utilizar el modelo QSAR para predecir el conjunto de ensayo de 21 plaguicidas con datos no verificados o menos confiables. Según la **Tabla 1X**, las predicciones de las moléculas **59-79** son por lo general próximas a los valores reportados no verificados. Solo un plaguicida está fuera del dominio de aplicación de la **Ec.1** (aclonifeno), mientras que dos moléculas poseen predicciones que se diferencian más del valor reportado no verificado (1,2-dicloropropano y tiobencarb).

4. Conclusiones

A partir de datos verificados y confiables de la base de datos PPDB, se consiguió establecer un modelo QSAR de regresión lineal multivariable para la predicción de la toxicidad aguda de plaguicidas (pertenecientes a diferentes familias químicas y aplicaciones diversas) en *Eisenia foetida*. Para ello se emplearon descriptores no conformacionales calculados a través de programas gratuitos y de libre acceso. El modelo obtenido supera los resultados publicados respecto a tamaño, robustez y capacidad predictiva. Además, la aplicación del modelo para la predicción de 21 plaguicidas con datos no verificados o menos confiables puede considerarse aceptable. Este estudio constituye una guía QSAR valiosa para la búsqueda de plaguicidas con menor toxicidad, lo cual ayudará a mantener la biodiversidad del suelo a través de la supervivencia de las lombrices.

Agradecimientos

Al Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación por el acceso a la Biblioteca Electrónica.

Descripción de la información de apoyo

La información de apoyo para este trabajo se presenta en un Apéndice que contiene tablas complementarias. La **Tabla 1X** muestra los valores de log CL₅₀ experimentales y predichos (**Ec. 1**) para los 79 pesticidas. La **Tabla 2X** presenta los valores numéricos de los descriptores del modelo QSAR.

Referencias

1. Wan M.T. *J. Environ. Sci. Health Part B* **2013**; 48, 344–363.
2. Müller K., Tiktak A., Dijkman T., et al. Advances in pesticide risk reduction. En: van Alfen N.K., editor. *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems*. USA: Academic Press, **2014**, pp. 17–34.
3. Gopi R.A., Satyavani G., Shanmugasundaram R., et al. *Int. J. Environ. Sci.* **2014**; 4, 1121–1129.
4. Price N.R., Watkins R.W. *Pestic. Outlook* **2003**; 14, 127–129.
5. Zou X., Xiao X., Zhou H., et al. *J. Hazard. Mater.* **2018**; 359, 365–372.
6. Espinoza-Navarro O., Bustos-Obregón E. *Int. J. Morphol.* **2004**; 22, 297–302.
7. Lock K., Schamphelaere K., Janssen C. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2002**; 42, 217–221.
8. Gao M., Song W., Zhang J., Guo J. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2013**; 35, 427–433.
9. Pelosi C., Joimel S., Makowski D. *Chemosphere* **2013**; 90, 895–900.
10. Golbamaki A., Cassano A., Lombardo A., et al. *SAR QSAR Environ. Res.* **2014**; 25, 673–694.
11. Sullivan K.M., Manuppello J.R., Willett C.E. *SAR QSAR Environ. Res.* **2014**; 25, 357–365.
12. Gissi A., Gadaleta D., Floris M., et al. *Altex* **2014**; 31, 23–36.
13. Todeschini R., Consonni V. *Molecular Descriptors for Chemoinformatics (Methods and Principles in Medicinal Chemistry)*. Wiley-VCH, Weinheim, Alemania, **2009**.
14. Masand V.H., Rastija V. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2017**; 169, 12–18.
15. Diudea M.V. *QSPR/QSAR Studies by Molecular Descriptors*. Nova Science Publishers, New York, **2001**.
16. Mauri A., Consonni V., Todeschini R. Molecular Descriptors. En: Leszczynski J., editor. *Handbook of Computational Chemistry*. Springer, Dordrecht, **2016**, pp. 1–29.
17. Mazzatorta P., Smiesko M., Lo Piparo E., Benfenati E. *J. Chem. Inf. Model.* **2005**; 45, 1767–1774.
18. Hamadache M., Benkortbi O., Hanini S., et al. *J. Hazard. Mater.* **2016**; 303, 28–40.
19. Martin T.M., Lilavois C.R., Barron M.G. *SAR QSAR Environ. Res.* **2017**; 28, 525–539.
20. Toropov A.A., Toropova A.P., Marzo M., et al. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2017**; 53, 158–163.
21. Hamadache M., Benkortbi O., Hanini S., et al. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2018**; 25, 896–907.
22. Ghosh S., Ojha P.K., Carnesecchi E., et al. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2020**; 190, 110067.
23. Agriculture & Environment Research Unit (AERU) at the University of Hertfordshire, <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/index.htm>. Acceso el 28/7/2022.
24. ACD/ChemSketch, <https://www.acdlabs.com>. Acceso el 28/7/2022.
25. Open Babel for Windows, http://openbabel.org/wiki/Main_Page. Acceso el 28/7/2022.
26. PaDEL, <http://www.yapcsoft.com>. Acceso el 28/7/2022.
27. Yap C.W. *J. Comput. Chem.* **2011**; 32, 1466–1474.
28. Lavine B.K., Davidson C.E., Breneman C., et al. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2003**; 43, 1890–1905.
29. Hong H., Xie Q., Ge W., et al. *Chem. Inf. Model.* **2008**; 48, 1337–1344.
30. Mold², <https://www.fda.gov/science-research/mold2/access-mold2>. Acceso el 28/7/2022.
31. Datawarrior, <http://www.openmolecules.org/datawarrior/>. Acceso el 28/7/2022.
32. Valdes-Martini J.R., Jacas C.R.G., Marrero-Ponce Y., et al. *J. Cheminform.* **2017**; 9, 35–61.

33. QuBiLS-MAS, <http://tomocomd.com/software>. Acceso el 28/7/2022.
34. Rojas C., Duchowicz P.R., Tripaldi P., *et al.* *J. Chromatogr. A* **2015**; 1422, 277–288.
35. Rojas C., Duchowicz P.R., Tripaldi P., *et al.* *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2015**; 140, 126–132.
36. Rojas C., Tripaldi P., Duchowicz P.R. *IJQSPR* **2016**; 1, 76–90.
37. Duchowicz P.R., Castro E.A., Fernández F.M., *et al.* *Chem. Phys. Lett.* **2005**; 412, 376–380.
38. Duchowicz P.R., Castro E.A., Fernández F.M. *MATCH Commun. Math. Comput. Chem.* **2006**; 55, 179–192.
39. Tropsha A., Gramática P., Gombar V.K. *QSAR Comb. Sci.* **2003**; 22, 69–77.
40. Gramática P. *QSAR Comb. Sci.* **2007**; 26, 694–701.
41. Rücker C., Rücker G., Meringer M. *J. Chem. Inf. Model.* **2007**; 47, 2345–2357.
42. Arlot S., Celisse A. *Stat. Surv.* **2010**; 4, 40–79.
43. Eriksson L., Jaworska J., Worth A.P., *et al.* *Environ. Health Perspect.* **2003**; 111, 1361–1375.
44. Jaworska J., Nikolova-Jeliazkova N., Aldenberg T. *ATLA* **2005**; 33, 445–459.
45. Roy K., Kar S., Ambure P. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2015**; 145, 22–29.
46. GNU Octave, Scientific Programming Language, <https://www.gnu.org/software/octave/index>. Acceso el 28/7/2022.
47. Tute M.S. *History and Objectives of Quantitative Drug Design in Advances in Drug Research*. Academic Press, London, **1971**.
48. Todeschini R., Consonni V., Gramática P. Chemometrics in QSAR. En: R. Tauler, Walczak B., Brown S.D., editors. *Comprehensive Chemometrics: Chemical and Biochemical Data Analysis*. Elsevier, **2009**. pp. 129–170.
49. Golbraikh A., Tropsha A. *J. Mol. Graph. Model.* **2002**; 20, 269–276.
50. Chirico N., Gramática P. *J. Chem. Inf. Model.* **2012**; 52, 2044–2058.
51. Gramática P., Cassani S., Roy P.P., *et al.* *Mol. Inf.* **2012**; 31, 817–835.
52. Gramática P. *IJQSPR* **2020**; 5, 1–37.

APÉNDICE a Estudio QSAR de la toxicidad aguda en la lombriz *Eisenia foetida*, Duchowicz et al.

Tabla 1X. Valores de log CL₅₀ experimentales y predichos (**Ec. 1**) para 79 pesticidas. ^ conjunto de validación; * conjunto de predicción; ** conjunto de estimación.

N	CAS	Pesticida	Exp.	Ec. 1
1 [^]	2634-33-5	1,2-Benzisotiazolin-3-ona	2,4440	2,1922
2 [*]	542-75-6	1,3-Dicloropropeno	1,7451	1,6590
3 [*]	94-75-7	2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético)	2,5441	2,3732
4	135410-20-7	Acetamiprid	0,9542	1,5186
5	65-85-0	Ácido benzoico	2,5843	2,2573
6	116-06-3	Aldicarb	1,8129	2,2347
7	858956-08-8	Aminociclopiraclor	2,5647	2,1860
8	3337-71-1	Asulam	3,0000	2,6123
9 [^]	22781-23-3	Bendiocarb	2,2742	2,3758
10	1689-84-5	Bromoxinil	1,6532	2,1262
11	95465-99-9	Cadusafós	0,8573	1,2744
12 [^]	10605-21-7	Carbendazim	0,7324	1,0669
13 [*]	16118-49-3	Carbetamida	2,8195	2,4663
14	1563-66-2	Carbofurano	2,3502	2,4561
15	76-06-2	Cloropicrina	1,5775	2,5043
16	1897-45-6	Clortalonil	2,4289	2,1798

17	999-81-5	Cloruro de clormecuat	2,5051	2,2192
18*	24307-26-4	Cloruro de mepiquat (cloromecuato)	2,5045	2,1601
19	210880-92-5	Clotianidina	1,1209	0,7371
20	533-74-4	Dazomet	0,8129	1,5726
21	1014-69-3	Demetrina	2,2041	2,0803
22	2764-72-9	Dicuat	1,9745	2,5840
23	55290-64-7	Dimetipin	2,0086	2,3452
24	60-51-5	Dimetoato	1,4914	1,5226
25	165252-70-0	Dinotefurano	0,6902	0,9913
26	3347-22-6	Ditianona	2,7619	2,9231
27	534-52-1	DNOC	1,2041	1,2571
28	2439-10-3	Dodina	2,7380	2,1744
29	26225-79-6	Etofumesato	2,1271	2,5256
30	13194-48-4	Etoprofós	1,5977	1,1968
31	122-14-5	Fenitrotión	2,3636	2,2260
32^	74738-17-3	Fenpiclonil	2,0000	2,4305
33	951659-40-8	Flupiradifurona	2,2686	2,6008
34^	298-02-2	Forato	1,3181	1,3857
35	22259-30-9	Formetanato	3,0204	2,5640
36	10004-44-1	Himexazol	2,4501	2,1007
37*	138261-41-3	Imidacloprid	1,0294	0,7859
38	35554-44-0	Imizalil	2,7332	2,7545
39	556-61-6	Metilisotiocianato	0,6021	0,4834
40	58-89-9	Lindano	1,8325	1,7023
41	12427-38-2	Maneb	2,9243	2,1708
42	94-74-6	MCPA	2,5119	2,3918
43	70630-17-0	Mefenoxam	2,9191	2,4865
44*	41394-05-2	Metamitrona	2,9609	2,5734
45	67129-08-2	Metazacloro	2,6990	2,8110
46	16752-77-5	Metomilo	1,2788	2,0375
47	21087-64-9	Metribuzina	2,6304	2,3458
48*	23135-22-0	Oxamilo	2,0492	2,2608
49*	301-12-2	Metil-oxidemetón	2,0607	1,9073
50^	87-86-5	Pentaclorofenato	1,6812	1,9765
51^	106700-29-2	Petoxamida	2,4997	2,6815
52	709-98-8	Propanil	2,8657	2,2798
53	86763-47-5	Propisoclor	2,3945	2,5219
54	175217-20-6	Siltiofam	2,1239	2,2379
55	946578-00-3	Sulfoxaflor	-0,0680	-0,1282
56^	117-18-0	Tecnazén	3,0000	2,1899
57*	111988-49-9	Tiacloprid	2,0212	1,4746
58	62-56-6	Tiourea	3,0000	2,5043
59**	78-87-5	1,2-Dicloropropano	3,6274	1,7347

60**	34256-82-1	Acetoclor	2,0233	2,5037
61**	74070-46-5	Aclonifeno	2,1761	1,0307
62**	3060-89-7	Metobromuron	2,3674	2,4116
63**	94361-06-5	Ciproconazol	2,2253	1,6938
64**	81777-89-1	Clomazona	1,8921	2,2515
65**	1194-65-6	Diclobenil	2,1303	2,0682
66**	87674-68-8	Dimetenamida	2,1673	2,3394
67**	163515-14-8	Dimetenamida-P	2,4689	2,3394
68**	3766-81-2	Fenobucarb	1,0294	2,2901
69**	55-38-9	Fenti3n	2,5740	2,0266
70**	318290-98-1	Fluensulfona	2,1847	2,4915
71**	10265-92-6	Metamidof3s	1,5315	1,8432
72**	1746-81-2	Monolinur3n	3,0000	2,3075
73**	15299-99-7	Napropamida	2,4502	2,5252
74**	90-43-7	orto-Fenilfenol (OPP)	1,9961	2,6384
75**	298-00-0	Metilparati3n	1,6021	2,1009
76**	53112-28-0	Pirimetamil	2,4955	2,7269
77**	52888-80-9	Prosulfocarb	1,8561	2,0932
78**	28249-77-6	Tiobencarb	2,6405	1,2432
79**	185676-84-0	Verbutina	2,3572	2,1216

Tabla 2X. Valores num3ricos de los mejores descriptores de la toxicidad aguda.

N	GATS4m	nBondsD	SHBint4	APC8NX
1	1,33905289	4	0	0
2	1,49956736	1	0	0
3	1,01792681	4	0	0
4	0,97208074	4	0	1
5	1,22364160	4	0	0
6	0,73997572	2	0	0
7	1,27090547	4	0,26064119	0
8	1,11732428	6	0	0
9	1,01327549	4	0	0
10	1,19438509	3	0	0
11	2,18187034	1	0	0
12	1,15113969	5	8,05732566	0
13	1,11453406	5	0	0
14	0,87089232	4	0	0
15	0,00000000	1	0	0
16	1,09926728	3	0	0
17	0,24391021	0	0	0
18	0,34886079	0	0	0
19	0,90529743	4	4,7868067	1
20	1,65283038	1	0	0

21	0,72284939	3	1,82123827	0
22	1,16767258	6	0	0
23	1,32950262	5	0	0
24	2,00336991	2	0	0
25	0,85343210	2	6,89247398	0
26	0,82777680	7	0	0
27	1,22992630	5	6,68613932	0
28	0,84698552	2	0	0
29	1,00931763	5	0	0
30	2,31936225	1	0	0
31	1,54096460	5	0	0
32	1,17816345	5	0	0
33	0,87601542	5	0	0
34	1,98436898	1	0	0
35	0,94124567	5	0	0
36	0,97782713	2	0	0
37	0,97167965	5	0	2
38	0,86521782	6	0	0
39	3,84679392	2	0	0
40	1,16088869	0	0	0
41	0,85337600	2	0	0
42	0,98489242	4	0	0
43	1,07884441	5	0	0
44	1,18635075	6	0	0
45	0,76488416	6	0	0
46	1,08991277	2	0	0
47	0,80469082	3	0	0
48	0,95553174	3	0	0
49	1,32084535	2	0	0
50	1,17959330	3	0,92356253	0
51	0,73290317	5	0	0
52	1,06559477	4	0,38912993	0
53	0,75409970	4	0	0
54	1,36485978	4	-0,35188869	0
55	1,03140116	5	0	3
56	1,34306815	4	0	0
57	1,05017641	4	0	1
58	0,00000000	1	0	0
59	1,10336695	0	0	0
60	0,78645703	4	0	0
61	1,39592599	7	9,18692327	0
62	0,94979833	4	0	0
63	0,92299507	5	0	1

64	1,23387800	4	0	0
65	1,29723124	3	0	0
66	0,81611668	3	0	0
67	0,81611668	3	0	0
68	1,16539368	4	0	0
69	1,63289598	4	0	0
70	1,06982810	5	0	0
71	1,17282882	1	0	0
72	1,13448836	4	0	0
73	1,27187295	6	0	0
74	1,07117269	6	0	0
75	1,76280990	5	0	0
76	0,91403304	6	0	0
77	1,51458605	4	0	0
78	1,46061643	4	0	1
79	1,20243754	3	0	0

Nanocrystalline SnO₂ & detection of H₂S (g) in air

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE SnO₂ NANOCRISTALINO, DOPADO, APLICADO EN SENSORES DE GASES DE ALTA SENSIBILIDAD PARA DETECTAR PPM DE H₂S (g) EN AIRE

M. P. Poiasina, M. F. Bianchetti, E. Heredia, H. Canepa y N. E. Walsøe de Reca *

DEINSO-CITEDEF (UNIDEF-MINDEF-CONICET), Juan Bautista de La Salle 4387 (B1603ALO). Villa Martelli, Provincia de Buenos Aires (Argentina).

*Autor Corresponsal: bettywalsøe@gmail.com

Recibido: 27 de octubre de 2022 Aceptado: 30 de noviembre de 2022

Resumen

En este trabajo, se consideran varios factores que aumentan la sensibilidad de un sensor de tipo resistivo, de alta precisión, útil para detectar de (10 a 15) ppm de H₂S (g) en aire. Se acepta que el dopado del material sensor (SnO₂) aumenta la sensibilidad del dispositivo. Se probaron varios dopantes llegando a la conclusión de que el CuO era el más conveniente. Existen en la bibliografía numerosos trabajos que presentan diferentes técnicas para dopar el material del sensor pero, en este trabajo, se utilizó una técnica propia de dopado, desarrollada en el DEINSO, en la cual el dopante se encuentra distribuido en la red cristalina del SnO₂ en forma homogénea. Se propuso dopar el SnO₂ nanocrystalino, con distintas concentraciones de CuO (1% peso, 5% peso y 6% peso) para elegir la más adecuada que resultó de 5% peso de CuO. Con estas condiciones, se fabricó un sensor más sensible y se estudiaron otros factores para aumentar la sensibilidad. El 5% peso CuO-SnO₂ fue depositado en forma de películas delgadas formando un sistema multicapas (que emplea de tres a seis capas o láminas delgadas superpuestas). Se caracterizó el material con distintas técnicas como XRD, SEM-EDS y GISAXS mediante las cuales se determinó el tamaño promedio de cristalita, el espesor, la cristalinidad, la composición química y la porosidad de las películas. Con el sensor construido se detectó una concentración de (10-15) ppm de H₂S (g) en aire, a una temperatura de operación de 140°C, lo que permitió resolver la solicitud de un sensor de seguridad ambiental para la planta de *cracking* de una importante Institución Argentina (YTEC).

Si bien este tema no se incluye en este trabajo, se informa que el logro de un aumento de la sensibilidad de un sensor de este tipo permite detectar concentraciones de (4 a 5) ppm de H₂S en aire a una T_o de ~ 45°C, permitiendo construir un sensor de uso médico, para detectar

muy bajas concentraciones (menores de 5ppm) de $\text{H}_2\text{S}(\text{g})$ que se encuentran en halitosis de enfermedades hepáticas.

Palabras clave: *SnO₂ nanocristalino dopado; sensores de gases; detección de H₂S (g) en aire.*

Abstract

Several factors are considered in this article, which increase the sensitivity of a high precision resistive-type sensor, useful for detecting from (10 to 15) ppm of H_2S (g) in air. It is accepted that the doping of the sensor material (SnO_2) increases the sensitivity of the device. Various dopants were tested, concluding that CuO was the most suitable. There are numerous reports in the bibliography that show different techniques for doping the sensor material, but in this work, a proprietary doping technique was used, developed at DEINSO, in which the dopant is homogeneously distributed in the crystalline network of SnO_2 . It was proposed to dope the nanocrystalline SnO_2 with different concentrations of CuO (1% wt, 5% wt, and 6% wt) to choose the most suitable one that resulted in 5% wt CuO. With these conditions, a more sensitive sensor was carried out, and other factors were studied to increase the sensitivity. The 5% wt CuO- SnO_2 was deposited in the form of thin films forming a multilayer system (using three to six superimposed layers or thin sheets). The material was characterized with different techniques such as XRD, SEM-EDS, and GISAXS through which the average crystallite size, thickness, crystallinity, chemical composition, and porosity of the films were determined. With the built sensor, a concentration of (10-15) ppm of H_2S (g) was detected in air, at an operating temperature of 140°C, which allowed solving the request for an environmental safety sensor for the *cracking* plant of an important Argentine Institution (YTEC).

Although this subject is not included in this article, it is worth reporting that achieving increased sensitivity of such a sensor allows to detect concentrations of (4 to 5) ppm H_2S in air at a T_0 of ~ 45°C, just to build a sensor for medical use, to detect very low concentrations (less than 5 ppm) of H_2S (g) found in halitosis of liver diseases.

Keywords: *Doped nanocrystalline SnO₂; gas sensors; H₂S (g) detection in air.*

Introducción

El SnO_2 es un semiconductor de tipo **n** frecuentemente empleado en la fabricación de sensores de tipo resistivo para la detección de bajas concentraciones de gases tóxicos y explosivos, entre ellos: CO, VOCs, H_2 , NO_x , o H_2S .

El ácido sulfhídrico (H_2S) es un gas sumamente tóxico aún en bajas concentraciones. Se produce en forma natural, entre otros, en gases volcánicos, gas natural, aguas estancadas y por descomposición de la materia orgánica o, de forma artificial (producido en industrias químicas, laboratorios de investigación y plantas industriales).

En todos los casos, el monitoreo y detección temprana del H₂S (g) en el aire, es de gran importancia para garantizar la seguridad humana y los sensores constituyen la mejor manera de identificar y monitorear los niveles de detección.

En la industria petrolera, la actividad de extracción, refinamiento y *cracking* del petróleo, se ve afectada por la exposición al H₂S (g), ya que este gas se encuentra en los crudos del petróleo en sus yacimientos [1,2]. Los organismos internacionales de control como la Administración de Seguridad y Salud Ocupacional (OSHA), el Instituto de Salud y Seguridad Ocupacional (NIOSH) de EE.UU., la Conferencia Americana de Higienistas Industriales Gubernamentales (ACGIH), entre otros, han establecido para el personal de laboratorios y plantas, donde se produce el H₂S (g) un límite de exposición al gas en una jornada laboral de 8 h de: (10-15) ppm de H₂S (g) en aire. La Legislación Argentina (Resolución 295/03) también establece como concentración máxima permisible ponderada en el tiempo (CMP) y concentración máxima permisible para cortos períodos de tiempo (CMP-CPT) entre (10-15) ppm de H₂S (g) en aire respectivamente [3-5]. En consecuencia, el interés de los autores se focaliza en el desarrollo de sensores de alta sensibilidad para la detección de (10-15) ppm de H₂S (g) en aire, de acuerdo con lo solicitado por la planta de *cracking* de petróleo.

El trabajo de investigación que se presenta, se desarrolló en el marco de la Tesis de Doctorado de la Licenciada Mariana P. Poiasina, para acceder al título de Dra. en Ciencia y Tecnología, mención Materiales, del Instituto de Tecnología Jorge Sábato de la CNEA-Comisión Nacional de Energía Atómica y la Universidad Nacional de San Martín (UNSAM). El trabajo experimental se desarrolló en el Laboratorio de Materiales Nanoestructurados para Sensores de Gases, del Departamento de Investigaciones en Sólidos (DEINSO) - Centro de Investigaciones Científicas y Técnicas para la Defensa (CITEDEF-MINDEF), Unidad Ejecutora UNIDEF-CONICET y Ministerio de Defensa.

El DEINSO-UNIDEF-CITEDEF trabaja desde hace varias décadas en el estudio y desarrollo de sensores resistivos de gases, utilizando SnO₂ como material sensor para la detección de bajas concentraciones de gases tóxicos y explosivos, construidos con películas gruesas y delgadas. La experiencia previa del grupo, permitió demostrar que los sensores construidos con materiales nanocristalinos, alcanzan una mayor sensibilidad (33-37%) en comparación con los sensores construidos con el mismo material, aunque microcristalino. Por otra parte, la temperatura óptima de operación (T_o) disminuye de (360-450)°C a (180-200)°C y a rangos de temperatura aún menores de

acuerdo con las condiciones de trabajo, por ejemplo, si se emplea SnO₂ nanocristalino, en lugar de SnO₂ policristalino [6,7].

La funcionalidad del SnO₂ como sensor de gases, se debe a su composición, a su microestructura y a la actividad catalítica de la superficie. El dopado del SnO₂ con átomos metálicos u óxidos metálicos, agregados en bajas concentraciones, constituyen un aspecto a considerar ya que no sólo modifican la respuesta eléctrica de la película sensora sino que también puede modificar su microestructura. La bibliografía señala que el incremento de la sensibilidad y la selectividad al H₂S (g) de un sensor construido con SnO₂ se logra dopándolo con un óxido básico, en particular CuO. Si bien los autores de los trabajos consultados, comprobaron que, en el sistema CuO-SnO₂, las partículas de CuO dispersadas en el SnO₂ actúan como un receptor único para el H₂S (g), permitiendo aumentar la selectividad del sensor a dicho gas, aunque, en ningún caso, alcanzaron en esta etapa, una sensibilidad de (10 a 15) ppm de SH₂ (g) en aire como fue el solicitado a los autores [8-10]. Cabe destacar que, en los trabajos mencionados, se construyen sistemas en el que el dopante no se encuentra distribuido homogéneamente en toda la matriz nanocristalina de SnO₂ porque se construyen a partir de mezclas de polvos de los óxidos, o de CuO depositado en la superficie de SnO₂ o por difusión al poner en contacto láminas de Cu sobre el SnO₂ con el tratamiento térmico correspondiente [8-10]. En estos casos, resulta muy difícil lograr una distribución homogénea del dopante.

En este trabajo, se informa un método diferente de dopado, basado en la síntesis por *sol-gel*, a través de la cual, se obtiene SnO₂ nanocristalino, dopado homogéneamente con CuO pero con el CuO incluido en la red cristalina de SnO₂. Con este material, se construyó un sensor de películas delgadas superpuestas (sistema multicapas). El sistema fue caracterizado por distintas técnicas y se comprobó la alta sensibilidad al H₂S (g) y la baja temperatura de operación (T_o) del sensor construido.

1. Parte experimental

1.1 Método de síntesis y dopado

Los reactivos necesarios para la síntesis y el dopado del material sensible fueron: cloruro de estaño dihidratado (SnCl₂.2H₂O) (Merck P.A Emsure ACS, ISO, REAG. PH EUR.), etanol absoluto (Sintorgan para análisis A.C.S), CuCl₂.2H₂O (Merck P.A Emsure ACS, ISO, REAG. PH EUR.), ácido láctico (Sigma-Aldrich L1750-10G). Para el depósito de las películas delgadas superpuestas se utilizó un equipo de *dip-coating* construido en el laboratorio del DEINSO-UNIDEF-CITEDEF [11].

Como método de síntesis se utilizó la técnica de *sol-gel*, que es una ruta de síntesis química, a través de la cual, se obtienen materiales complejos a partir de precursores químicos más sencillos estructuralmente. A partir de la solución alcohólica de una sal, que contiene el catión metálico de interés, en este caso Sn⁺², se pueden obtener recubrimientos de estructura reticular. El proceso consiste en preparar una solución precursora de SnCl₂.2H₂O en etanol absoluto e introducirla en un baño caliente con agitación constante. Durante el calentamiento, ocurren reacciones de hidrólisis que dan lugar a la formación de una suspensión coloidal de partículas sólidas en un medio líquido (*sol*). Simultáneamente, ocurre una policondensación, se forman largas cadenas moleculares rodeadas de solvente, que generan una estructura reticular que constituye el *gel*, posteriormente, mediante un tratamiento térmico adecuado se forma el óxido metálico correspondiente, que mantiene la estructura reticular del precursor [12]. Se desarrolló un procedimiento de dopado por *sol-gel*. Esta forma de dopado presenta ventajas frente a las técnicas clásicas de dopado, por ejemplo: el dopado por impregnación, por mezcla de polvos o por difusión del CuO en el SnO₂. El material se forma a partir de una solución de Cu⁺²/Sn⁺², dando lugar a la formación de películas delgadas donde el CuO y el SnO₂ se encuentran formando parte de una misma red homogénea, dopada en una proporción determinada (5% en peso).

Con el trabajo de laboratorio se establecieron las condiciones óptimas de experimentación y se realizaron dos variantes de dopado diferentes que, posteriormente permitieron, con las caracterizaciones realizadas, descartar uno de ellos. Las variantes de experimentación se identificaron como técnicas MCuI y MCuII:

I. Técnica MCuI: Consiste en preparar una solución 0,5 M de SnCl₂.2H₂O en etanol absoluto, agregando un porcentaje en peso de CuCl₂.2H₂O (dopante), que se coloca en baño termostatzado entre (80-100)°C con agitación constante.

II. Técnica MCuII: Se prepara una solución 0,5 M de SnCl₂.2H₂O en etanol absoluto. Se coloca en baño termostatzado entre (80-100)°C con agitación constante. Una vez retirada la solución del baño se agrega a la solución un porcentaje en el peso correspondiente de CuCl₂.2H₂O.

Las soluciones obtenidas, tanto por MCuI como por MCuII, se depositaron, por *dip-coating*, sobre un sustrato de vidrio, formando un sistema multicapas (de tres capas

superpuestas). El tratamiento térmico se efectuó con baja velocidad de calentamiento desde T_{amb} hasta 400°C, manteniendo la temperatura por algunos minutos para que se realice la descomposición del precursor molecular, dando lugar a la formación del SnO₂ dopado.

1.2. Técnicas de Caracterización

Para el estudio de las propiedades de las películas obtenidas, se las caracterizó empleando las técnicas de: Difracción de Rayos X (XRD), usando un difractor Pananalytical, modelo Empryan con un detector PIXCEL3D, perteneciente al Laboratorio de DRX del Departamento de Física de la Materia Condensada, Gerencia de Investigación y Aplicación, GAIyANN-CAC-CNEA; Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) asociada con Dispersión de Energía de Rayos X (EDS) con un SEM marca Philips, modelo SEM 505 y un equipo SEM Carl Zeiss NTS SUPRA 40 pertenecientes al de Microscopía Electrónica (INTI-Mecánica) y al Centro de Microscopía Avanzadas (CMA) de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires respectivamente; Dispersión de Rayos X de Bajo Ángulo con Incidencia Rasante (GISAXS), la experiencia se realizó en el Laboratorio de Cristalografía Aplicada de la UNSAM, con un equipo Xenocs Xeuss 2.0, utilizando un detector Pilatus para registrar las imágenes 2D.

Posteriormente, para evaluar la sensibilidad y la temperatura óptima de operación del sensor se realizaron mediciones de las variaciones de la resistencia eléctrica del dispositivo cuando es expuesto a bajas concentraciones de H₂S (g) en aire.

Por DRX se estudió la cristalinidad del material y se calculó el tamaño promedio de cristalita usando la ecuación de Scherrer. Con SEM se observó en las películas su estado superficial y homogeneidad y se midió el espesor promedio del sistema multicapas formado por las tres láminas superpuestas. El análisis químico semicuantitativo de las películas se realizó por EDS con la Microsonda Electrónica incluida en el SEM. Finalmente, utilizando la técnica de GISAXS se determinó si la superficie era totalmente lisa o presentaba porosidad que aparece en superficie por procesos de fisisorción [13]. Se pudo determinar entonces la porosidad de las películas delgadas, el tamaño promedio de los poros y la dispersión de los mismos.

En los sensores de gases construidos con SnO₂ como material base que son, generalmente, sensores de tipo resistivo, ocurren reacciones de adsorción entre los adsorbatos de oxígeno del aire (adsorbatos: O⁻, O²⁻, O₂) y la superficie de los granos de

SnO₂. Cuando esto ocurre, se produce un aumento de la barrera de potencial en los bordes de grano (GB) debido al intercambio electrónico entre el SnO₂ y los adsorbatos. Cuando el sensor entra en contacto con un gas reductor, éste reacciona con los adsorbatos liberándolos de la superficie del SnO₂ y restituyendo los electrones al volumen del material, lo cual produce una disminución de la barrera de potencial y disminuye la resistencia eléctrica del material. Este cambio de resistencia eléctrica, que es proporcional a la cantidad de gas reductor, es el parámetro medible del sensor.

La sensibilidad (S) que se define como:

$$S = R_{\text{air}} / R_{\text{air+gas}}$$

donde: R_{air} es la resistencia eléctrica del material expuesto al aire puro y R_{air+gas} es la resistencia eléctrica del material expuesto a una mezcla de gas/ aire.

2. Resultados

Al estudiar las diferentes concentraciones propuestas de dopante se encontró una mayor sensibilidad en los sensores dopados con un 5% peso de CuO, (**Fig. 1**). Se caracterizaron las muestras obtenidas por las dos técnicas: MCuI y MCuII. Las imágenes superficiales de SEM muestran una superficie lisa y homogénea para el caso de las muestras MCuI (**Fig. 2a**). El análisis con EDS confirma que el cobre está distribuido homogéneamente en toda la superficie (**Fig. 2b**). En las muestras de MCuII se observan, en cambio, aglomeraciones cristalinas (**Fig. 3**). Con EDS se confirmó que los cristales aglomerados contienen Cu que no se distribuyó homogéneamente en la red cristalina del SnO₂ (**Fig. 4**). Se realizó un corte del sustrato correspondiente a la MCuI para observar el perfil y determinar el espesor del sistema multicapas (**Fig. 5**). Para un total de tres capas superpuestas, el valor promedio del espesor es de (230,4 ± 1,0) nm.

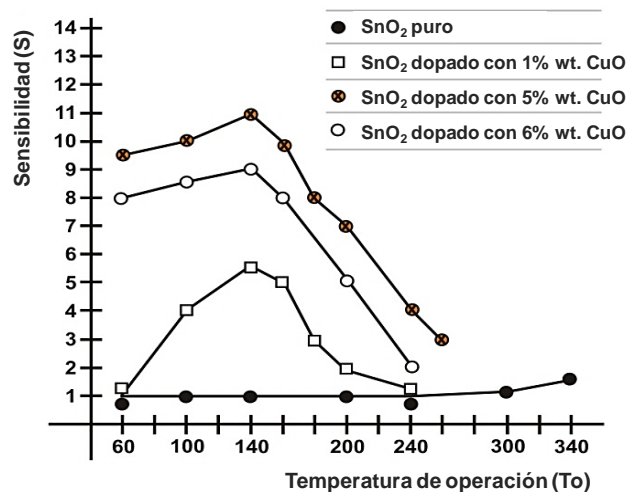


Figura 1: Cambio de la sensibilidad (S) en función de la temperatura de operación (T_o) para diferentes concentraciones de CuO (1%, 5% y 6%). La máxima sensibilidad corresponde al SnO₂ dopado con 5% en peso de CuO.

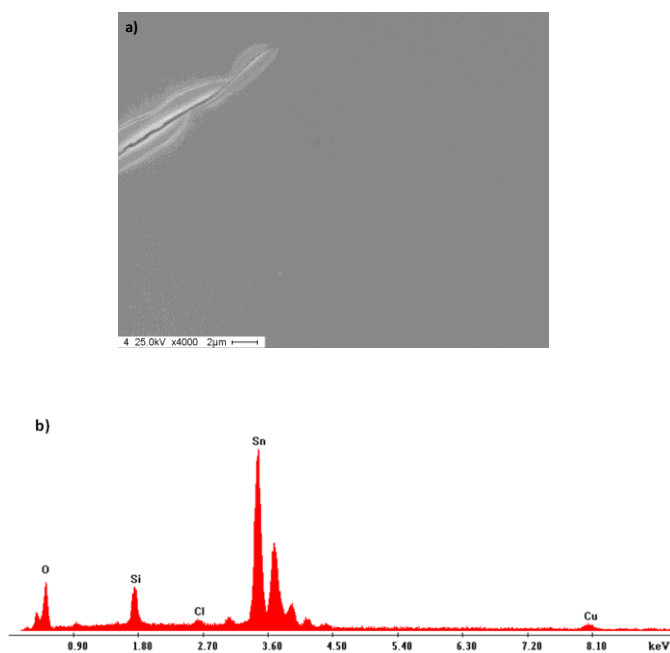


Figura 2: a) Imagen superficial de la muestra MCuI. b) Análisis EDS donde se muestra la presencia de Sn y Cu en la película.

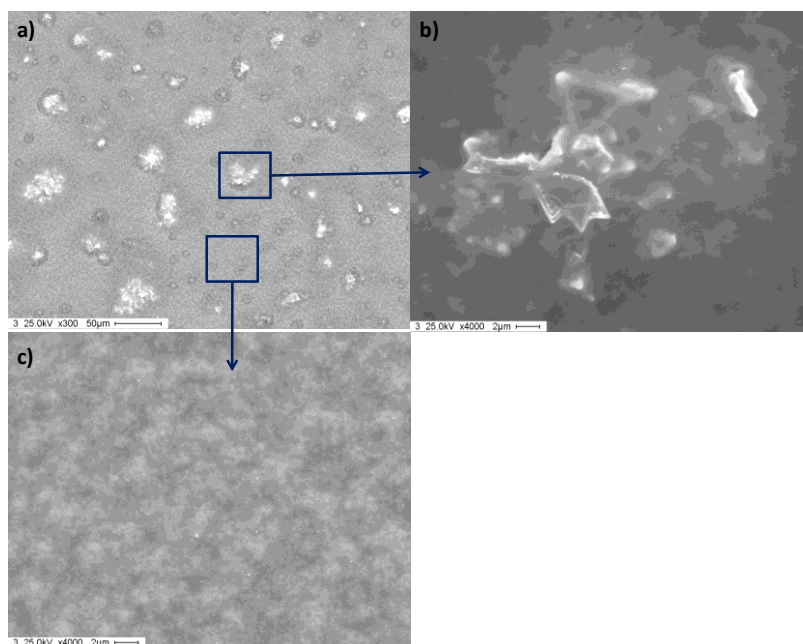


Figura 3: Micrografías de las muestras MCuII. **a)** Se observa una superficie no homogénea, con aglomeración de cristales. **b)** Ampliación de un aglomerado cristalino. **c)** Ampliación de la zona donde no hay aglomeración cristalina.

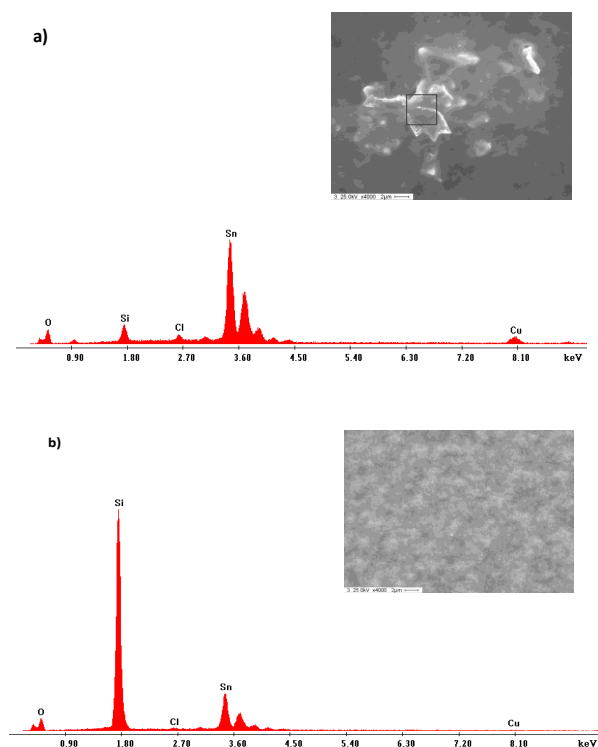


Figura 4: **a)** Análisis EDS de los cristales aglomerados que contienen una proporción baja de CuO. Se observa la presencia mayoritaria del Sn mientras que el Cu está en muy baja proporción. **b)** Análisis EDS de la zona sin aglomeración cristalina, no se registra Cu.

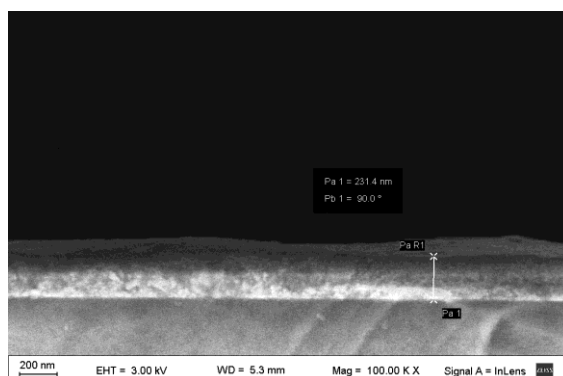


Figura 5: Micrografía (SEM, A= 100000x) en la que se observa un espesor de 231,4 nm para tres capas superpuestas depositadas por *dip-coating*. Las tres capas están señaladas con una flecha blanca.

Mediante el diagrama de Rayos X (XRD) se reconoció la fase de rutilo tetragonal correspondiente al SnO₂ puro (**Fig. 6**) en la muestra MCuI. El CuO no se llegó a detectar dado que la concentración es muy baja (5% peso) y se encuentra por debajo del límite de detección del método.

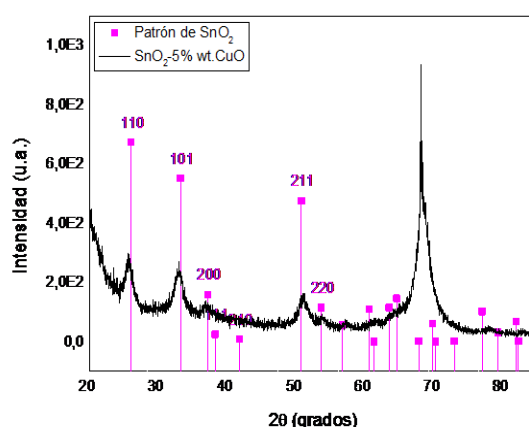


Figura 6: Resultados obtenidos de DRX correspondientes al sistema de multicapas de SnO₂ dopado con 5% peso de CuO, de la muestra MCuI.

Se calculó el tamaño promedio de cristalita aplicando la ecuación de Scherrer:

$$D_{sch} = \frac{k\lambda}{\beta \cos \theta}$$

donde: k es una constante (usualmente tomada como 0.94), λ es la longitud de onda del haz de rayos X, β es el ancho total a la mitad de la altura máxima (FWHM) de un pico dado (después de la eliminación del ensanchamiento instrumental), medido en radianes y θ es el ángulo difractado del pico (en radianes).

En la **Tabla 1** se presentan los resultados obtenidos.

Tabla 1: Valores obtenidos de FWHM (°), la posición de cada pico (°) y el valor calculado de D_{sch} para películas delgadas de SnO₂ dopado con un 5% peso con CuO.

Nº. picos	k	λ (nm)	2θ (°)	β (°)	D _{sch} (nm)
1	0,94	0,15418	26,59491	0,97647	8,26949 ± 0,14231
2	0,94	0,15418	33,8907	1,13307	7,004972 ± 0,23334
3	0,94	0,15418	37,20549	1,44423	5,445017 ± 0,07394
4	0,94	0,15418	51,93453	1,02631	7,268469 ± 0,39724

$$D_{sch} (\text{SnO}_2 \text{ dopado}) = (6,99 \pm 0,4) \text{ nm}$$

Por GISAXS se estudió la porosidad de las películas. Se analizaron tres muestras diferentes de tipo MCuI, en las que se varió el número de capas depositadas.

Las muestras de tipo MCuI se obtuvieron por *sol-gel* y *dip-coating*, depositando 2, 4 y 6 películas superpuestas (multicapas) sobre un sustrato de vidrio (**Tabla 2**).

Tabla 2: Características de las muestras analizadas por GISAXS

Tipo de muestra	Técnica de síntesis	Técnica de depósito	Número de capas	Tipo de sustrato
M4	sol-gel	dip-coating	4	Vidrio
M5	sol-gel	dip-coating	2	Vidrio
M6	sol-gel	dip-coating	6	Vidrio

Se obtuvo un valor de radio promedio de poro de entre 1,5 nm y 2,5 nm, no se encontró una dependencia de la porosidad con el número de capas depositadas. Se encontró que la forma de los poros es la de un elipsoide de revolución y se calculó su relación de aspecto: 2,34; 1,98 y 2,74 para las muestras de tipo M4, M5 y M6 respectivamente. Se calculó la dispersión del radio de los poros, obteniéndose los valores: 1,77 nm; 1,79 nm y 1,98 nm para las muestras de tipo M4, M5 y M6 respectivamente.

En las **Figs. 7, 8 y 9**, se muestran los gráficos, correspondientes a las muestras analizadas, donde se presentan: **a)** Los diagramas de GISAXS y **b)** los datos experimentales (línea de puntos), contrastados con el *fitting* realizado por el programa IsGisaxs (línea llena). Cada línea de color corresponde a los datos recolectados en una línea horizontal de los diagramas GISAXS.

La estadística para el cálculo del radio promedio de los poros y de la dispersión de los mismos, se hizo con el método de logNormal (**Fig. 10**). En la **Tabla 3** se presentan los resultados obtenidos.

No se observó una diferencia en la porosidad entre el SnO₂ puro y el dopado con bajas concentraciones de dopante (5% peso de CuO).

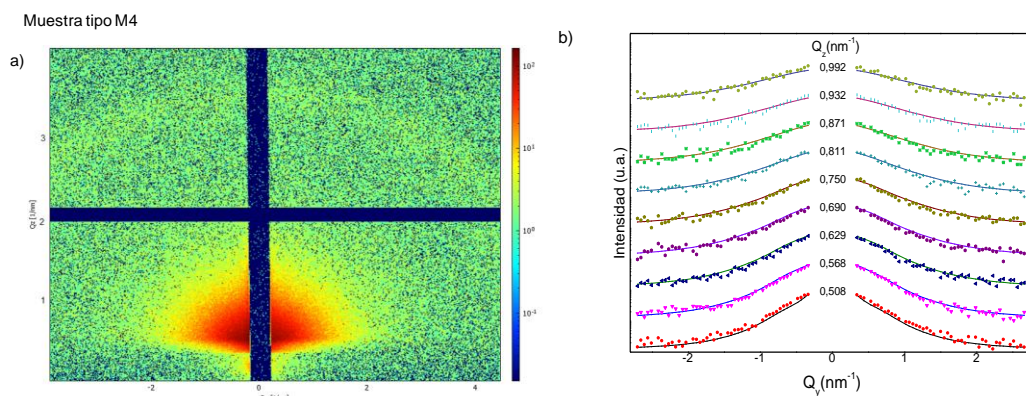


Figura 7: a) Diagrama de GISAXS. b) Gráfico donde se representan los datos experimentales y la línea de *fitting* determinada por el *software* de la muestra tipo M4.

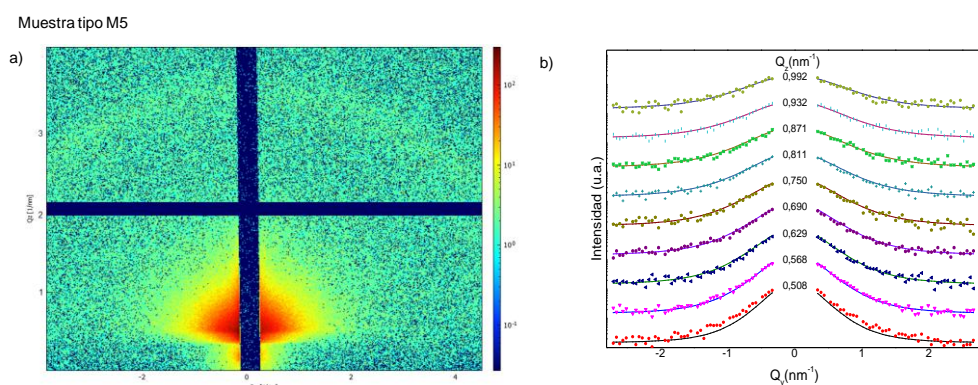


Figura 8: a) Diagrama de GISAXS. b) Gráfico donde se representan los datos experimentales y la línea de *fitting* determinada por el *software* de la muestra tipo M5.

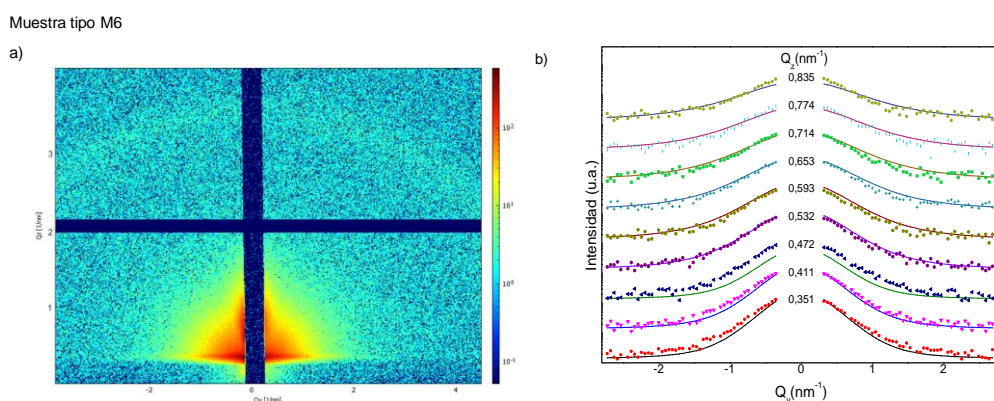


Figura 9: a) Diagrama de GISAXS. b) Gráfico donde se representan los datos experimentales y la línea de *fitting* determinada por el *software* de la muestra tipo M6.

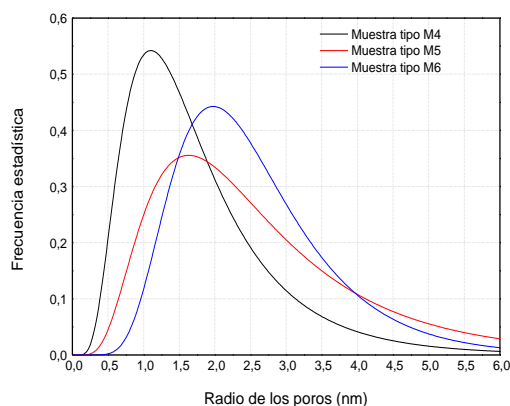


Figura 10: Gráfico en el que se representa la correspondencia entre el radio promedio de los poros y la frecuencia estadística, para las muestras de tipo M4, M5 y M6.

Tabla 3: Resultados obtenidos del radio medio de poro, la dispersión y la relación de aspecto de los poros, correspondientes a las muestras analizadas.

<i>Tipo de muestra</i>	<i>Radio medio de poro (nm)</i>	<i>Dispersión del radio (nm)</i>	<i>Relación de aspecto (altura/radio)</i>
M4	1,52	1,77	2,34
M5	2,29	1,79	1,98
M6	2,35	1,98	2,74

El sistema de medición de sensibilidad de los sensores fue diseñado en el laboratorio y está constituido por una fuente de corriente de precisión Keithley 220 y un electrómetro Keithley modelo 6517B para medir la resistencia eléctrica en función de la concentración de gas en aire.

La dosificación de los gases se realiza con un microcontrolador Atmega328 que maneja las electroválvulas de conmutación aire/aire+gas y los reguladores máxicos de caudal con los que se ajusta la concentración de dicha mezcla gaseosa. El mismo microcontrolador realiza la temporización de captura de datos del electrómetro.

Los flujos de aire/aire+gas y el sensor están termostatizados en la zona de medición por una placa calefactora alimentada con un regulador PID, basado en otro microcontrolador Atmega328.

Los datos obtenidos son almacenados en una PC para su procesamiento. El software fue desarrollado en el laboratorio y es actualizado permanentemente para adaptarlo a las necesidades y a los cambios que pudieran producirse en el sistema.

Los contactos en la muestra se realizan con pintura de plata de baja temperatura, realizando un tratamiento térmico a 120°C por 15 minutos, para que todo el ligante de la pintura se evapore y no interfiera en las mediciones. Para observar en forma gráfica los cambios en la resistencia eléctrica, se armaron ciclos en los que se conmuta la

circulación de aire sintético y de gas H_2S (diluido en aire sintético a distintas concentraciones). Una vez que la muestra se encuentra a la temperatura deseada de operación, se hace circular aire sintético para limpiar el circuito y luego, se comienza con los ciclos de conmutación de gases, mientras se mide la caída de tensión entre los contactos. Se realizaron las mediciones eléctricas en películas delgadas preparadas con la técnica MCuI y con la técnica MCuII (**Tabla 3**).

Tabla 3: Detalle de las muestras en las que se midieron los cambios de resistencia eléctrica cuando se está en presencia del H_2S (g) en aire.

<i>Tipo de sensor muestra</i>	<i>Composición de las muestras</i>	<i>Técnica de dopado</i>	<i>Depósito de película delgada</i>	<i>Tipo de sustrato</i>
MCuI	5% peso CuO SnO ₂	CuI	dip-coating 3 capas	Vidrio
MCuII	5% peso CuO SnO ₂	CuII	dip-coating 3 capas	Vidrio

La temperatura óptima de operación (T_o) fue de 140°C para las muestras tipo MCuI y MCuII (**Fig. 11**). La sensibilidad relativa (S_r) para las muestras MCuI resulta notablemente mayor que para las muestras MCuII (**Fig. 12**). Estos resultados conducen a la elección del material MCuI como sensor de H_2S (g) en aire.

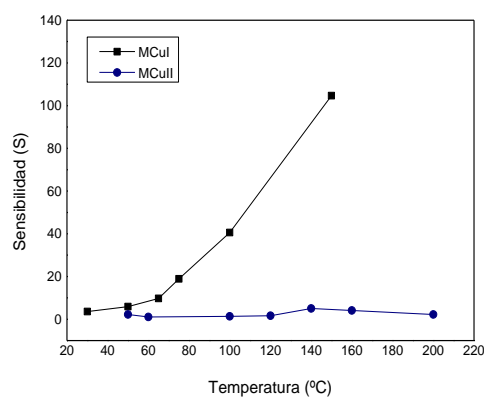


Figura 11: Gráfico de sensibilidad (S) en función de la temperatura de operación para ambas muestras.

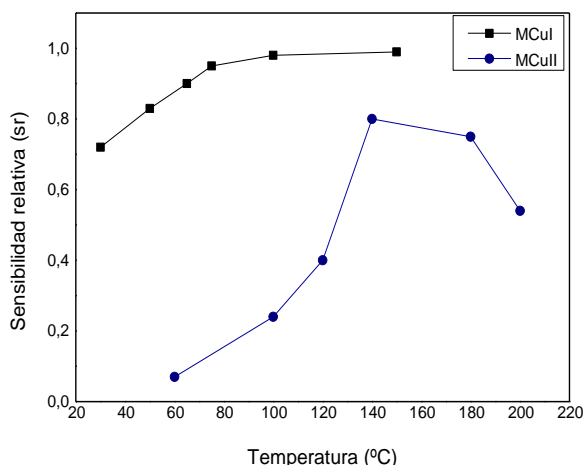


Figura 12: Sensibilidad relativa (Sr) en función de la temperatura para las muestras MCuI y MCuII.

Se determinó la variación de resistencia eléctrica del material MCuI expuesto a 10 ppm de H₂S (g) en aire, a una temperatura de operación de 140°C, encontrándose una buena respuesta sensora (**Fig. 13**).

Finalmente, se comparó la respuesta de sensado del sensor MCuI con la de un sensor construido con SnO₂ puro (sin dopar) para comprobar la mayor sensibilidad al H₂S (g) del sensor dopado con CuO.

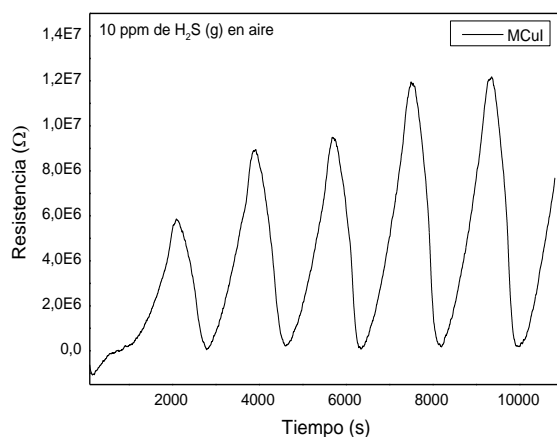


Figura 13: Cambio de la resistencia eléctrica del sensor MCuI expuesto a 10 ppm de H₂S (g) en aire, a T_o= 140°C.

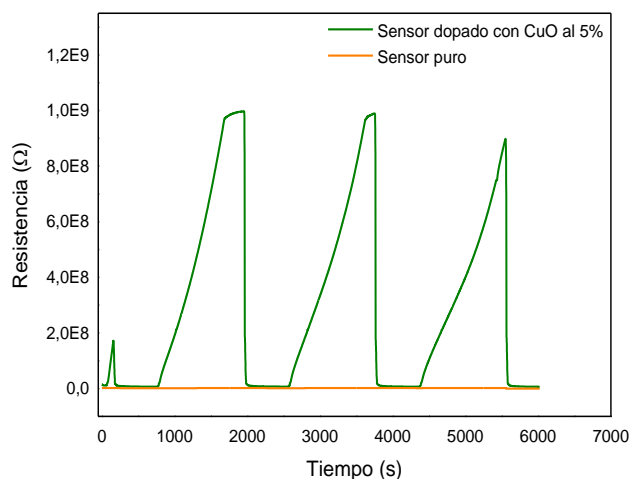
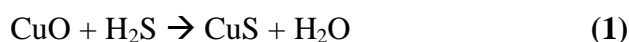


Figura 14: Gráfico de resistencia en función del tiempo para el sensor de H₂S (g). Para el sensor construido con SnO₂ dopado con 5% peso CuO (línea negra) para ciclos de aire/gas, a 140°C. Iguales mediciones para el sensor construido con SnO₂ puro sin dopar (línea roja).

3. Discusión

Con respecto al funcionamiento del sensor que detecta ppm de H₂S (g) en aire tenemos que considerar, en primer término, la construcción del dispositivo. El material de construcción (SnO₂) presenta una estructura cristalina homogénea dopada con un porcentaje de CuO considerablemente bajo. En este caso, se ha llegado a la conclusión de que la proporción de CuO más adecuada, contenida en la estructura homogénea, es de 5% peso. El CuO se introduce en la red del SnO₂ durante el proceso de dopado formando un material homogéneo. Después del dopado no hay cambios en el aspecto del SnO₂ dopado y se conserva la estructura cristalográfica tetragonal inicial del rutilo.

Los procesos habituales [8-10], consisten en dopar el SnO₂ por difusión intercalando capas de CuO o de Cu puro y dejándolas difundir en las láminas delgadas del SnO₂ siempre conservando la proporción de CuO, o bien, realizando un depósito con una mezcla de ambos óxidos, en los cuales se ha comprobado una distribución no homogénea del CuO en la red. Para el material de los sensores así construidos el mecanismo propuesto aún aceptado se describe en [14]. Los autores proponen que el CuO_x no estequiométrico (semiconductor de tipo p) y el SnO_{2-x} (semiconductor de tipo n), exhiben una fuerte interacción electrónica debida a las numerosas juntas p-n que causan una resistencia muy alta de los *films* en aire. En contacto con el gas reductor H₂S (g) el CuO se sulfuriza, de acuerdo con la **Ecuación (1)**:



Después de la exposición al O₂, el CuS sulfurizado se oxida nuevamente a CuO de acuerdo con la **Ecuación (2)**:



Existen numerosos trabajos sobre el tema, entre ellos se destacan los señalados en la bibliografía: [15-17]. Es interesante el trabajo de A. Khana *et al.* [16] en el cual las láminas delgadas fueron preparadas por evaporación térmica simultánea de Sn y Cu, asegurando también una distribución homogénea del dopante.

Las condiciones experimentales de este trabajo resultan considerablemente diferentes de las que se citan en casi todos los trabajos previos ya que, en este caso, los dos óxidos se mezclan durante su síntesis formando un sistema homogéneo como se expresó antes.

En cuanto al modelo de difusión del gas en el sistema de multicapas, construido en el DEINSO-UNIDEF-CITEDEF, es simple y geométrico, emplea, como se dijo más arriba, de tres a seis capas superpuestas de CuO-SnO₂, como se observa en el esquema de la **Fig. 15**, a través de las cuales el gas (H₂S) difunde por los defectos (tales como superficies, bordes de grano, dislocaciones, *clusters* (o aglomeraciones) de vacancias, interfaces o agujeros. En el proceso de difusión, térmicamente activado, el gas en contacto con la superficie externa se distribuye fácilmente sobre la misma y migra hacia el interior del sistema a través de corto-circuitos (por ejemplo: poros, dislocaciones o bordes de grano) [18].

En estadios posteriores, el gas encuentra interfaces o intercaras que separan dos láminas o capas adyacentes. Estas interfaces muestran dislocaciones causadas por los contactos no-epitaxiales entre capas vecinas. En otros contactos parciales entre láminas vecinas deformadas (por ejemplo: por tensiones) pueden aparecer agujeros que, a veces se aglomeran facilitando la difusión del gas. Estos defectos se comportan como los *clusters* (aglomeraciones) de vacancias.

En la **Fig. 15**, se han señalado los diferentes tipos de defectos en un modelo simple de un trabajo previo [7]. Además, si la técnica de depósito, tal como *dip-coating*, es usada para depositar las láminas delgadas, también se generan tensiones que aumentan la densidad de defectos. Para comprender el efecto de una densidad de defectos normal o aumentada, es fundamental simular los procesos de difusión-reacción y de sensado en el sistema.

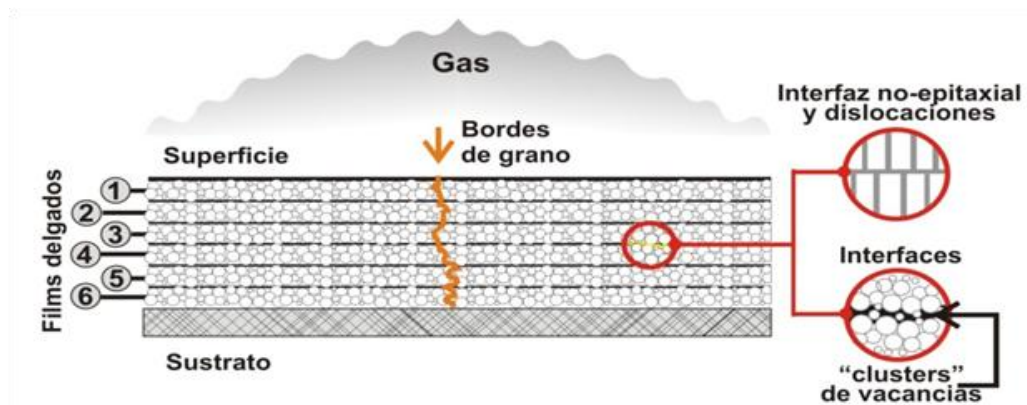


Figura 15: Modelo simple del sistema de multicapas con los distintos defectos que se han encontrado (SEM y TEM).

4. Conclusiones

Con la base de los resultados de sensibilidad obtenidos, queda demostrado que, en el sensor construido, existen varios factores que contribuyen a lograr una alta sensibilidad, uno de ellos es el uso de materiales nanocrystalinos: los nanomateriales tienen una mayor relación superficie/volumen que los materiales microcrystalinos, esto hace que haya más superficie de contacto entre el material sensible y el gas y, por lo tanto, aumenta la sensibilidad del sensor. Por otra parte, según el modelo de Yamazoe [8], existe una relación inversamente proporcional entre la sensibilidad y el tamaño de cristalita. Utilizando las técnicas de síntesis por *sol-gel* y *dip-coating*, bajo las condiciones especificadas en este trabajo, se obtuvo un material con tamaño muy bajo de cristalita que resultó óptimo: $(6,99 \pm 0,21)$ nm.

Un factor importante en el aumento de la sensibilidad y la selectividad de estos sensores es el método de dopado. Hemos reportado la técnica de dopado, basada en *sol-gel* y *dip-coating*. Se ha demostrado que este material presenta mayor sensibilidad que otros dopados con técnicas diferentes [8-10], esto se debe a que se obtuvo un material homogéneo, nanocrystalino, en donde el dopante se encuentra incluido en la red cristalina del SnO_2 .

Finalmente, como se mencionó en la discusión, el diseño del sensor en multicapas, sumado a las tensiones que se producen en las películas delgadas durante el proceso de depósito y el tratamiento térmico, generan un sistema de tensiones y defectos que aceleran la difusión del gas a través del material, aumentando la sensibilidad del dispositivo.

Con los factores mencionados como el tamaño de cristalita, método de dopado (con patente en proceso) y difusión acelerada a través de los defectos y las tensiones del

sistema multicapas, se explica la notable sensibilidad del sensor obtenido, llegando a detectar (10-15) ppm de H₂S (g) en aire, a una temperatura de operación (T_o) de 140°C y con la posibilidad de disminuir aún más el límite de detección y la T_o, según se informó previamente.

Referencias

1. Cheremisinoff N.P., Rosenfeld P. En: *Handbook of Pollution Prevention and Cleaner Production - Best Practices in the Petroleum Industry*, **2009**.
2. So Á., Valdez Salas B., Schorr Wiener M., *et al.* Materiales y corrosión en la Industria de gas natural. En: Valdez Salas B., Schorr Wiener M. (Eds.). *Corrosión y preservación de la infraestructura industrial*. Barcelona, España: OmniaScience; **2013**; pp. 87-102.
3. Información de la web en OSHA: <https://www.osha.gov/hydrogen-sulfide>
4. Información de la web en NIOSH: <https://www.cdc.gov/spanish/niosh/npg-sp/npgd0337-sp.html>
5. Información en la web de Legislación Argentina: <http://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/resoluci%C3%B3n-295-2003-90396/texto>
6. Bianchetti M., Walsøe de Reca N.E. Patente en trámite sobre *Thick Film Sensor to sense Hydrogen built with nanostructured pure Tin Oxide*, P20130101354, applied on 11/04/2018.
7. Poiasina M.P., Arrieta C.L., Bianchetti M.F., Walsøe de Reca N.E. Resistive thick and thin film gas sensors built with nanomaterials and related research. Capítulo 1 del libro: *Advances in Sensors: Reviews*, Vol. 6, Book Series, ISBN: 978-84-09-03031, Ed. Yurish S.Y., IFSA-Barcelona-Spain and Amsterdam-The Netherlands, **2018**; pp. 1-37.
8. Tamaki J., Maekawa T., Miura N., *et al.* CuO-SnO₂ element for highly sensitive and selective detection of H₂S. *Sens. Actuators B Chem.* **1992**; 9, 197-203.
9. Liu J., Huang X., Liu W., *et al.* H₂S detection sensing characteristic of CuO/SnO₂ sensor. *Sensors* **2003**; 3, 110-118.
10. Ayesh A., Alyafei A., Anjum R., *et al.* Production of sensitive gas sensors using CuO / SnO₂ nanoparticles. *Appl. Phys. A* **2019**; 125, 550..
11. Equipo de *dip-coating* construido en el DEINSO-UNIDDEF-CITEDEF por: Bianchetti M., Bravo H.; Ficha Técnica N° 887/ISSN 0325-152, **2015**.
12. Brinker C.J., Scherer G.W. *Sol-Gel Science - The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*. Academic Press Inc., Boston, **1990**.
13. Thommes M., Kaneco K., Neimark A., *et al.* Physisorption of gases, with special reference to the evaluation of surface area and pore size distribution (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* **2015**; 87 (9-10), 1051-1069.
14. Devi G.S., Manorama S., Rao V.J. High sensitivity and selectivity of a SnO₂ sensor to H₂S around 100°C. *Sens. Actuators B Chem.* **1995**; 28, 31-37.
15. Manorama S., Devi G.S., Rao J.V. Hydrogen sulfide sensor based on tin oxide deposited by spray pyrolysis and microwave plasma chemical vapor deposition. *Appl. Phys. Lett.* **1994**; 64, 3163-3168.
16. Khana A., Kumar R., Bhatti S. CuO-doped SnO₂ thin films as hydrogen sulfide gas sensor. *Appl. Phys. Lett.* **2003**; 82 (24), 4388-4390.
17. Lu H., Ma W., Gao J. Diffusion-reaction theory for conductance response in metal oxide gas sensing thin films. *Sens. Actuators B Chem.* **2000**; 66, 228-231.
18. Matsunaga N., Sakai G., Shimanoe K., *et al.* Diffusion equation basic study of thin film semiconductor gas sensor-response transient. *Sens. Actuators B Chem.* **2002**; 83, 216-221.

Properties of some triple metal oxalates

STRUCTURAL AND SPECTROSCOPIC PROPERTIES OF SOME TRIPLE METAL OXALATES

María M. Torres^{1,2}, Daniel Palacios^{1,2}, Vicente L. Barone³, Ana C. González-Baró³
and Enrique J. Baran^{3,*}

¹Departamento de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de la Patagonia Austral, 9400-Río Gallegos, Argentina.

²Departamento de Ciencias Básicas, UTN-Facultad Regional Santa Cruz, 9400-Río Gallegos, Argentina.

³ Centro de Química Inorgánica (CEQUINOR, CONICET/UNLP/CICPBA), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Bvd.120 N° 1465, 1900-La Plata, Argentina.

*Autor Corresponsal: E.J.Baran: E-mail: baran@quimica.unlp.edu.ar

Recibido: 28 de abril de 2022 Aceptado: 20 de mayo de 2022

Resumen

Se preparó y caracterizó una serie de oxalatos triples de estequiometría $MM'M''(C_2O_4)_3 \cdot 6H_2O$ ($MM'M'' = MgZnCo/MgMnCo/MnCoZn/Fe/Co/Zn$). Su comportamiento estructural fue investigado por medio de difracción de rayos X en polvos, mostrando una fuerte analogía estructural con la fase ortorrómbica, llamada forma β , de los oxalato-complejos simples de composición $MC_2O_4 \cdot 2H_2O$. El comportamiento espectroscópico vibracional de estos oxalatos triples fue investigado por espectroscopía de infrarrojo y Raman. Los resultados obtenidos confirmaron claramente las fuertes analogías estructurales existentes entre estos complejos y las series α - $MC_2O_4 \cdot 2H_2O$, β - $MC_2O_4 \cdot 2H_2O$ y $MM'(C_2O_4)_2 \cdot 4H_2O$.

Palabras clave: Oxalatos metálicos triples; difracción de rayos X en polvos; características estructurales; espectros de IR y Raman; comportamiento vibracional.

Abstract

A series of triple metal oxalates of stoichiometry $MM'M''(C_2O_4)_3 \cdot 6H_2O$ ($MM'M'' = MgZnCo/MgMnCo/MnCoZn/Fe/Co/Zn$) have been prepared and characterized. Their structural behavior was investigated by means of X-ray powder diffraction, showing a strong structural analogy to the orthorhombic, so-called β -modification, of the related simple oxalato complexes of composition $MC_2O_4 \cdot 2H_2O$. The vibrational spectroscopic behavior of these triple

metal oxalates was investigated by infrared and Raman spectroscopy. The results clearly confirmed the close structural analogies existing between these complexes and the series α - $\text{MC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, β - $\text{MC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and $\text{MM}'(\text{C}_2\text{O}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$.

Keywords: Triple metal oxalates; X-ray powder diffractometry; structural characteristics; IR and Raman spectra; vibrational behavior.

1. Introduction

Recently, we have investigated the structural and vibrational-spectroscopic behavior of double oxalates of stoichiometry $\text{MM}'(\text{C}_2\text{O}_4) \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (with $\text{MM}' = \text{MnCo}$, MnNi , MnZn , CoNi , CoCu , CoZn , NiCu , NiZn and CuZn) [1] and $\text{MgM}(\text{C}_2\text{O}_4) \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (with $\text{M} = \text{Mn}$, Fe , Co , Ni and Zn) [2]. Both series show a very interesting structural behavior as they present structures closely related to the so called β -modification of the simple $\text{M}(\text{C}_2\text{O}_4) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ oxalates, despite the fact that in these cases the α -modification is the thermodynamically most stable modification and the $\beta \rightarrow \alpha$ transformation is irreversible [3-5].

In order to extend these studies we have now prepared and investigated the structural and spectroscopic behavior of some triple metal oxalates.

2. Materials and Methods

Synthesis of the compounds

The investigated triple oxalates, of composition $\text{MM}'\text{M}''(\text{C}_2\text{O}_4)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($\text{MM}'\text{M}'' = \text{MgZnCo}/\text{MgMnCo}/\text{MnCoZn}/\text{Fe}/\text{Co}/\text{Zn}$) were prepared using 0.2 M chloride solutions of the respective metallic salts. An initial solution was prepared by mixing together 40 mL of each of the three chloride metal solutions at room temperature. This solution was heated to 50 °C and then added dropwise to 40 mL of a warm (50-60 °C) 1.2 M oxalic acid solution, under continuous stirring. The heating and stirring was continued for 10 minutes more and after that the solution was left to attain room temperature and the precipitated oxalates were separated by filtration and washed several times with small portions of cold water. Finally they were dried in air at room temperature. The purity of the obtained complexes was checked by elemental analysis (C and H) using a Carlo Erba model EA 1108 elemental analyzer. The water content was determined, independently, by heating a known sample amount to a constant weight at 100 °C, 120 °C, and 150 °C and determining the loss of weight.

X-ray powder diagrams

The obtained complexes were characterized by X-ray powder diffractometry, with a Rigaku-Denki diffractometer and monochromatic (Ni-filtered) Cu-K α radiation ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$), using NaCl as an external calibration standard.

Vibrational spectra

The infrared spectra, in the spectral range between 4000 and 400 cm $^{-1}$, were recorded with a FTIR-Bruker-EQUINOX-55 spectrophotometer, using the KBr pellet technique. Raman spectra were obtained in the same spectral range with a Thermo Scientific DXR Raman microscope, using the 532 nm line of a Thermo Scientific solid-state laser diode pump for excitation.

3. Results and Discussion

3.1. Structural characteristics

The dihydrated metal oxalates of stoichiometry M II (C $_2$ O $_4$) \cdot 2H $_2$ O, with M II = Mg, Fe, Co and Ni present two polymorphic forms, called α - and β -modifications. And, as mentioned, thermodynamically the α -modification is the most stable form and the $\beta \rightarrow \alpha$ transformation is irreversible [3-5].

The structural characteristics of the now prepared triple-metal oxalates were derived from the analysis of the corresponding X-ray powder diffractograms. These diagrams are practically identical for the full series of complexes, and show again, as in the case of all the previously investigated double metal complexes, a close relationship to that of the β -modification of the M II (C $_2$ O $_4$) \cdot 2H $_2$ O complexes.

These relationships become clearly evident by inspection of the diagrams presented in **Fig. 1**. In this figure, we have compared the X-ray powder diagrams of α -CoC $_2$ O $_4$ \cdot 2H $_2$ O [6] with those of the respective β -modification [6], the now prepared MnCoZn(C $_2$ O $_4$) $_3$ \cdot 6H $_2$ O oxalate and the previously investigated MnCo(C $_2$ O $_4$) $_2$ \cdot 4H $_2$ O [1]. As can be seen, MnCoZn(C $_2$ O $_4$) $_3$ \cdot 6H $_2$ O, shows a very similar diagram to that of the double oxalate MnCo(C $_2$ O $_4$) $_2$ \cdot 4H $_2$ O and both resembles that of β -CoC $_2$ O $_4$ \cdot 2H $_2$ O. These comparisons strongly suggest that also all the new oxalates of stoichiometry MM'M''(C $_2$ O $_4$) $_3$ \cdot 6H $_2$ O belong the β -modification of the simple M(C $_2$ O $_4$) \cdot 2H $_2$ O metal oxalates.

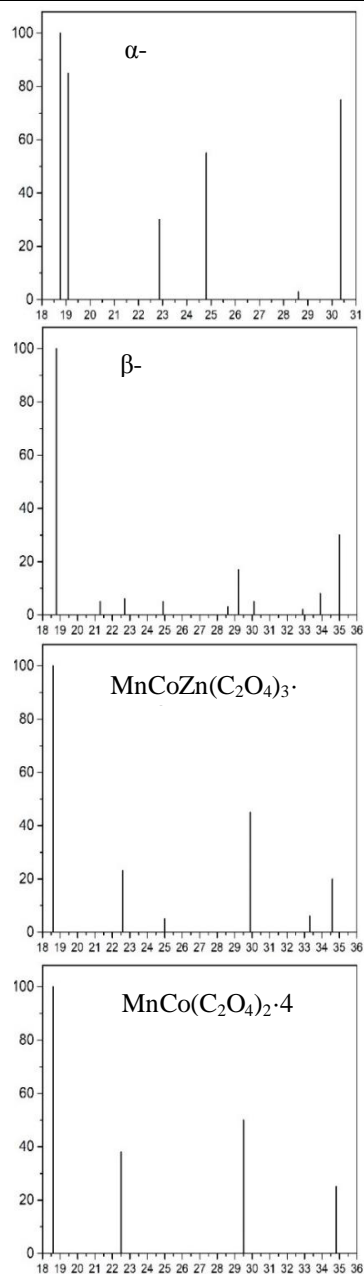


Figure 1. Comparison of the powder diagrams of α - $\text{CoC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, β - $\text{CoC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCoZn}(\text{C}_2\text{O}_4)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ and $\text{MnCo}(\text{C}_2\text{O}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ in the 2θ range between 18 and 36° .

3.2. Vibrational spectra

In our previous papers we have demonstrated that the vibrational (IR and Raman) spectra of the α - and β -modifications of the $\text{M}(\text{C}_2\text{O}_4) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ complexes are totally identical, confirming the close structural relationship between them [3]. Therefore, this methodology is not useful to distinguish between these two polymorphic forms.

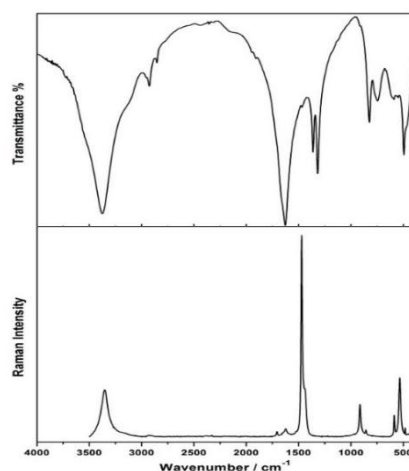


Figure 2. FTIR (above) and Raman spectra (below) of $\text{MgZnCo}(\text{C}_2\text{O}_4)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

The FTIR spectra of the previously prepared double metal oxalates [1,2] as well as those now prepared triple metal oxalates, are also similar to those recorded for the two polymorphs of the simple dihydrated oxalates. On the other hand, the spectra of all these new triple metal oxalates are practically identical.

As examples of the measured spectra, **Fig. 2** shows the FTIR and Raman spectra of $\text{MgZnCo}(\text{C}_2\text{O}_4)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ and an assignment of these spectra is presented in **Table 1**. In order to complement the spectroscopic information the assignment of the FTIR spectra of the other three oxalates is shown in **Table 2**. All these assignments are supported on the same theoretical arguments discussed in our previous studies [1,2] and, therefore, only a very brief additional discussion is necessary to be added.

Table 1. Assignment of the FTIR and FT-Raman spectra of $\text{MgZnCo}(\text{C}_2\text{O}_4)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Band positions in cm^{-1}).

Infrared	Raman	Assignments
3540 sh, 3375 vs, 3132 sh	3365 s	$\nu(\text{OH}) (\text{H}_2\text{O})$
2927 w, 2853 vw	2935 sh	
1659 sh, 1627 vs	1708 w, 1622 w	$\nu_{\text{as}}(\text{CO})$
1468 sh	1470 vs	$\nu_{\text{s}}(\text{C-O}) + \nu(\text{C-C})$
	1440 sh	$\nu_{\text{s}}(\text{C-O}) + \delta(\text{OCO})$
1362 m, 1317 s		$\nu_{\text{s}}(\text{C-O}) + \delta(\text{OCO})$
	913 m, 856 w	$\nu(\text{C-C})$
824 s		$\nu(\text{C-C}) + \delta(\text{OCO})$
745 m, br		$\rho(\text{H}_2\text{O})$
588 w, 548 vw, 494 s, 467 sh	585 w, 532 m, 482 vw	δ_{ring}
	446 sh	δ_{ring}

vs, very strong; s, strong; m, medium; w, weak; vw, very weak; sh, shoulder; br, broad

Also in these cases, the strongest IR band corresponds to the antisymmetric carboxylate stretching vibration, $\nu_{\text{as}}(\text{CO})$, whereas the strongest Raman line is assigned to the respective symmetric stretching, partially coupled with one of the $\nu(\text{C-C})$ modes.

Besides, the fact that the $\nu_{\text{as}}(\text{CO})$ vibration generates also two very weak signals in the Raman spectra, suggests the presence of either weak coupling or distortional effects in the unit cell, which partially activate originally forbidden vibrations.

Table 2. Assignment of the FT-Infrared spectra spectra of $\text{MgMnCo}(\text{C}_2\text{O}_4)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCoZn}(\text{C}_2\text{O}_4)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ and $\text{FeCoZn}(\text{C}_2\text{O}_4)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Band positions in cm^{-1}).

$\text{MgMnCo}(\text{C}_2\text{O}_4)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$\text{MnCoZn}(\text{C}_2\text{O}_4)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$\text{FeCoZn}(\text{C}_2\text{O}_4)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Assignments
3376 vs, 3120 sh,	3379 vs, 3132 sh	3371 vs, 3125 sh	$\nu(\text{OH})$ (H_2O)
2929 w, 2850 vw	2960 w, 2840 vw	2928 w, 2855 vw	
1659 sh, 1626 vs	1662 sh, 1627 vs	1660 sh, 1628 vs	$\nu_{\text{as}}(\text{CO})$
1361 m, 1316 s	1362 m, 1317 s	1362 m, 1317 s	$\nu_{\text{s}}(\text{C-O}) + \nu(\text{C-C})$
822 s	821 s	823 s	$\nu(\text{C-C}) + \delta(\text{OCO})$
741 m,br	745 m,br	743 m,br	$\rho(\text{H}_2\text{O})$
589 sh, 557 m,br, 494 s	588 m, 554 vw, 494 s	589 sh, 556 vw, 494 s	δ_{ring}

vs, very strong; s, strong; m, medium; w, weak; vw, very weak; sh, shoulder; br, broad

Most of the other characteristic vibrations, for example, $\nu(\text{C-C})$ stretching vibrations and OCO deformation modes as well as the $\rho(\text{H}_2\text{O})$ “rocking” are found in the usual ranges.

The band related to the stretching motions of the water molecules is very strong and well defined in the IR spectra and somewhat weaker in the Raman spectra. Its position suggests that the water hydrogen atoms are involved in relatively strong H-bonds [7,8]. The strength of these bonds are similar to that found in the previously investigated double oxalates [1,2]. As suggested in other previously investigated cases, it is assumed that the bending mode of water, $\delta(\text{H}_2\text{O})$, is overlapped by the strongest IR band and attains not enough intensity in the Raman spectra.

4. Conclusions

A series of triple metal oxalates of composition $\text{MM}'\text{M}''(\text{C}_2\text{O}_4)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($\text{MM}'\text{M}'' = \text{MgZnCo}/\text{MgMnCo}/\text{MnCoZn}/\text{Fe}/\text{Co}/\text{Zn}$) were prepared and characterized. X-ray powder diffractometry shows that they present a strong structural analogy to the so-called β -modification of the related simple oxalates of the type $\text{MC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and to the previously investigated series $\text{MM}'(\text{C}_2\text{O}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ [1] and $\text{MgM}'(\text{C}_2\text{O}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ [2]. This fact is highly exciting because in these simple oxalates the α -modification is the thermodynamically most stable form. Besides, the vibrational spectroscopic behavior of all these groups of complexes is totally similar, confirming additionally the close structural analogies existing between all of them.

Acknowledgements: This work was supported by the UNPA and the UNLP.

References

1. D'Antonio M.C., Torres M.M., Palacios D., González-Baró A.C., Barone V.L., Baran E.J. *An. Asoc. Quím. Argent.* **2018**; 105, 41-48.
 2. Torres M.M., Palacios D., González-Baró A.C., Barone V.L., Baran E.J. *An. Asoc. Quím. Argent.* **2020**; 107, 64-72.
 3. Baran E.J. *J. Coord. Chem. Rev.* **2014**; 67, 3734-3768.
 4. Baran E.J., Monje P.V. Oxalate Biominerals. En: Sigel A., Sigel H., Sigel R.K.O. (Eds.), *Metal Ions in Life Sciences*. Vol. 4, J. Wiley, Chichester, **2008**; pp.219-254.
 5. Deyrieux R., Péneloux A. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1969**; 2675-2681.
 6. Deyrieux R., Berro Ch., Péneloux A. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1973**; 25-34.
 7. Siebert H. *Anwendungen der Schwingungsspektroskopie in der Anorganischen Chemie*. Springer, Berlin, **1966**.
 8. Libowitzky E. *Monatsh. Chem.* **1999**; 130, 1047-1059.
-

Corrosion of Ni-W alloys on steel

EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA A LA CORROSIÓN DE ALEACIONES Ni-W ELECTRODEPOSITADAS SOBRE ACERO AL CARBONO EN UN MEDIO CONTENIENDO ANIONES CLORURO

Gerardo R. Ocampo*, Facundo E. Herrera, Patricio A. Orrillo y Susana B. Ribotta

1: Instituto de Investigaciones Físicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA), Universidad Nacional de La Plata-CONICET, CP: 1900, La Plata, Argentina.

2: Centro de Investigación y Desarrollo en Materiales Avanzados y Almacenamiento de Energía de Jujuy (CIDMEJU), CP: 4612, Palpalá, Jujuy.

3: Centro Atómico Constituyentes, Comisión Nacional de Energía Atómica (CNEA), CP:1650, Buenos Aires, Argentina.

4: Instituto de Química del Noroeste Argentino (INQUINOA-CONICET), Instituto de Química Física, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, Universidad Nacional de Tucumán, CP:4000, San Miguel de Tucumán, Argentina.

*Autor corresponsal: gerardoocampo@inifta.unlp.edu.ar

Recibido: 28 de marzo de 2022 Aceptado: 8 de agosto de 2022

Resumen

Distintas aleaciones Ni-W fueron electrodepositadas sobre superficies de acero al carbono a partir de una solución electrolítica de sulfato de níquel, tungstato de sodio, citrato de sodio, cloruro de amonio y bromuro de sodio con un pH de 9,5, agitación magnética y a una temperatura controlada de 65°C. Para obtener dichas aleaciones se emplearon diferentes programas de corriente en la electrodeposición mediante la técnica galvanostática pulsante de onda cuadrada simétrica, de modo que los pulsos de alta frecuencia conducían a aleaciones nanoestructuradas y los pulsos de baja frecuencia conducían a aleaciones microestructuradas. La resistencia a la corrosión de estas aleaciones fue evaluada mediante diferentes técnicas electroquímicas, tales como voltamperometría cíclica, espectroscopía de impedancia electroquímica y medidas de potencial a circuito abierto, empleando un medio corrosivo altamente agresivo al acero conteniendo aniones cloruro. Los resultados de esta caracterización indicaron que la resistencia a la corrosión de estas aleaciones depende del programa de pulsos empleado para su electrodeposición, obteniéndose los mejores resultados para las aleaciones nanoestructuradas de Ni-W obtenidas con pulsos de alta frecuencia y a una densidad de corriente catódica de -140 mA.cm^{-2} .

Palabras Clave: Corrosión, Acero al carbono, Aleaciones Ni-W, Electrodeposición.

Abstract

Different Ni-W alloys were electrodeposited on carbon steel surfaces from an electrolytic solution of nickel sulfate, sodium tungstate, sodium citrate, ammonium chloride and sodium bromide pH 9,5, magnetic shake stirring and a controlled temperature of 65°C. To obtain these alloys, different current programs were used in the electrodeposition employing the symmetric square wave pulsed galvanostatic technique, so that high frequency pulses led to nanostructured alloys and low frequency pulses led to microstructured alloys. Corrosion resistance of these alloys was evaluated by different electrochemical techniques, such as cyclic voltammetry, electrochemical impedance spectroscopy and open circuit potential measurements, employing a highly aggressive corrosive medium to steel containing chloride anions. The results of this characterization indicated that corrosion resistance of these alloys depends on pulse program used for electrodeposition, obtaining the best results for nanostructured Ni-W alloys obtained with high frequency pulses and at a density of cathodic current of -140 mA.cm^{-2} .

Keywords: Corrosion, Carbon steel, Ni-W Alloys, Electrodeposition.

1. Introducción

El acero al carbono es un metal muy ampliamente utilizado en la industria debido a su bajo costo y buena resistencia mecánica [1]. La corrosión por picado de este material ha sido la causa de importantes pérdidas económicas en diferentes áreas. Es por este motivo que la protección del acero siempre es un tópico de interés a ser abordado [2].

En este contexto, las aleaciones Ni-W electrodepositadas sobre acero al carbono han demostrado un excelente comportamiento protegiendo al acero mediante una buena resistencia a la corrosión [3]. Estas aleaciones se pueden obtener con buena adherencia sobre la superficie del acero por un proceso de electrodeposición a partir de un baño de electrólisis compuesto por sulfato de níquel, tungstato de sodio, citrato de sodio y otros aditivos bajo condiciones hidrodinámicas y de temperatura controlada. De resultados previamente obtenidos en las mencionadas condiciones experimentales empleando el baño de electrólisis y pulsos de corriente de baja frecuencia durante la electrodeposición galvanostática se pueden obtener aleaciones microestructuradas de Ni-W, mientras que el empleo de pulsos de corriente de alta frecuencia permite obtener aleaciones nanoestructuradas de Ni-W [4]. Los estudios de corrosión de estas aleaciones realizados mediante distintas técnicas de superficie (espectroscopía Fotoelectrónica de rayos X, Microscopía de Fuerza Atómica, entre otras) y electroquímicas en medios corrosivos conteniendo aniones sulfato han demostrado que las aleaciones nanoestructuradas

exhibían las mejores propiedades en ese medio [5], por lo que resultó de gran interés indagar en el estudio de la corrosión -desde un punto de vista electroquímico- frente a un medio corrosivo conteniendo aniones cloruro, que presentan mayor agresividad frente al acero.

El objetivo de este trabajo fue obtener aleaciones Ni-W micro/nanoestructurados sobre electrodos de acero al carbono empleando la electrodeposición galvanostática con pulsos de onda cuadrada mediante diferentes programas de corriente pulsante, con el fin de evaluar comparativamente la resistencia a la corrosión de las aleaciones obtenidas ante un medio electrolítico conteniendo aniones cloruro, agresivos al acero, mediante diferentes técnicas electroquímicas (Voltamperometría Cíclica (CV), Espectroscopía de Impedancia Electroquímica (EIS) y medidas de potencial a circuito abierto (OCP)).

2. Materiales y Métodos

2.1. Electrodo de trabajo

Para el presente trabajo se utilizaron, electrodos de acero al carbono SAE 1020 de 1cm² de área aparente. En la **Tabla 1** se describe la composición química según la ficha técnica [6]:

Tabla 1. Composición Química de acero al carbono (SAE 1020).

<i>%C</i>	<i>%Mn</i>	<i>%Si</i>	<i>%P</i>	<i>%S</i>
0,18-0,23	0,30-0,60	0,15- 0,35	≤ 0,04	≤ 0,05

Previo a la electrodeposición se preparó cada electrodo mediante un pretratamiento de la superficie, que consistió en el pulido mecánico de las misma empleando papel esmeril de granulometría descendente (80, 180, 220, 360, 500, 1000, 1500, 2000, 2500), finalizando con alúmina en polvo de 0,30 μm en paño de pulido, empleando una pulidora para muestras metalográficas.

2.2. Electrodeposición de Ni-W

La electrodeposición de Ni-W se realizó mediante la técnica galvanostática pulsante de onda cuadrada simétrica, sobre la superficie de los electrodos de acero al carbono pulidos mecánicamente (área expuesta: 1 cm²), a partir de un baño de electrólisis constituido por sulfato de níquel, tungstato de sodio, citrato de sodio, cloruro de amonio y bromuro de sodio, pH 9,5, con agitación magnética y a una temperatura controlada de

65°C. Los electrodepósitos se obtuvieron en atmósfera saturada de nitrógeno. Para cada experimento se utilizó un electrodo de trabajo nuevo y un baño de electrólisis fresco empleando reactivos químicos de grado analítico y agua destilada. Se empleó un electrodo de plata-cloruro de plata saturado como referencia y como electrodo auxiliar una chapa de platino de gran área. El esquema de pulsos de corriente consistió en tiempos de permanencia a circuito abierto (τ_{off}) y a la corriente de reducción (τ_{on}) donde $\tau = \tau_{\text{on}} = \tau_{\text{off}}$ tomando valores de 0,005 s y de 10 s. La densidad de corriente empleada fue de $i_{\text{red}} = -70 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ y de $i_{\text{red}} = -140 \text{ mA}\cdot\text{cm}^{-2}$. El tiempo de deposición (t_{dep}) fue de 60 min.

2.3. Solución electrolítica

El estudio electroquímico del acero y de las diferentes aleaciones Ni-W se realizó empleando como electrolito una solución buffer fosfato (KH_2PO_4 0,1 M) -borato ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 0,05 M), pH 8,0 y la adición de NaCl 0,5 M, que proporciona los aniones cloruro agresivos al acero.

2.4. Medidas electroquímicas

Se registró la evolución del OCP de los electrodos de trabajo durante una hora de inmersión en la solución electrolítica conteniendo NaCl 0,5 M. Los experimentos se realizaron a 25°C en atmósfera saturada de N_2 . A continuación se efectuaron medidas de EIS, a potencial a circuito abierto, en el intervalo de frecuencias $30 \text{ kHz} \geq f \geq 10 \text{ mHz}$, con una perturbación senoidal de potencial de $\pm 5 \text{ mV}$. Por último, se realizaron medidas de CV a velocidades de barrido de potencial de 20 mV/s. Las mediciones se realizaron en una celda convencional de vidrio con tres compartimientos (**Fig. 1**), que posee un burbujeador con una llave de tres vías, que permite purgar el oxígeno de la solución y mantener una atmósfera saturada en nitrógeno. Se utilizó una chapa de Pt de gran área como contraelectrodo y de referencia un electrodo de calomel saturado (SCE). Además, se utilizaron como electrodos de trabajo (área aparente = 1 cm^2) electrodos de acero al carbono electrodepositados con la aleación Ni-W, y como control un electrodo de acero al carbono desprovisto del electrodepósito.



Figura 1. (a) Celda electroquímica. (b) Electrodo de acero al carbono pulido mecánicamente y anclado a su respectivo soporte.

2.5. Equipamiento empleado

Para obtener los electrodepositos se utilizó un Potenciostato/Galvanostato Teq-04, controlado por microprocesador, que permite la programación y aplicación de pulsos de corriente. Las medidas electroquímicas se llevaron a cabo empleando un analizador de frecuencias/potenciostato/galvanostato Zahner IM6e controlado a través de una computadora personal, utilizando el programa Thales.

3. Resultados y Discusión

En las medidas de OCP (**Fig. 2a**) se observa que el potencial para el acero, inicialmente en $-0,30$ V, se desplaza hacia potenciales más negativos rápidamente durante los primeros 200 s (3,3 min), alcanzando un potencial aproximado de $-0,69$ V; luego el descenso de la curva es mucho más suave, alcanzando un potencial final de $-0,71$ V a los 3600 s (60 min). Para la aleación Ni-W la variación en el valor del OCP es mucho menor que la observada para el acero, alcanzando un potencial de aproximadamente $-0,39$ V lo suficientemente estable luego de 60 min. Los resultados obtenidos al cabo de una hora, revelan que la aleación Ni-W alcanza valores de OCP más nobles que el acero, lo que indicaría que ésta es más resistente a la corrosión.

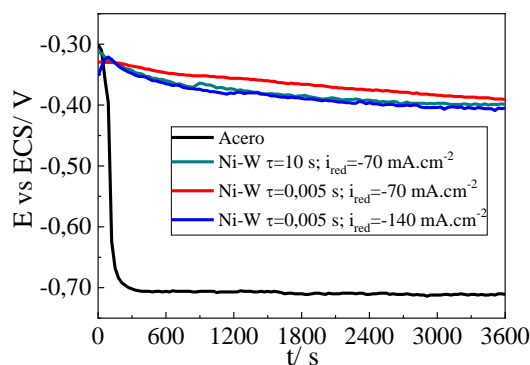


Figura 2. Medidas experimentales de OCP en función del tiempo.

Los estudios comparativos de la resistencia a la corrosión de las aleaciones Ni-W electrodepositadas sobre electrodos de acero al carbono y del acero al carbono sin electrodeposito se realizaron mediante mediciones de EIS llevadas a cabo a circuito abierto en presencia de solución buffer de pH 8,00 con agregado de aniones cloruro. En la **Fig. 3** el diagrama de Nyquist obtenido para el acero sin recubrimiento muestra un semicírculo levemente distorsionado en la región de altas frecuencias y en la región de frecuencias intermedias y bajas una componente difusional. Los diagramas obtenidos para las aleaciones Ni-W electrodepositadas sobre electrodos de acero empleando $i_{red} = -70 \text{ mA cm}^{-2}$ son similares, aunque el comportamiento capacitivo se mantiene hasta valores de frecuencia más bajos. El diagrama de Nyquist de las aleaciones Ni-W obtenidas con $i_{red} = -140 \text{ mA cm}^{-2}$ exhibe comportamiento capacitivo en las tres regiones de frecuencia, lo que indicaría que el proceso de corrosión estaría minimizado.

El comportamiento capacitivo durante un intervalo mayor de frecuencias indica que la resistencia a la polarización es más grande, indicando que existe una protección eficaz del acero. Los mejores resultados fueron obtenidos empleando $i_{red} = -140 \text{ mA cm}^{-2}$.

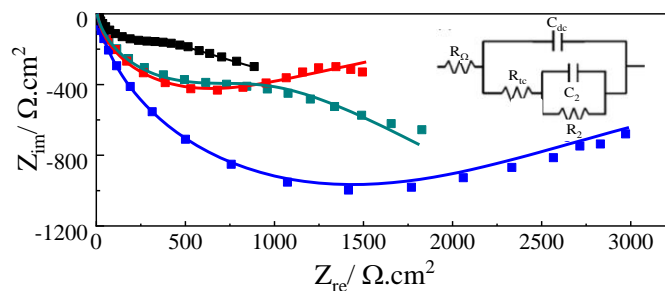


Figura 3. Diagramas de Nyquist experimentales para el acero al carbono (■), y a distintos parámetros empleados durante la electrodeposición de las aleaciones Ni-W: $\tau = 10 \text{ s}$, $i_{red} = -70 \text{ mA cm}^{-2}$ (■); $\tau = 0,005 \text{ s}$, $i_{red} = -70 \text{ mA cm}^{-2}$ (■) y $\tau = 0,005 \text{ s}$, $i_{red} = -140 \text{ mA cm}^{-2}$ (■). Los ajustes obtenidos con el circuito equivalente propuesto se indican con líneas sólidas.

Los estudios comparativos de la resistencia a la corrosión de las aleaciones Ni-W electrodepositadas sobre electrodos de acero al carbono y del acero al carbono sin electrodeposito se realizaron mediante mediciones de EIS medidos a circuito abierto en presencia de la solución electrolítica con agregado de aniones cloruro. En las **Figs. 3 y 4** se muestran los resultados experimentales de EIS en las distintas representaciones gráficas (Diagramas de Nyquist y Bode) obtenidos.

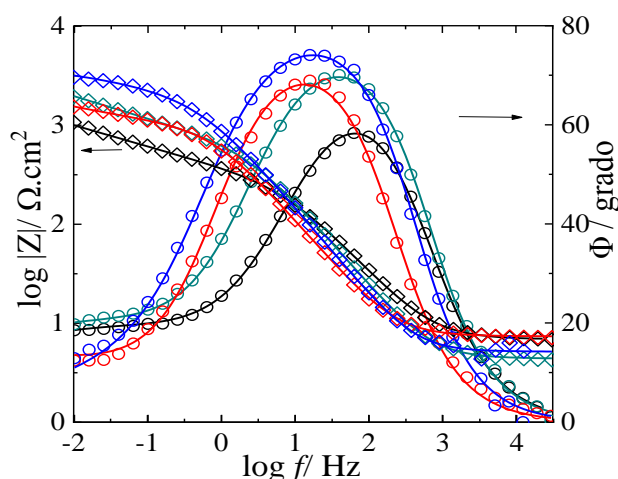


Figura 4. Diagramas de Bode experimentales: fase (o) y $\log |Z|$ (\diamond) y ajustados (—) para el acero al carbono (—), y las distintas aleaciones Ni-W obtenidas a distintas condiciones de electrodeposición: $\tau = 10$ s, $i_{\text{red}} = -70$ mA cm⁻² (—); $\tau = 0,005$ s, $i_{\text{red}} = -70$ mA cm⁻² (—) y $\tau = 0,005$ s, $i_{\text{red}} = -140$ mA cm⁻² (—).

Los resultados experimentales obtenidos fueron ajustados mediante el circuito equivalente propuesto en la **Fig. 3**, que incluye una componente R_{Ω} atribuida a la suma de todos los componentes óhmicos del sistema y dos subcircuitos RC. El primer subcircuito está conformado por la R_{tc} (resistencia a la transferencia de carga) en paralelo con la C_{dc} (capacidad de la doble capa). El segundo subcircuito RC, conectado en serie con la R_{tc} , se atribuye al proceso difusional del electrodo de acero sin electrodeposito; para la aleación está asociado a modificaciones de la película de Ni-W y/o a la formación de una película de óxidos de níquel que recubre la aleación [7]. En las **Figs. 3 y 4** se observa la buena concordancia entre los datos experimentales y los ajustados.

En la **Fig. 4** se observa, a frecuencias intermedias la existencia de una sola constante y un aumento en el ángulo de fase de la aleación Ni-W con respecto al ángulo de fase del acero. Esto es característico del comportamiento capacitivo no ideal en la región de frecuencias intermedias. Se podría asociar éste aumento gradual del ángulo de fase a la reducción de la velocidad de disolución del metal [8].

A partir de la simulación se obtienen los resultados expuestos en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Datos obtenidos del ajuste para los sistemas acero y aleación Ni-W en solución Buffer en presencia de NaCl.

<i>MUESTRA</i>	$R_{tc}/\Omega.cm^2$
Acero	222
Ni-W $\tau = 10$ s, $i_{red} = -70$ mA	617
Ni-W $\tau = 0,005$ s, $i_{red} = -70$ mA	892
Ni-W $\tau = 0,005$ s, $i_{red} = -140$ mA	3250

La resistencia a la corrosión en el sistema bajo estudio se analizó en términos de la R_{tc} relacionada a los procesos de oxidación de la superficie. El electrodo de acero sin electrodeposición presenta el menor valor de R_{tc} . Al analizar los valores de las aleaciones Ni-W, la obtenida con pulsos de $i_{red} = -140$ mA.cm⁻² es la que presenta el mayor valor con respecto al acero y, por lo tanto, la de mayor resistencia a la corrosión en la solución estudiada. Las aleaciones Ni-W obtenidas con pulsos de $i_{red} = -70$ mA.cm⁻² muestran un valor de R_{tc} intermedio entre el del acero y el de la aleación obtenida con pulsos de $i_{red} = -140$ mA.cm⁻².

Por otra parte, se realizaron medidas de voltamperometría cíclica a $v=20$ mV/s, con el propósito de estudiar la estabilidad y el comportamiento de las aleaciones Ni-W obtenidas y del acero al carbono sin recubrimiento en una solución electrolítica con agregado de aniones cloruro.

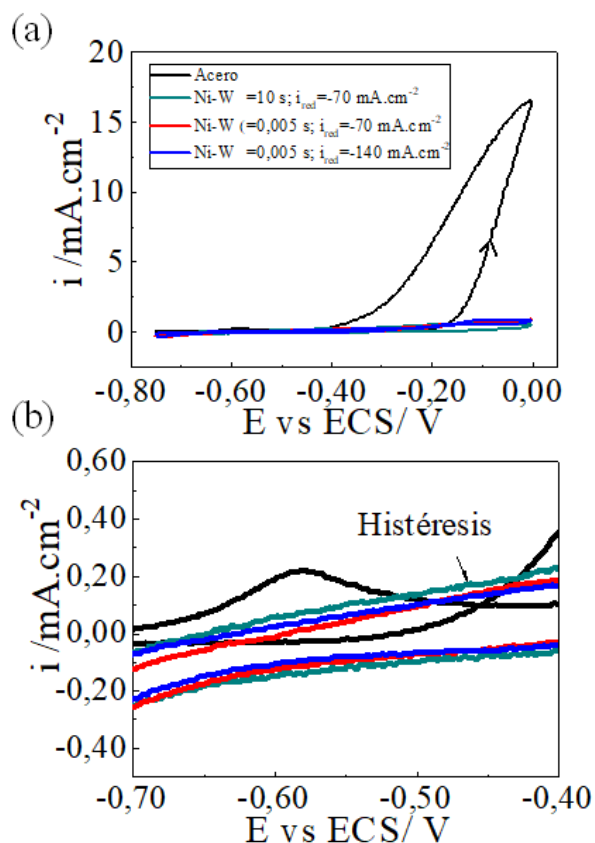


Figura 5. (a) Voltamperogramas de acero y de las aleaciones Ni-W obtenidas en distintas condiciones de electrodeposición, registrados en solución buffer en presencia de NaCl 0,5 M; $v = 20$ mV/s. (b) Magnificación de (a) en la región -0,7V a -0,4V.

En la **Fig. 5a** se muestran los voltamperogramas obtenidos en las condiciones mencionadas anteriormente. Para el electrodo de acero sin recubrimiento se observa a -0,59 V (**Fig. 5b**) la respuesta electroquímica típica del hierro (Pico I), que se atribuye al proceso de oxidación del hierro en la superficie [4]. En el caso de las aleaciones Ni-W esta respuesta no es visible (no se observa el pico I). Esto último podría indicar que la superficie del acero fue totalmente recubierta por los electrodepositos, lo que coincide con los espectros de XPS de alta resolución obtenidos por otros autores, donde se confirma el óptimo recubrimiento de la superficie debido a la ausencia de la señal del Fe 2p, característica del acero desnudo [5]. Por otro lado, la histéresis observada a -0,45 V indica que la solución electrolítica produce la corrosión por picado del acero sin recubrimiento [9]. Esta respuesta no se observa para las aleaciones Ni-W, lo que demuestra que la resistencia a la corrosión es buena en las distintas condiciones de obtención de las mismas. Esta resistencia se ha atribuido a la acumulación de W en la aleación, que inhibe el proceso de disolución anódica en la superficie [4]. En este aspecto resulta interesante y complementario profundizar el estudio de la estabilidad y

comportamiento de las aleaciones Ni-W ante la corrosión, monitoreando el sistema antes y después de las medidas electroquímicas mediante técnicas de superficie (por ejemplo, XPS), así como también investigar la respuesta electroquímica en otros medios corrosivos de interés tecnológico.

5. Conclusiones

La resistencia a la corrosión de las aleaciones Ni-W obtenidas en las condiciones de trabajo es buena en un medio corrosivo conteniendo aniones cloruro. El comportamiento electroquímico de las aleaciones Ni-W está determinado por las diferentes i_{red} aplicadas para su obtención. Los mejores resultados se obtuvieron para la aleación nanoestructurada de Ni-W obtenida con pulsos de alta frecuencia y densidad de corriente catódica de -140 mA.cm^{-2} .

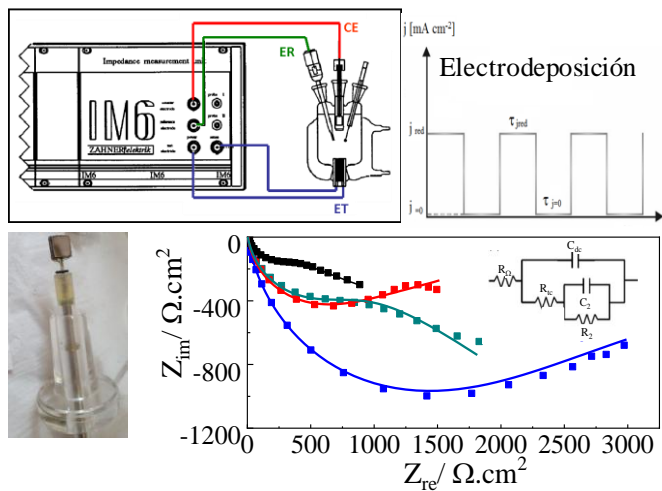
6. Agradecimientos

Los autores del presente trabajo agradecen el apoyo financiero del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), de la Agencia Nacional para la Promoción de la Ciencia y la Tecnología (ANPCyT) y del Consejo de Investigaciones de la Universidad Nacional de Tucumán (CIUNT).

7. Referencias

1. Suzuki S., Muraoka R., Obinata T., *et al. JFE Tech. Rep.* **2004**, 2 (2): 41–48.
2. Morcillo M., De La Fuente D., Díaz I., *et al. Rev. Metal.* **2011**, 47 (5): 426–444.
3. Obradović M.D.; Bošnjakov G.Ž., Stevanović R.M., *et al. Surf. Coatings Technol.* **2006**, 200 (14–15): 4201–4207.
4. Quiroga Argañaraz M.P., Ribotta S.B., Folquer M.E., *et al. Electrochim. Acta* **2011**, 56 (17): 5898–5903.
5. Quiroga Argañaraz M.P., Ribotta S.B., Folquer M.E., *et al. J. Solid State Electrochem.* **2013**, 17 (2): 307–313.
6. ACEROS OTERO. Empresa certificada. http://www.acerosotero.cl/acero_carbono_sae_1020. Accedido en 2019.
7. Orrillo P.A., Ribotta S.B., Gassa L.M., *et al. Appl. Surf. Sci.* **2018**, 433: 292–299.
8. Singh A., Lin Y., Quraishi M.A., *et al. Molecules* **2015**, 20 (8): 15122–15146.
9. Vela M.E., Benítez G., *et al. Acta Microsc* **2015**, 18: 1–3.

Resumen Gráfico (Graphical Abstract)



Plasma Biomarkers by Mass Spectrometry & Alzheimer's disease

BIOMARCADORES PLASMÁTICOS DE DIAGNÓSTICO Y DE PROGRESIÓN DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER POR ESPECTROMETRÍA DE MASA

Alicia B. Pomilio*¹, Arturo A. Vitale¹ y Alberto J. Lazarowski²

¹ Departamento de Bioquímica Clínica, Área Hematología, Hospital de Clínicas “José de San Martín”, Universidad de Buenos Aires, Av. Córdoba 2351, C1120AAF Buenos Aires, Argentina. abpomilio@sinectis.com.ar; pomilio@ffyb.uba.ar. aavitale@sinectis.com.ar; avitale@ffyb.uba.ar

² Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Instituto de Fisiopatología y Bioquímica Clínica (INFIBIOC), Universidad de Buenos Aires, Córdoba 2351, C1120AAF Buenos Aires, Argentina. nadiatom@ffyb.uba.ar; alazarowski@gmail.com

*Autor correspondiente: ABP e-mail: abpomilio@sinectis.com.ar; pomilio@ffyb.uba.ar

Recibido: 28 de marzo de 2022 Aceptado: 15 de julio 2022

Resumen

El objetivo de este trabajo es resaltar la relevancia de la espectrometría de masa para la identificación de péptidos y proteínas implicados en la enfermedad de Alzheimer (EA), útiles como biomarcadores discriminantes de esta enfermedad, del deterioro cognitivo leve y de la neurodegeneración progresiva, frente a controles sanos. Los biomarcadores de EA son importantes para efectuar el diagnóstico precoz y lograr el consiguiente tratamiento adecuado, así como para el seguimiento de la terapia utilizada y de la progresión de la enfermedad. Los biomarcadores adecuados están relacionados con esta patología, como las placas seniles extraneuronales, los ovillos neurofibrilares intracelulares, la degeneración neuronal y axonal, la neuroinflamación y el estrés oxidativo. Se han agregado péptidos que están relacionados con la coagulación, la plasticidad cerebral y los sistemas de complemento y que, en conjunto, involucran a la unidad neurovascular. Se analizan las tecnologías de proteómica y peptidómica que muestran alta sensibilidad, especificidad y selectividad para la detección de los biomarcadores de EA, como la espectrometría de masa MALDI-TOF, chips de proteínas en la tecnología SELDI y chips de electrotransferencia para péptidos, permitiendo el análisis de

pequeños volúmenes de muestras (microlitros). La aplicación de la espectrometría de masa a muestras de sangre de pacientes con EA ha demostrado ser menos invasiva y suficientemente rápida para determinar el diagnóstico, estratificar la etapa de la enfermedad, establecer el pronóstico y evaluar el seguimiento de la respuesta terapéutica.

Palabras clave: *Enfermedad de Alzheimer; neuroproteómica; biomarcadores en sangre; espectrometría de masa; espectrometría de masa con chips.*

Abstract

The aim of this work is to highlight the relevance of mass spectrometry for the identification of peptides and proteins involved in Alzheimer's disease (AD), useful as discriminating biomarkers of this disease, mild cognitive impairment, and progressive neurodegeneration, compared with healthy controls. AD markers are crucial for early diagnosis and subsequent appropriate treatment, as well as for monitoring the progression of the disease and the therapy used. Suitable markers are related to this pathology, such as extraneuronal senile plaques; intracellular neurofibrillary tangles; neuronal and axonal degeneration; neuroinflammation; and oxidative stress. Peptides have been added that are related to coagulation, brain plasticity, and complement systems, which, together, involve the neurovascular unit. Proteomics and peptidomics technologies that show high sensitivity, specificity, and selectivity for the detection of AD biomarkers are analyzed, such as MALDI-TOF mass spectrometry, protein chips in SELDI technology, and electroblotting chips for peptides, allowing the analysis of small sample volumes (microliters). The application of mass spectrometry to blood samples from patients with AD has proven to be less invasive and fast enough to determine the diagnosis, stratify the stage of the disease, establish the prognosis, and evaluate the follow-up of the therapeutic response.

Keywords: *Alzheimer's disease; neuroproteomics; blood markers; mass spectrometry; chip mass spectrometry.*

1. Introducción

En este trabajo se aborda el desarrollo de diferentes biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer (EA), como parte de nuestras investigaciones en los procesos neurodegenerativos desarrollados tanto en las epilepsias refractarias, la esquizofrenia [1-6] como en la EA [7,8].

EA es una patología neurodegenerativa progresiva, que se caracteriza por el depósito *extracelular* en el cerebro de placas seniles compuestas por los péptidos β -amiloides mal plegados (también conocidos como amiloides- β ; $A\beta$). A este fenómeno se le suma, la hiperfosforilación y agregación intracerebral de proteínas tau (tau: *tubulin associated unit*) a nivel intraneuronal asociadas a microtúbulos axónicos [9] llamadas *ovillos*

neurofibrilares intracelulares, también conocida como “Tauopatía neurodegenerativa” [10,11]. Esta acumulación anormal de proteínas en el cerebro se acompaña de las siguientes anomalías en el sistema nervioso central (SNC): a) Neuroinflamación; b) degeneración neuronal y axonal; c) disfunción sináptica; d) respuesta inmunitaria sostenida; e) desregulación vascular; f) estrés oxidativo; g) alteración del metabolismo de la glucosa cerebral (energético); y h) atrofia, apoptosis y ferroptosis neuronal [12]. Por lo tanto, el volumen e integridad de la sustancia blanca cerebral se reduce progresivamente conforme con la evolución de EA [13,14].

En la actualidad, para poder iniciar un tratamiento que resulte efectivo en detener el deterioro progresivo, se utilizan los denominados biomarcadores rápidos y precisos presentes en los fluidos corporales (principalmente el plasma) para un diagnóstico precoz, capaz de anticiparse a las manifestaciones clínicas, y generar un pronóstico de evolución y/o progresión de la enfermedad, o permitir un seguimiento de la respuesta terapéutica.

El objetivo de la presente revisión es actualizar los conocimientos acerca de la aplicación de la espectrometría de masa en la búsqueda y desarrollo de los mencionados biomarcadores plasmáticos de EA.

2. Etapas de EA

La acumulación excesiva de proteínas A β mal plegadas y tau hiperfosforiladas conduce con el tiempo a la alteración de la citoarquitectura de las neuronas y su neurotoxicidad, con pérdida progresiva de las mismas y el consecuente deterioro fundamentalmente de las funciones cognitivas. La activación de la neuroinflamación, los déficits colinérgicos, el metabolismo cerebral alterado de la glucosa y la disfunción sináptica también son características destacadas de EA, lo que conduce a una neurodegeneración crónica, pérdida de la memoria de trabajo y, finalmente, demencia. Durante la última década, se ha demostrado la existencia de una respuesta inmunitaria sostenida en el cerebro con la activación persistente de la microglía (macrófagos residentes en el cerebro) e infiltrado de otras células inmunitarias, como linfocitos y neutrófilos polimorfonucleares (PMNs), la activación y ataque del sistema de complemento, todo lo cual agrava las patologías amiloide y tau [15,16]. Una variedad de mecanismos de señalización relacionados con la microglía y varias citoquinas también participan en esta patología. En consecuencia, EA se reconoce cada vez más como un trastorno altamente heterogéneo.

Las etapas de EA pueden resumirse así: (a) **Etapa asintomática preclínica**; (b) **etapa prodrómica caracterizada por deterioro cognitivo leve (DCL)** o DCL amnésico (DCL-a; también conocido como DCL tardío) que posteriormente se convertirá en EA; generalmente llamado **DCL debido a EA** para diferenciarlo de DCL estable (DCL-e), que no lo hará; (c) **etapa de EA típica**; (d) **etapa de EA con demencia (EAD)**.

La **etapa asintomática preclínica** de EA corresponde al comienzo de la misma, algunas décadas antes del inicio de los primeros síntomas. En esta etapa clínicamente silente, los análisis de imagen cerebral y los biomarcadores presentes en los fluidos corporales, ya indican algunas alteraciones patológicas cerebrales [17,18]. La neuroinflamación típica comienza en las primeras etapas, sin ningún síntoma clínico, y continúa hasta la etapa final de EA. Los procesos dinámicos y multicelulares de la neuroinflamación están mediados por las células no neuronales del SNC, como los astrocitos que son células gliales que pueden producir, procesar, degradar y propagar a las proteínas tau, lo que afecta la progresión de EA [17,18], y la microglía que son los macrófagos residentes en el SNC, responsables de la vulnerabilidad la región CA1 del hipocampo en AD [19].

En la **etapa prodrómica** hay síntomas de disfunción cerebral y un médico podrá diagnosticar la fisiopatología primaria subyacente. Aparecen síntomas leves de amnesia, propios del DCL-a que degenerarán en la típica EA.

Una vez que EA está completamente desarrollada, el depósito de A β y de proteínas tau hiperfosforiladas en el cerebro dificulta la neurotransmisión debido a la disfunción sináptica, la degeneración de neuritas y el proceso general de neurodegeneración, que continuará avanzando. Se desencadena la inmunoadactivación en el SNC por una variedad de factores fisiopatológicos, que incluyen fracciones de complemento, citoquinas, factores de crecimiento, especies reactivas de oxígeno (ROS), con participación de la microglía y los astrocitos [20]. La remodelación patológica de la astrogliosis modifica la señalización del calcio astrogliosis [Ca²⁺], que puede estar asociada con los mecanismos celulares de la patogénesis de EA [21].

Actualmente, se cree que EA es un “*proceso continuo*” desde la etapa preclínica asintomática hasta la etapa prodrómica con DCL y EA leve, pasando por la etapa clínica de EA típica y, finalmente, la etapa avanzada de demencia (EAD). Los pacientes con EA típica muestran alteraciones cognitivas marcadas, como pérdida de memoria y confusión, desorientación espacio-temporal, memoria operacional reducida y deterioro

del lenguaje. En la etapa más severa de la enfermedad aparecen marcados síntomas conductuales y psicológicos propios de la demencia, marcados signos de neurodegeneración, disfunción sináptica, desregulación vascular, neuroinflamación, estrés oxidativo y serias dificultades para las actividades cotidianas, siendo una pesada carga física y emocional para los familiares y cuidadores [22].

En realidad, los cambios patológicos ocurren décadas antes de las manifestaciones clínicas de EA. Se han identificado algunos factores de riesgo, como la edad, la depresión, el hipotiroidismo, las deficiencias vitamínicas, el consumo de alcohol, la exposición al aluminio y lesiones cerebrales traumáticas [23]. Por lo tanto, la detección y el tratamiento tempranos de EA son relevantes.

EA usualmente se divide en: (1) **EA de inicio temprano** (EOAD: *early-onset AD*) a partir de los 35 años hasta los 65 años, que representa sólo el 1-5% de todos los casos; y (2) **EA de inicio tardío** (LOAD: *late-onset AD*) en personas mayores de 65 años [24,25]. EOAD tiene un curso más agresivo [26]. Existen formas esporádicas y familiares. Las formas familiares de EOAD y LOAD se asocian frecuentemente con un patrón de herencia autosómico dominante [26]; generalmente mutaciones en los genes *APP*, *PSEN1* y *PSEN2*, que codifican las respectivas enzimas, como la proteína precursora de amiloide (*APP: amyloid precursor protein*) y las presenilinas 1 y 2 (*PSEN1* o *PSEN2*) [24,25]. Las formas esporádicas de EOAD y LOAD tienen una etiología compleja y se consideran formas poligénicas [24,27,28]. La mayoría de los casos son EOAD familiar y LOAD esporádica [25,29]. Una variedad de factores ambientales y genéticos contribuyen a la LOAD esporádica [29].

LOAD esporádica es multifacética, con varios factores ambientales y genéticos que contribuyen a la enfermedad [29]. LOAD es hereditaria (60-80%), y se han identificado más de 40 loci de riesgo de EA mediante grandes estudios de asociación del genoma completo (GWAS) [30].

En EA y otros trastornos con déficits cognitivos, se producen degeneraciones significativas de las células colinérgicas del prosencéfalo basal. Sin embargo, en las formas prodrómica y temprana, sólo se detectó disfunción colinérgica debido a desequilibrios en la expresión de NGF (*nerve growth factor*; factor de crecimiento nervioso), importante para el desarrollo y diferenciación de células neuronales y no neuronales, en los receptores de NGF altos y bajos, *trkA* y *p75NTR*, respectivamente, cambios en la liberación de acetilcolina, en la captación de colina de alta afinidad y

alteraciones en la expresión de los receptores muscarínicos y nicotínicos de acetilcolina [31].

Las evidencias muestran que el riesgo de deterioro cognitivo y de demencia en la vejez se modifica por el tratamiento de las comorbilidades, la selección del estilo de vida y otros factores ambientales. Finalmente, más años de educación formal, de actividad física y de compromiso social moderan el riesgo de demencia en la vejez y aseguran un envejecimiento cerebral saludable [25,29].

Los factores protectores se pueden definir como características genéticas [32] o ambientales [33] que reducen el riesgo de desarrollar EA clínica, incluso en la vejez. GWAS ha identificado más de 20 variantes genéticas comunes que modifican el riesgo de LOAD, incluido el gen *TREM2* (*triggering receptor expressed on myeloid cells-2*; receptor de activación expresado en células mieloides-2) [25,29]. *TREM2* es un receptor de superficie expresado en células microgliales (derivado del mesodermo embrionario, que da lugar a células sanguíneas y del sistema inmunitario) que desencadena el sistema de fosforilación de tirosina de proteínas intracelulares. GWAS recientes han demostrado que una rara mutación R47H de *TREM2* se correlaciona con un riesgo sustancialmente mayor de desarrollar EA [34].

Hay genes y variantes que pueden brindar protección contra EA, que están involucrados en el metabolismo de los lípidos, el tráfico celular, la función endosomal y lisosomal, la función sináptica y la inflamación [25].

Los factores genéticos protectores pueden surgir de asociaciones con fenotipos protectores conocidos, como la longevidad, la reserva cognitiva, el nivel educativo o la reserva cerebral [25,35]. La *reserva cognitiva* es la adaptabilidad distintiva de los procesos cognitivos al envejecimiento, lesión cerebral o patología [36]. En cambio, la *reserva cerebral* es el llamado capital neurobiológico que lleva a afrontar mejor el envejecimiento y la patología cerebral antes de que aparezcan los cambios cognitivos [36].

La *resiliencia* a EA, también conocida como EA asintomática o preclínica, es comúnmente observada en las personas con los hallazgos neuropatológicos típicos de esta enfermedad, pero sin el desarrollo aún del deterioro cognitivo [37].

3. Apolipoproteína E (ApoE) y genotipos de EA

La ApoE humana es una glicoproteína de 34 kDa, que desempeña un papel principal en el metabolismo de las lipoproteínas y está relacionada con la patología

cardiovascular, las enfermedades neurodegenerativas, el infarto cerebral, la obesidad y la longevidad [38,39].

ApoE tiene un rol clave en el mantenimiento de la homeostasis de los lípidos en el SNC [40] y, por lo tanto, es importante en la conservación de la plasticidad sináptica, la transducción de señales y la inmunomodulación.

Las isoformas de *ApoE* controlan diferencialmente la agregación y eliminación de A β en el cerebro y tienen distintas funciones en la regulación del transporte de lípidos cerebrales, el metabolismo de la glucosa, la señalización neuronal, la neuroinflamación y la función mitocondrial [40,41].

Hay tres isoformas de *ApoE*, denominadas $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$, o alternativamente *APOE2*, *APOE3* y *APOE4* [29,39]. La isoforma $\epsilon 3$ más común tiene una cisteína en la posición 112 (Cys112) y un residuo de arginina en la posición 158 (Arg158), mientras que la isoforma $\epsilon 2$ tiene dos residuos de cisteína (Cys112 y Cys158) y la isoforma $\epsilon 4$ tiene dos residuos de arginina (Arg112 y Arg158). De esto, resultan tres genotipos homocigotas (*APOE2/E2*, *APOE3/E3* y *APOE4/E4*) y otros tres heterocigotas (*APOE2/E3*, *APOE2/E4* y *APOE3/E4*) que se obtienen mediante la combinación de los alelos $\epsilon 2$ (8,4% de frecuencia alélica estimada en la población), $\epsilon 3$ (77,9%) y $\epsilon 4$ (13,7%) [29,39]. Cabe aclarar que existen otras variantes (haplotipos) en los tres alelos que están relacionadas a la longevidad, así como al desarrollo de EA, o de diversas patologías cardiovasculares [39,42].

Las tres isoformas de la proteína ApoE tienen diferentes estructuras y las consiguientes variaciones en su afinidad para unirse al receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDL), así como un papel fisiológico diferente en EA [40].

El alelo *APOE4* indica un alto riesgo de contraer EA [7,28,29] hasta 4 veces (un alelo) a 15 veces (dos alelos), lo que afecta aún más a otros trastornos neurológicos y contribuye a una menor longevidad [39,41]. El alelo *APOE4* contribuye al riesgo de EA mediante diversos mecanismos, como el aumento de la agregación y la disminución de la eliminación de los polipéptidos A β lo que aumenta aún más la fosforilación de tau, la disminución del metabolismo de la glucosa, la función vascular y mitocondrial y las diferencias en el neurodesarrollo [29, 40]. *APOE4* también está asociado con un mayor riesgo de angiopatía amiloide cerebral y de deterioro cognitivo relacionado con la edad en el envejecimiento normal.

4. Biomarcadores de EA

Desde 1906, cuando el psiquiatra alemán Alois Alzheimer describió un caso de la “demencia presenil”, proceso patológico de la corteza cerebral, que actualmente lleva su nombre, así como las placas y ovillos, se han desarrollado fármacos y biomarcadores para EA teniendo en cuenta los péptidos, las proteínas y los sistemas que participan en esta enfermedad neurodegenerativa [43,44-62].

Desafortunadamente, el diagnóstico definitivo generalmente se realiza en las últimas etapas de la enfermedad sobre la base de signos y síntomas clínicos bien establecidos. Por lo tanto, los biomarcadores son valiosos para evaluar el riesgo de la enfermedad, para distinguir las diferentes etapas y son herramientas útiles para el diagnóstico, el pronóstico, el seguimiento de la progresión de la enfermedad y el control del tratamiento. La terapia con medicamentos sólo puede ser efectiva si la neurodegeneración no ha evolucionado demasiado, de ahí la relevancia de los biomarcadores que pueden detectar EA en la etapa de predemencia.

Se han buscado biomarcadores en fluidos corporales, como líquido cefalorraquídeo (LCR) y sangre, pero también en orina, saliva y lágrimas, así como en el cerebro utilizando técnicas clásicas y no convencionales [7,8].

5. USO DE LA ESPECTROMETRIA DE MASA EN AD

5.1. Estudios proteómicos mediante espectrometría de masa. La espectrometría de masa (EM), junto con varios métodos de separación seleccionados, es la metodología principal para la proteómica y la proteogenómica [63]. El espectrómetro de masa para Proteómica crea iones a

partir de proteínas o péptidos principalmente mediante dos técnicas: MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*; desorción/ionización con láser asistida por matriz) o ESI (*ElectroSpray Ionization*; ionización por electrospray o electropulverización) (**Fig. 1**), separándolos mediante analizadores de masa, como TOF (*Time-Of-Flight*), y los detecta, obteniendo un espectro de masa que luego puede ser analizado en una base de datos. Hay varias configuraciones de equipos, incluido el espectrómetro de masa de triple cuadrupolo (QQQ), MALDI-TOF, MALDI-QQTOF y QQTOF.

MALDI es el método de ionización más adecuado para TOF-EM, utilizando una muestra sólida en una matriz con alto voltaje y vacío. En cambio, ESI utiliza un flujo de líquido proveniente de un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC:

high-performance liquid chromatography) o bien de electroforesis capilar (EC) y es adecuado para cuadrupolos y/o trampas de iones [64] (Fig. 1).

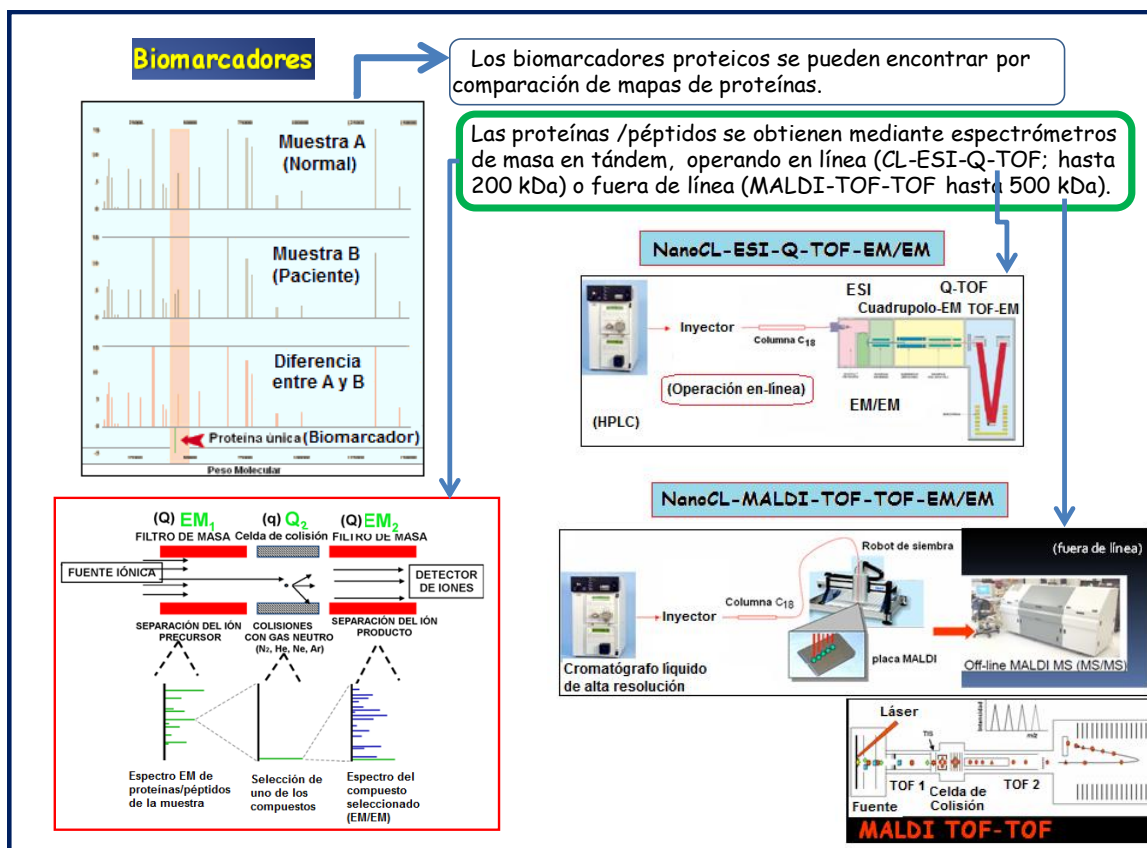


Figura 1: Concepto de biomarcador proteico. Análisis por espectrometría de masa en tándem (EM/EM) con operación en línea (CL-ESI-Q-TOF; hasta 200 kDa) y fuera de línea MALDI-TOF-TOF; hasta 500 kDa).

El analizador de masa TOF separa iones por relación masa a carga (m/z) en un tubo de vuelo de alto vacío en la región de deriva, después de ser acelerado. Los iones más ligeros se aceleran más rápido y llegan primero al detector, por lo que al medir el tiempo de vuelo, también se calcula la masa de iones. El reflectrón se utiliza para aumentar la distancia de vuelo y mejorar la resolución.

Una mezcla compleja de proteínas puede digerirse primero con tripsina para producir péptidos y luego separarlos y analizarlos en línea (*on line*) mediante cromatografía líquida (CL)-electrospray-espectrometría de masa en tándem (EM/EM) (CL-ESI-EM/EM). La separación se puede realizar también mediante técnicas de electroforesis o Western blotting (WB), en lugar de CL, cada proteína se obtiene del gel y se realiza su digestión enzimática con tripsina. En todos los casos los péptidos obtenidos se analizan mediante el primer analizador de masa o EM1, dando lugar a un conjunto de líneas, que se denominan huellas dactilares de masa peptídica (PMF: *peptide mass fingerprinting*),

cada una de las cuales representa un péptido. El siguiente paso en EM/EM proporciona el espectro de masa de cada péptido seleccionado en el segundo analizador de masa o EM2. A partir de los valores de relación masa a carga (m/z) del espectro de masa del péptido, se obtiene la secuencia de aminoácidos del péptido (**Fig. 2**).

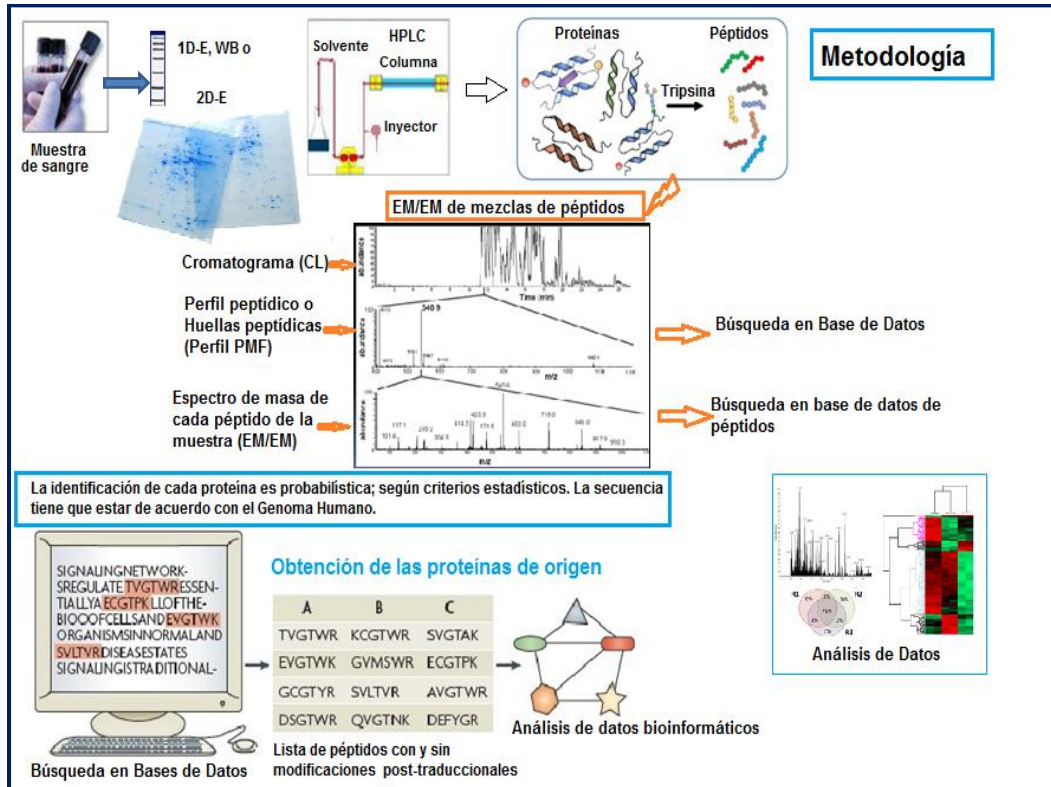


Figura 2: Metodología utilizada para la obtención de las huellas peptídicas y análisis de datos.

Los péptidos y la proteína original son identificados por las bases de datos existentes actualmente. Algunas de éstas basadas en el genoma humano, más conocidas son: ProFound, MOWSE, PeptideSearch, Mascot, Peptident, entre otras. Generalmente el espectrómetro de masa que se utiliza posee una base de datos incorporada.

La identificación es probabilística dada la complejidad del estudio. Es decir que la proteína madre se identifica por comparación de los espectros de masa de péptidos con los de las bases de datos proteómicos, que sólo incluyen proteínas del genoma humano (**Fig. 2**).

El PMF se puede obtener en línea (*on line*) con un instrumento CL-ESI-EM/EM o bien, fuera de línea (*off line*) utilizando espectrómetros de masa MALDI-TOF con cualquiera de las configuraciones ya mencionadas (**Fig. 1**).

Para un análisis de alto rendimiento (*high-throughput analysis*), los datos de fragmentación se pueden usar para determinar un tramo corto de una secuencia de aminoácidos (una etiqueta de secuencia: a *sequence tag*), que se puede usar para buscar

en una base de datos. Un enfoque más conveniente es el método de proteómica de escopeta (*shotgun proteomics*) o no interpretado [65], en el que los espectros de iones producto se comparan con bases de datos mediante análisis de correlación cruzada para identificar la proteína intacta (**Fig. 2**).

La proteómica también puede ser cuantitativa, ya sea no etiquetada o etiquetada. El etiquetado incluye sondas fluorescentes; marcado metabólico (marcado de cultivos celulares *in vivo*) tal como SILAC (*stable isotope labeling amino acids in cell culture*; marcado de aminoácidos con isótopos estables, en cultivo celular); péptidos marcados con isótopos tales como SRM (*selective reaction monitoring*; seguimiento selectivo de reacciones) y MRM (*multiple reaction monitoring*; seguimiento de reacciones múltiples); etiquetas isotópicas comerciales como ICAT (*isotope-coded affinity tag*; etiqueta de afinidad codificada por isótopos); etiquetas isobáricas como iTRAQ (*isobaric tags for relative and absolute quantitation*; etiquetas isobáricas para cuantificación relativa y absoluta); y TMT (*tandem mass tags*; etiquetas de masa en tándem) [64].

5.2. Electroforesis en gel bidimensional (2-DE) para proteómica. 2-DE con enfoque isoeléctrico (IEF) en una dimensión y electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) en la segunda dimensión, se usa a menudo en proteómica, por ejemplo, para obtener el perfil de proteínas plasmáticas de EA humana en comparación con los controles. Posteriormente, las manchas se analizan mediante un protocolo de análisis de imágenes con un software específico y mediante CL-EM/EM.

5.3. Electroforesis bidimensional en gel de diferencia (2D-DIGE) en neuroproteómica. 2D-DIGE se caracteriza por marcar claramente cada muestra de proteína mediante la unión covalente a tintes fluorescentes, como Cy2, Cy3 y Cy5, luego las muestras marcadas se mezclan y se procesan en el mismo gel. Posteriormente, el gel se escanea utilizando longitudes de onda láser compatibles con los marcadores fluorescentes utilizados. Por lo tanto, todos los geles se digitalizan con el escáner de fluorescencia, dando imágenes para cada fluorocromo; cada uno se analiza estadísticamente utilizando el software DeCyder. La visualización de imágenes digitalizadas y los análisis estadísticos se aplican para evaluar las variaciones entre las muestras de EA y los controles, donde las muestras de plasma se analizan mediante 2D-DIGE combinado con MALDI-TOF-TOF-EM/EM para obtener biomarcadores de EA.

5.4. Electroforesis capilar - Espectrometría de masa en tándem (EC-EM/EM).

EC-EM/EM se utiliza para obtener rápidamente perfiles de proteínas [66]. La electroforesis capilar de zona es el modo electroforético seleccionado para la neuroproteómica.

5.5. EM con Chips

5.5.1. Chips para proteínas (tecnología *Proteinchip Array*). La muestra mezclada con la matriz MALDI (normalmente ácido α -ciano-4-hidroxicinámico o derivado) se aplica sobre el ProteinChip, donde se procesa según el tipo de superficie, y la detección se realiza mediante Desorción/Ionización con Láser Mejorada por Superficie (SELDI: *Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization*)-TOF-EM/EM (**Fig. 3**). Las superficies de cada chip (alrededor de $100 \mu\text{m}^2 = 0,0001 \text{ mm}^2$ a 1 mm^2 de superficie) pueden ser de naturaleza química para estudiar perfiles de expresión de proteínas (fase hidrofóbica, aniónica, catiónica, metabólica iónica o fase normal) o de naturaleza bioquímica para ensayos de interacción de proteínas (anticuerpo- antígeno, receptor-ligando, ADN-proteína) [67, 68]. Después de la irradiación láser, los iones ingresan al espectrómetro de masa. Este es un análisis cuantitativo multiplex. Habitualmente se montan varios chips sobre una tira que se adhiere a la entrada del espectrómetro de masa, en contacto directo con el triple cuadrupolo, incluyendo uno o dos analizadores TOF según la configuración del equipo.

La técnica basada en inmunoprecipitación (IP)-EM/EM se ha utilizado ampliamente para biomarcadores de EA en LCR y sangre, en particular para estudiar la patología sináptica y amiloide cerebral de EA. En estos casos, el paso de IP se puede reemplazar con chips de afinidad, que requieren cantidades muy bajas de muestra y se pueden usar como un paso integrado con EM/EM en línea.

La proteómica tiene aplicaciones en diferentes patologías. Se estudian los proteomas de diferentes muestras y tejidos para patologías particulares, por ejemplo, el Proyecto del Proteoma del Cerebro Humano (HBPP: *Human Brain Proteome Project*) incluido en la Organización del Proteoma Humano (HUPO: *Human Proteome Organisation*) [69] y el proteoma del LCR para enfermedades neurodegenerativas.

5.5.2. Blotchips para péptidos. Esta técnica de peptidómica utiliza una cantidad mínima de suero (1,5 μL de suero) estudiado por SDS-PAGE con un gradiente de 4-12

% para separar péptidos de proteínas, seguido de electrotransferencia en un chip, llamado blotchip, y finalmente, MALDI-TOF/TOF-EM/EM, evitando el paso de desproteización, obteniendo así los péptidos séricos totales, tanto los péptidos libres como los ligados a proteínas [70], que se perdían en la etapa de desproteización de la técnica tradicional (**Fig. 3**). La matriz que generalmente se aplica en el blotchip es el ácido α -ciano-4-hidroxicinámico que se mezcla con la muestra. El análisis estadístico de los datos espectrales se lleva a cabo con el software del espectrómetro de masa utilizado (por ejemplo, ClinProTools). También se utilizan otros softwares para la comparación entre grupos.

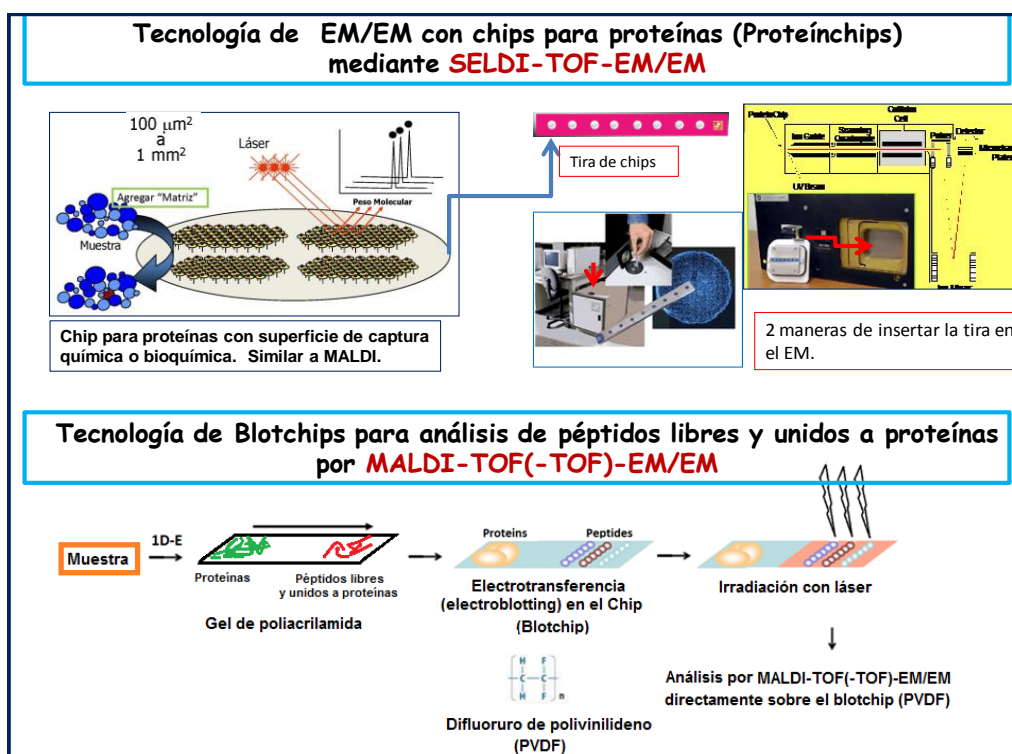


Figura 3: Tecnología de espectrometría de masa con uso de chips. Proteínchips para análisis de proteínas mediante SELDI-TOF-EM/EM y Blotchips para el análisis de péptidos, libres y combinados con proteínas, mediante MALDI-TOF(-TOF)-EM/EM.

6. BIOMARCADORES RECONOCIDOS POR ORGANISMOS INTERNACIONALES

6.1 Biomarcadores del Líquido Ceforraquídeo (LCR)

El LCR se considera la mejor fuente de biomarcadores de EA ya que está en estrecho contacto con el espacio extracelular del cerebro, por lo que se observan los cambios bioquímicos cerebrales. Sin embargo, el LCR como herramienta diagnóstica implica una punción lumbar invasiva que, aunque suele ser segura, puede provocar efectos

adversos, como dolor de espalda (leve) o hernia cerebral (grave). El diseño atraumático de la punta de la aguja reduce las complicaciones de la punción lumbar [71].

Desde la década de los noventa, se han realizado muchos estudios sobre las proteínas A β y tau del LCR para utilizarlas como biomarcadores, desde la fase de descubrimiento hasta la fase de validación [44,47,51,54]. Los biomarcadores del LCR tienen utilidad clínica como criterios de diagnóstico y en el diagnóstico diferencial de EA con envejecimiento normal, depresión, demencia alcohólica y enfermedad de Parkinson (EP), así como en la identificación de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ) en casos con demencia rápidamente progresiva [43,47,72].

Se han obtenido biomarcadores bien establecidos del LCR y actualmente se usan en entornos clínicos para la detección temprana y el pronóstico de EA y para el seguimiento del tratamiento. El diagnóstico precoz es importante para iniciar un tratamiento sintomático con fármacos destinados a ralentizar o detener el proceso degenerativo.

La Iniciativa de neuroimagen de EA (ADNI, por sus siglas en inglés *Alzheimer's Disease Neuroimage Initiative*), creada en 2004, tiene como objetivo validar biomarcadores de imágenes y sangre/LCR para ensayos clínicos de EA para el desarrollo de fármacos para EA [73]. Más recientemente, Argentina-ADNI también se lanzó a integrar biomarcadores clínicos, de imágenes, genéticos y de fluidos corporales desde el envejecimiento normal hasta el deterioro cognitivo leve y la demencia [74]. La Asociación de Alzheimer formó *Worldwide ADNI* (WW-ADNI) para la colaboración y cooperación internacional sobre el tema, incluidos proyectos de América del Norte, Europa, Japón, Australia, Corea y Argentina [75].

6.2 Biomarcadores del cerebro por técnicas de imagen

La tomografía por emisión de positrones (PET: *Positron emission tomography*), la tomografía computada por emisión de fotón único (SPECT: *Single photon emission computed tomography*), la resonancia magnética de imágenes (MRI: *magnetic resonance imaging*) y la tomografía computarizada (CT: *computed tomography*) se utilizan como técnicas de imagen para la medición *in vivo* de los cambios cerebrales patológicos de EA [76]. Además, la imagen del tensor de difusión (DTI: *diffusion tensor imaging*) es una técnica de neuroimagen de MRI que mide la difusión de las moléculas de agua en el tejido cerebral [13].

PET y SPECT utilizan diferentes tipos de radiotrazadores. Los radiotrazadores PET producen positrones por descomposición, mientras que las exploraciones SPECT miden los rayos *gamma*. SPECT se utiliza para evaluar el flujo sanguíneo cerebral, mientras que PET para evaluar las proteínas A β y tau. Un ligando PET A β selectivo es el compuesto B de Pittsburgh marcado con ^{11}C , [^{11}C]PiB, que revela la carga de amiloides en los cerebros vivos. Se conoce una gran variedad de radiotrazadores PET utilizados para EA [7].

Los estudios de neuroimagen ayudan a discriminar EA y DCL, según la siguiente categorización: a) Fluorodesoxiglucosa marcada con ^{18}F para PET, también conocida como [^{18}F]FDG-PET, para la alta tasa metabólica de glucosa cerebral detectada en estos pacientes, aún en etapas tempranas de la enfermedad, y que podría mejorarse con la administración de Cannabidiol (CBD) [77]. b) A β -PET para la carga de amiloides. c) Resonancia magnética de imagen (MRI) estructural para medir la densidad del tejido, la superficie cortical y el hipocampo. d) MRI funcional para la coherencia funcional de diferentes regiones del cerebro y la fuerza de la conectividad funcional. e) Imagen del tensor de difusión (DTI: *diffusion tensor imaging*) para los patrones a lo largo de las fibras de la materia blanca. De esta manera, se aseguran el diagnóstico individualizado de EA y la predicción de la progresión clínica [76,78].

6.3 Biomarcadores reconocidos a nivel mundial

Tanto los biomarcadores A β y tau del LCR, como el compuesto [^{11}C]PiB, utilizado para revelar la carga de amiloide cerebral mediante PET, han sido reconocidos por entidades internacionales, como la Clasificación Internacional de Enfermedades (ICD 10: *International Classification of Diseases*) de la OMS, el Instituto Nacional sobre el Envejecimiento y la Asociación de Alzheimer (NIA-AA: *National Institute on Aging and Alzheimer's Association*), enfermedad de Alzheimer y la Asociación de Trastornos Relacionados (ADRDA: *Alzheimer's Disease and Related Disorders Association*), el Instituto Nacional de Trastornos Neurológicos y Comunicativos y Accidentes Cerebrovasculares (NINCDS: *National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke*) y la Asociación Estadounidense de Psiquiatría (APA: *American Psychiatric Association*). Los biomarcadores de LCR y PET también se han incluido en las recomendaciones diagnósticas que Instituto Nacional sobre el Envejecimiento y la Asociación de Alzheimer (NIA-AA) propuso en 2011 para las etapas preclínica, prodrómica (DCL) y EAD, que se han actualizado recientemente [22]. Los parámetros

diagnósticos clínicos y neuropsicológicos de EA han sido proporcionados por las guías sobre EA de estas organizaciones, así como por el Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales-5 (DSM-5: *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders-5*) y las actualizaciones de APA [44,79,80].

NIA-AA describe un sistema A/T/N para categorizar a los biomarcadores de EA (de imágenes y de biofluidos) según el proceso patológico que mide cada uno. "A" representa los biomarcadores de la patología A β (A β 42 en LCR o amiloides por PET), "T" para biomarcadores tau (P-tau en LCR, o tau por PET) y "N" para biomarcadores de neurodegeneración o lesión neuronal (T-tau en LCR, [¹⁸F]FDG-PET o resonancia magnética estructural de imágenes) [22,29,81]. Se han informado resultados de investigaciones basadas en el sistema de clasificación A/T/N, como el seguimiento durante 60 meses de casos en el marco de la Iniciativa Argentina de Neuroimagen de la Enfermedad de Alzheimer (Arg-ADNI: *Argentina-Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative*) [82]. El sistema A/T/N es flexible ya que se pueden agregar nuevos biomarcadores [22,81].

Este sistema A/T/N se ha expandido al sistema A/T/X/N, donde X representa biomarcadores novedosos para algunos mecanismos subyacentes de EA, incluida la disfunción sináptica, el daño a la barrera hematoencefálica (BHE) y la desregulación del sistema neuroinmune [83].

Queda claro, actualmente, que EA se puede diagnosticar de manera confiable y con alta certeza al considerar los criterios clínicos, junto con la evaluación neuropsicológica, las neuroimágenes principalmente basadas en PET y los ensayos de laboratorio, como biomarcadores en sangre y LCR y la historia clínica del paciente.

7. BIOMARCADORES PLASMÁTICOS

Los sistemas de salud utilizan actualmente las imágenes de PET y los biomarcadores del LCR para el diagnóstico de EA en pacientes con trastornos cognitivos o de memoria. Sin embargo, estas técnicas son costosas e invasivas, especialmente la punción lumbar requerida para el LCR.

Por lo tanto, la investigación se ha dedicado a obtener biomarcadores en sangre para mejorar el proceso de diagnóstico de EA, agrupar pacientes para incluirlos en ensayos clínicos y monitorear la terapia con medicamentos. La falta de un diagnóstico preciso y oportuno ha contribuido a una tasa de fallas de detección de hasta el 80 % en los

ensayos clínicos de EA y ha impedido el desarrollo de tratamientos modificadores de esta enfermedad.

Los primeros desarrollos de biomarcadores plasmáticos se centraron en la búsqueda de proteínas amiloides y tau, de manera similar a lo realizado en LCR. En plasma, la disminución de la proporción A β 42/A β 40 está asociada a depósitos cerebrales de amiloides (amiloidosis) y concuerda con los resultados de PET. En cambio, T-tau y P-tau aumentan en la sangre de pacientes con EA.

Pero las investigaciones se extendieron a otros biomarcadores en sangre. Actualmente se conocen biomarcadores plasmáticos que reflejan: a) Los depósitos de amiloides, como A β 42 y la relación A β 42/A β 40 [84-86]; b) la patología tau, como P-tau, T-tau, GSK-3 β (glucógeno sintasa quinasa 3beta) y DYRK1A (quinasa regulada por fosforilación de tirosina (Y) de doble especificidad 1A) [86-90]; c) la neurodegeneración, como T-tau, NfL, VILIP-1 y hFABP [86,89,91-93]; d) la disfunción sináptica, como neurogranina, SNAP-25, sinaptotagmina, BACE1 y TDP-43 [93]; e) la apoptosis, como clusterina [94]; y f) la activación glial, como YKL-40, MCP-1 y GFAP [53]. También se han determinado proteínas expresadas diferencialmente en EA [95-97], así como aminoácidos, carnitinas y lípidos [98,99].

En 2006 se realizó el primer estudio de casos y controles basado en electroforesis bidimensional en gel (2D-E) combinada con espectrometría de masa (EM) en la búsqueda de biomarcadores proteicos de EA en sangre periférica [95]. El análisis por EM condujo a un **panel de 15 proteínas** que se expresaron diferencialmente en EA, incluido el factor H del complemento (CFH) y la macroglobulina α_2 (α_2 M) [95]. Tras la validación mediante inmunotransferencia semicuantitativa, el aumento tanto de CFH como de α_2 M en pacientes con EA demostró que estas proteínas sanguíneas son biomarcadores específicos de la enfermedad y están asociadas con la gravedad de la misma. CFH y α_2 M también se asocian de forma significativamente positiva con la proporción de N-acetilaspártato/mioinositol del hipocampo (NAA/mI), que es una medida del deterioro cognitivo en EA temprana [100]. Por lo tanto, **CFH y α_2 M reflejan la progresión temprana de EA** [100]. Además, algunas fracciones del complemento se han relacionado con la progresión de EA [101,102].

Sobre la base de un análisis multivariante de **18 proteínas inflamatorias y de señalización plasmáticas**, se pudieron clasificar muestras de sangre como provenientes de pacientes con EA con una precisión de casi el 90 %, lo que permitió distinguir aún

más a los pacientes con DCL que progresarían a EA [96]. Estas proteínas de señalización permitieron identificar un fenotipo de biomarcador de esta enfermedad, que se puede utilizar para el diagnóstico de EA temprana. Estas 18 proteínas se identificaron como: Angiopoyetina-2 (ANG-2); quimioquinas de tipo C-C (CCL), tales como CCL5, CCL7, CCL15 y CCL18; quimioquina tipo C-X-C (CXCL8; también conocida como IL-8); factor de crecimiento epidérmico (EGF); G-CSF; factor neurotrófico derivado de glía (GDNF); molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1); proteína 6 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina (IGFBP-6); interleuquinas (IL) tales como IL-1 β , IL-3 e IL-11; factor estimulante de colonias de monocitos (M-CSF); factor de crecimiento derivado de plaquetas-BB (PDGF-BB); TNF- α ; receptor-4 del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL-R4). Estas proteínas de señalización en el plasma sanguíneo se refieren a la desregulación de la hematopoyesis, las respuestas inmunitarias, la apoptosis y el apoyo neuronal en EA preclínica debido a cambios en la periferia, el SNC o ambos que ocurren al inicio de la enfermedad [96,103]. La disfunción de las vías apoptóticas también se ha asociado con EA. Los análisis demostraron deficiencias en la neuroprotección, la actividad neurotrófica, la fagocitosis y la homeostasis energética en EA [96].

La disminución en el volumen de materia blanca debido a la degeneración de la mielina y la pérdida de axones en los tractos de fibras neurales del cerebro con EA se ha demostrado utilizando la técnica de imagen DTI [13]. Las proteínas de acumulación e inflamación de A β juegan un rol importante en la descomposición de la microestructura de la sustancia blanca en las primeras etapas de EA.

Las **citoquinas y quimioquinas**, como mediadores sanguíneos de la inflamación, pueden utilizarse como biomarcadores para el diagnóstico precoz de EA. Entre las citoquinas que median la respuesta inmunitaria en el cerebro de los pacientes, las interleuquinas (IL-1, IL-4, IL-6 e IL-10), la citoquina I-309, el interferón- γ y TNF- α desempeñan roles importantes [53]. La citoquina humana I-309, también conocida como CC1, es una pequeña glicoproteína secretada por las células T activadas que se considera un buen predictor de la conversión del DCL a EA. Las **flotilinas** se han utilizado ampliamente como biomarcadores de balsas lipídicas y exosomas durante muchos años. La disminución de la flotilina sérica es un biomarcador de depósito amiloide cerebral alto y diagnóstico temprano de EA [49]. Muy recientemente, la expresión de **microARN-128** (miR-128) aumentó significativamente en muestras de

suelo de pacientes con EA en comparación con los controles, demostrando tener valor diagnóstico para esta enfermedad [104].

7.1. Análisis de detección de EA en sangre y anticuerpos aprobados para tratamientos

Se conocen los primeros **inmunoensayos Elecsys[®]**, totalmente automatizados, que se diseñaron para medir tau (Elecsys Phospho-Tau (181P) CSF y Elecsys Total-Tau CSF, Roche Diagnostics) y A β (Elecsys β -Amyloid(1-42) CSF II, Roche Diagnostics) en LCR humano, para poder predecir con precisión el estado de A β cerebral [85], de acuerdo con PET amiloide [105] como se demostrara en cohortes de entrenamiento y validación. Estos ensayos brindan precisión diagnóstica y permiten identificar oportunamente a los pacientes con DCL en riesgo de evolucionar a EA [85,106,107]. Roche también ha desarrollado satisfactoriamente un fármaco para contrarrestar EA temprana o prodrómica: Gantenerumab, que es un anticuerpo anti-A β de administración subcutánea, que recibió la designación de *terapia innovadora* por parte de la Administración de Alimentos y Medicamentos de EE.UU. (FDA: *Food and Drug Administration*). Gantenerumab disminuyó sustancialmente la placa amiloide cerebral, una característica patológica de EA según los datos recolectados en los ensayos de extensión abiertos SCarlet RoAD y Marguerite RoAD, así como en otros estudios [108]. Se realizó un estudio de grupos paralelos, multicéntrico, aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo para evaluar el efecto de Gantenerumab sobre la cognición y el funcionamiento y la seguridad y la farmacocinética en participantes con EA prodrómica [109]. Los participantes se sometieron a una tomografía por emisión de positrones (PET) para evaluar el amiloide cerebral [110]. Anteriormente, en junio de 2021 la FDA aprobó Aduhelm (Aducanumab) desarrollado por Biogen de Cambridge, Massachusetts, para el tratamiento de EA, con controversias en el ambiente científico [111].

En 2019, la FDA de EE. UU. consideró “estado de ensayo innovador” a las pruebas en sangre de EA en desarrollo en diferentes compañías comerciales [112]. Una de estas empresas, en 2021, logró **el primer ensayo en sangre para la detección de EA, que se conoce comercialmente como PrecivityAD[™]**, que se basa en la cuantificación de alta precisión por EM/EM de la relación A β 42/A β 40 en plasma, la caracterización del perfil de proteotipo ApoE [41] del paciente (factor de riesgo de EA) [113] y la puntuación de probabilidad de amiloide (APS: *amyloid probability score*). APS representa la

probabilidad estimada de 0 (baja) a 100 (alta) de que el paciente sea A β positivo en estudios PET. Los puntajes APS del algoritmo patentado incluyen: APS bajo, 0-35 (consistente con PET negativo de amiloides; baja probabilidad de placas de amiloides; otras causas además de EA de síntomas cognitivos); APS intermedio, 36-57 (no distingue entre presencia o ausencia de placas amiloides); APS elevado, 58-100 (alta probabilidad de placas amiloides; compatible con PET positivo de amiloides y diagnóstico de EA en pacientes con DCL; por sí solo es insuficiente para un diagnóstico definitivo: se requieren signos clínicos y otros análisis, junto con APS). La evaluación diagnóstica adicional de pacientes con puntajes intermedios permitirá explicar el origen de los síntomas cognitivos [114].

La metodología utilizada es una plataforma EM patentada, basada en la preparación de muestras, la separación por CL y la cuantificación patentada por EM [(SISAQ: *Stable Isotope Spike Absolute Quantitation*; cuantificación absoluta de picos de isótopos estables)]. Cantidades conocidas de proteínas A β 40 y A β 42 marcadas con isótopos estables actúan como estándares internos. Las concentraciones de A β 40 y A β 42 (pg/mL) se obtuvieron mediante IP-CL-EM/EM [114]. Este análisis de sangre se validó por completo y resultó ser un ensayo clínico exacto, reproducible y preciso, adecuado para ensayos clínicos y pruebas de diagnóstico [62]. Está actualmente disponible en 48 estados de EE. UU. a través de una orden médica.

Este análisis de sangre permite un diagnóstico precoz de EA, para poder hacer un tratamiento temprano adecuado [114]. También es útil para la preselección de candidatos para ensayos clínicos con mayor probabilidad de tener amiloidosis cerebral, lo que reduce la tasa de fallas en la detección, el tiempo y los costos en el desarrollo de medicamentos efectivos para EA. La aprobación de la FDA se produjo junto con el lanzamiento de un ensayo clínico, conocido como PARIS Study (*Plasma Test for Amyloid Risk Screening*) para evaluar y validar el rendimiento diagnóstico de este análisis de sangre [115].

La empresa que comercializa esta prueba también está desarrollando otros biomarcadores, como anticuerpos anti-tau para el tratamiento de EA, y está realizando ensayos clínicos con candidatos a fármacos para EA.

Recientemente, se ha analizado el rápido progreso que conduce a ensayos en sangre precisos para EA [116], la cual ha sido reconsiderada por el marco de investigación NIA-AA como una entidad biológica totalmente definida por biomarcadores de

amiloides, tau y neurodegeneración, independientemente de los síntomas clínicos o el deterioro funcional [116].

7.2. Desarrollos recientes de biomarcadores plasmáticos de EA

La búsqueda de biomarcadores de EA en sangre se ha enfocado en los últimos años, a la determinación de proteínas y péptidos.

1) Búsqueda de biomarcadores plasmáticos proteómicos utilizando EM con chips:

Se han buscado **paneles de proteínas** que reflejen la neuroinflamación, la alteración de la respuesta inmunitaria, el estrés oxidativo y las anomalías en la conectividad y funcionalidad neuronal, junto con otras vías dañadas. Estos biomarcadores de EA también han aclarado algunos mecanismos subyacentes involucrados en esta enfermedad de múltiples etapas.

Se logró el perfil proteico en sangre para el diagnóstico precoz de pacientes con EA leve tal y como establece la escala *Functional Assessment Staging* (FAST), destacándose los niveles alterados de expresión de **cinco proteínas en plasma** [117]: La apolipoproteína A-1 (ApoA-1), la glicoproteína α_2 -HS (AHSG) y la afamina que estaban subreguladas en los pacientes, mientras que la apolipoproteína A-4 (ApoA-4) y la cadena *gamma* del fibrinógeno (FGG) estaban sobre-reguladas en los pacientes con EA leve en comparación con los controles. Las muestras de plasma se analizaron mediante 2D-DIGE combinado con MALDI-TOF-TOF-EM [117]. Por lo tanto, **estas cinco proteínas se proponen como biomarcadores plasmáticos candidatos para el diagnóstico temprano de EA.**

SELDI-MALDI-TOF-(-TOF) se utilizó en la búsqueda de un kit de biomarcadores de EA para su uso en la práctica clínica. Actualmente, **nueve proteínas plasmáticas** se establecieron como miembros de un panel de biomarcadores de EA después de la integración de investigaciones del Reino Unido, Alemania y EE. UU. [95,100,118,119]. Este panel de biomarcadores plasmáticos corresponde a: α_2 M; ApoE; *alfa*-clusterina (ApoJ); *beta*-clusterina; proteína amiloide sérica (SAP); complemento C3; factor H del complemento (CFH); *gamma*-fibrinógeno (FGG); gelsolina.

2) **Determinación de biomarcadores plasmáticos de EA correspondientes a grupos separados distintivos de proteínas periféricas relacionadas con sistemas y funciones alterados debido a la enfermedad:** Se incluyen citoquinas/quimioquinas, proteínas relacionadas con la inflamación, proteínas de señalización, reguladores de apoptosis, proteínas activas contra la neurodegeneración, reguladores de hematopoyesis y factores de coagulación. Ejemplos de estos biomarcadores son los factores inflamatorios sanguíneos, como IL-1 β , TGF- β y CRP, que se han asociado muy recientemente con la función cognitiva en EA y el DCL-a [120]. En un estudio de 79 pacientes (EA, 26 sujetos; DCL, 28; controles, 25), los niveles de estos factores inflamatorios se cuantificaron en pacientes con EA y DCL frente a controles. Se utilizaron el miniexamen del estado mental (MMSE-K), la calificación clínica de demencia (CDR), la escala de deterioro global (GDS) y la escala de depresión geriátrica coreana (GDS-K) para evaluar la función cognitiva y la gravedad de la enfermedad. De acuerdo con los resultados, PCR no mostró diferencias significativas entre los controles, los pacientes con EA y DCL-a. Sin embargo, los niveles de IL-1 β y TGF- β fueron significativamente más altos en los pacientes con EA que en DCL-a y controles [120]. Por lo tanto, **IL-1 β y TGF- β , que son factores relacionados con la inflamación, son biomarcadores adecuados para la detección temprana de EA.**

En esta investigación, IL-1 β no mostró diferencias significativas entre el grupo de DCL-a y los controles. Sin embargo, los pacientes con DCLa mostraron niveles significativamente más altos de TGF- β en comparación con los controles [120]. Por lo tanto, **TGF- β puede considerarse un biomarcador adecuado para distinguir los grupos normales, DCL y EA.** Además, TGF- β puede ser clave para el futuro tratamiento de EA.

Las citoquinas proinflamatorias, como IL-1 β , están relacionadas con la cascada neurodegenerativa de EA. El depósito de A β inicia la neuroinflamación cerebral, que está mediada por la activación de la microglía, las células inmunitarias residentes del cerebro. La microglía activada juega un rol importante en la secreción de citoquinas proinflamatorias, como IL-1 β , IL-6, que una vez liberadas estimulan la biosíntesis de A β 42 y A β 40 al afectar el metabolismo de APP. En consecuencia, se espera que IL-1 β aumente en los pacientes con EA.

Además, las citoquinas proinflamatorias periféricas inducen la producción de indolamina-2,3-dioxigenasa (IDO) [120]. La activación de IDO aumenta significativamente en pacientes con EA. Como se sabe, IDO cataliza el paso limitante

de la velocidad en la síntesis de quinurenina a partir de triptofano, y la síntesis de quinurenina en sangre periférica afecta significativamente la concentración de quinurenina en el SNC. El aumento del ácido quinolínico, el metabolito neurotóxico de quinurenina, es mayor en los pacientes con EA que en los controles. El ácido quinolínico juega un rol importante en la patología de la EA al inducir la hiperfosforilación de tau.

El TGF- β como citoquina antiinflamatoria puede tener un efecto neuroprotector al inhibir la respuesta inflamatoria de la microglía, inhibiendo la proliferación y diferenciación de las células inmunitarias. TGF- β juega un rol importante en el crecimiento y la supervivencia de las neuronas en el cerebro con EA. El TGF- β regula la respuesta a la lesión cerebral, la respuesta inflamatoria cerebral, la producción de matriz extracelular, la distribución de amiloides y la inhibición de la muerte celular [121].

TGF- β se une a APP, lo que reduce la disponibilidad de A β . Los niveles altos de TGF- β en EA explican una respuesta protectora del huésped a la lesión neuronal inflamatoria. La recuperación de la señalización alterada de TGF- β 1 se considera una estrategia farmacológica prometedora para el tratamiento de EA [121].

Las sustancias reactivas de fase aguda, como CRP, responden de manera no específica a la inflamación o al daño tisular y ocurren en los cerebros con EA.

3) Uso de IP-MALDI-TOF/EM para biomarcadores plasmáticos: Los biomarcadores A β plasmáticos de alto rendimiento fueron desarrollados por IP-MALDI-TOF-(TOF)-EM/EM para el diagnóstico temprano de EA y mostraron una buena correlación con la carga de A β cerebral por PET ([¹¹C] PiB y otros ligandos) y análisis de A β en LCR con una precisión de alrededor del 90 % [122,123]. Los biomarcadores plasmáticos son: las relaciones APP669-711/A β 1-42 y A β 1-40/A β 1-42 y sus compuestos. Se utilizaron dos conjuntos de datos independientes: un conjunto de datos de descubrimiento (Japón, n = 121) y un conjunto de datos de validación (Australia, n = 252) que incluyó sujetos cognitivamente normales, con DCL y con EA. Ambas proporciones de péptidos fueron significativamente más altas en los sujetos con PET A β -positivos que en los sujetos con PET A β -negativos. Además, los biomarcadores también se correlacionaron con los niveles de A β 1-42 en LCR, lo que respalda la asociación entre los niveles de biomarcadores plasmáticos y los niveles de A β en el SNC.

La técnica IP-MALDI-TOF-(-TOF)-EM/EM se usó para medir cantidades muy bajas de varios péptidos relacionados con A β en plasma, lo que resultó difícil con la metodología convencional basada en ELISA. Esta técnica tiene ventajas de escalabilidad sobre las técnicas actuales, adecuada para la práctica clínica, el cribado de la población y los ensayos clínicos de la terapia de EA [122].

Recientemente, se utilizó el enfoque IP-MALDI-TOF/TOF para la cuantificación relativa de la isomerización de aspartato (isoAsp7) en A β (también conocido como contenido de isoA β), en fluidos y tejidos biológicos [124].

4) Análisis peptidómico mediante EM con chips de péptidos libres y unidos a proteínas en plasma como biomarcadores de EA

Recientemente se ha realizado un desarrollo de un panel de péptidos plasmáticos como biomarcador para el diagnóstico de EA. Este panel se refiere a péptidos libres y unidos a proteínas que acompañan a las proteínas sanguíneas, que generalmente se eliminan en el paso de desproteización de las metodologías clásicas. Estos péptidos están relacionados con EA y difieren de los obtenidos tras la hidrólisis de tripsina. Este panel de péptidos corresponde a un nuevo conjunto de biomarcadores de cuatro péptidos para discriminar controles, pacientes con DCL y EA, que tiene aplicabilidad clínica [70].

Se sometió una cantidad mínima de suero (1,5 μ L) a SDS-PAGE de gradiente unidimensional al 4-12 % para la separación de péptidos de proteínas, seguido de electrotransferencia de los péptidos desde el gel de 1D-E en un solo paso en un chip de difluoruro de polivinilideno (PVDF) llamado blotchip. Finalmente, se aplicó MALDI-TOF-TOF-EM/EM, obteniendo así péptidos tanto libres como ligados a proteínas [70,125]. Este análisis peptidómico se aplicó a 99 pacientes con EA, 60 con DCL y 100 controles cognitivamente sanos [70]. Se utilizaron tubos de ensayo recubiertos de sílice para la extracción de sangre, en lugar de los recubiertos de trombina utilizados para obtener suero, que interfieren con los datos del análisis.

En el paso 1D-PAGE, se eliminan las proteínas plasmáticas de alto peso molecular presentes en la sangre y varios compuestos de bajo peso molecular que podrían interferir en la EM. Todo el proceso se completa en 4 horas. Este sistema se puede aplicar al análisis peptidómico de varias muestras clínicas en un rango de m/z 2.000-20.000 [126]. Los péptidos de tamaño pequeño a mediano (1.000-10.000Da o 10-100 aminoácidos) se pueden detectar en el suero.

El ácido α -ciano-4-hidroxicinámico de la matriz MALDI se aplicó junto con el suero en el blotchip, que luego se sometió al láser MALDI para obtener los péptidos para EM. El análisis estadístico de los datos espectrales se realizó mediante software comercial, y la comparación entre los dos grupos, EA *vs* controles; y MCI *vs* controles con la prueba de Wilcoxon. Este análisis de EM con blotchip elimina la tinción, la extracción, la carga y muchos otros pasos intermedios que consumen mucho tiempo, lo que reduce el tiempo de análisis y proporciona un análisis de proteoma de alto rendimiento.

Los cuatro péptidos se identificaron como: 1) Un fragmento de 27 aminoácidos (Péptido 1) de la cadena *beta* del fibrinógeno (FBC; PM, 2881,54); 2) un fragmento de 27 aminoácidos (Péptido 2) de glicoproteína α_2 -HS (AHSG; PM, 2857,53); 3) un fragmento de 47 aminoácidos (Péptido 3) de la cadena *alpha* del fibrinógeno (FAC; PM, 5077,35); y 4) un fragmento de 34 aminoácidos (Péptido 4) del inhibidor de proteasa C1 de plasma (PPC1I; PM, 4150.17). Estos péptidos no son fragmentos A β o tau, sino que están relacionados con los sistemas de coagulación y complemento/inflamación. Los niveles de cada proteína madre (FBC, FAC, PPC1I) de los péptidos 1, 3 y 4 aumentaron para la coagulación, el complemento y la plasticidad. Por el contrario, AHSG estaba sub-regulada por la anti-inflamación en el cerebro de los pacientes con EA [70]. FBC y FAC son materiales de coagulación esenciales y contribuyentes clave a la patología de EA. PPC1I pertenece a la superfamilia de las serpinas, que regula la coagulación/neuroinflamación, esencial en el cerebro dañado, y la proteína antiinflamatoria AHSG está regulada bajo el control del TNF-*alpha* proinflamatorio.

Los hallazgos sugieren un mecanismo patológico alternativo a las hipótesis de A β y tau para EA, como el daño de la unidad neurovascular (NVU) y la neuroinflamación/plasticidad del cerebro con EA. Como se sabe, la NVU consta de células endoteliales, uniones estrechas asociadas a BHE, lámina basal, pericitos y células parenquimatosas, así como astrocitos, neuronas e interneuronas. El conocimiento de la NVU es fundamental para la interpretación de la fisiología y patología del SNC.

Este análisis de EM con blotchip es rápido y simplificado, sin el uso de anticuerpos para identificar péptidos en comparación con IP-MALDI-TOF/EM [70].

De esta manera se ha ejemplificado la búsqueda de biomarcadores para el diagnóstico precoz en EA preclínica y prodrómica, como DCL temprano y eventualmente DCL

tardío (DCL-a), cuando hay posibilidades de tratamientos para ralentizar el camino a la etapa de EA típica y a la subsiguiente, con demencia.

8. CONCLUSIONES

Las consecuencias devastadoras del proceso neurodegenerativo, la pérdida de las funciones cognitivas y el avance hacia una demencia irreversible, hace imperiosa la necesidad de hallar biomarcadores de alta sensibilidad y especificidad para el diagnóstico precoz y seguimiento de la EA, que permitan identificar los cambios biológicos con respecto al daño neuronal sináptico y asociados al grado de progresión de la enfermedad. Dichos biomarcadores deben poder ser identificados y validados en ensayos clínicos durante todas las etapas de la evolución de la enfermedad, a fin de lograr generar un mapa o score que anticipe el pronóstico de la misma.

A su vez, su presencia en diferentes fluidos corporales, como saliva, orina, líquido ocular o lágrimas de pacientes con EA están siendo investigados ampliamente para su uso como muestreos no invasivos para EA con perspectivas altamente prometedoras, como hemos informado recientemente [8].

El objetivo principal de este trabajo ha sido resaltar el rol crucial que desempeña la espectrometría de masa (EM) en el desarrollo y establecimiento de nuevos biomarcadores de EA, como los descritos en LCR, sangre, cerebro, orina, saliva y lágrimas.

Actualmente, las técnicas de EM convencional y con chips se utilizan en centros biomédicos especializados y en laboratorios subcontratados de marcas comerciales; ofrecen el diagnóstico y progresión de EA, desde el estado de DCL y su posibilidad de convertirse en EA con demencia, así como el diagnóstico diferencial de otras demencias no relacionadas a la EA.

La EM también contribuye a la investigación y el seguimiento de las diferentes fases de los ensayos clínicos y las terapias con medicamentos en desarrollo.

La EM basada en chips permite, a su vez, un “análisis multiplex”, lo que simplifica y reduce el número de pasos de las técnicas clásicas. Además, el equipo se puede utilizar para varios propósitos. Actualmente se conocen varios chips comerciales de EM.

Con un enfoque proteómico exploratorio basado en EM, se puede identificar y cuantificar una gran cantidad de proteínas en un solo experimento sin preseleccionar proteínas diana específicas. Por lo tanto, se pueden encontrar candidatos potenciales involucrados en la enfermedad en ausencia de sesgo, y se pueden investigar aquellos

que de otro modo se pasarían por alto. Para la validación, la EM dirigida también es ventajosa, ya que no depende de anticuerpos como los inmunoensayos y al tener un enfoque multiplex se ahorra tiempo y se reducen costos. Además, la cantidad muy pequeña de muestras (microlitros de LCR o sangre) y la especificidad del método son ventajosas para llevar los hallazgos de la “proteómica de escopeta” antes mencionada, al campo clínico para un diagnóstico preciso de EA.

En los próximos años, se espera un importante desarrollo de fármacos que inhiban la acumulación de las placas seniles, la hiperfosforilación de tau y la competencia inmune en EA, y un seguimiento del tratamiento en grandes cohortes. Para lograr una terapia dirigida, es necesario conocer más sobre los mecanismos involucrados en EA, identificar los blancos terapéuticos y contar con los biomarcadores específicos de su evolución.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Ministerio de Ciencia, Tecnología de Argentina por las facilidades de la biblioteca electrónica. ABP es miembro senior de investigación del Consejo Nacional de Investigación de Argentina (CONICET).

Referencias

1. Vitale A.A., Ciprian-Ollivier J., Vitale M.G., *et al.* Clinical studies of markers of the indolic hypermethylation in human perception alterations. *Acta Biochim. Clín. Latinoamer.* **2010**; 44: 627-642.
2. Vitale A.A., Pomilio A.B., Cañellas C.O., *et al.* *In vivo* long-term kinetics of radiolabeled *N,N*-dimethyl-tryptamine and tryptamine. *J. Nucl. Med.* **2011**; 52: 970-977.
3. Pomilio A.B., Vitale A.A., Ciprian Ollivier J. Clinical and radiolabeled studies of biomarkers of the indolic hypermethylation in human perception alterations - Scientific Society of Argentina Award in Science. *An. Soc. Cientif. Argentina* **2017**; 259: 5-20.
4. Merelli A., Repetto M., Lazarowski A., *et al.* Hypoxia, oxidative stress, and inflammation: three faces of neurodegenerative diseases. *J. Alzheimers Dis.* **2021**; 82: S109-S126.
5. Merelli A., Ramos A.J., Lazarowski A., *et al.* Convulsive stress mimics brain hypoxia and promotes the P-glycoprotein (P-gp) and erythropoietin receptor overexpression. Recombinant human erythropoietin effect on P-gp activity. *Front. Neurosci.* **2019**; 13: 750.
6. Merelli A., Rodríguez J.C.G., Folch J., *et al.* Understanding the role of hypoxia inducible factor during neurodegeneration for new therapeutics opportunities. *Curr. Neuropharmacol.* **2018**; 16: 1484-1498.
7. Pomilio A.B., Vitale A.A., Lazarowski A.J. Neuroproteomics chip-based mass spectrometry and other techniques for Alzheimer's disease biomarkers – Update. *Curr. Pharm. Des.* **2022**, accepted for publication.
8. Pomilio A.B., Vitale A.A., Lazarowski A.J. Uncommon noninvasive biomarkers for the evaluation and monitoring of the etiopathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr. Pharm. Des.* **2022**, accepted for publication.
9. Barbier P., Zejneli O., Martinho M., *et al.* Role of tau as a microtubule-associated protein: structural and functional aspects. *Front. Aging Neurosci.* **2019**; 11: 204.
10. Alzheimer's Association report. 2020 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement.* **2020**; 16: 391-460.

11. Alavi Naini S.M., Soussi-Yanicostas N. Tau Hyperphosphorylation and oxidative stress, a critical vicious circle in neurodegenerative tauopathies? *Oxid. Med. Cell Longev.* **2015**; 2015: 151979.
12. Ashraf A., Jeandriens J., Parkes H.G., et al. Iron dyshomeostasis, lipid peroxidation and perturbed expression of cystine/glutamate antiporter in Alzheimer's disease: evidence of ferroptosis. *Redox Biol.* **2020**; 32: 101494.
13. Nir T.M., Jahanshad N., Villalon-Reina J.E., et al. Effectiveness of regional DTI measures in distinguishing Alzheimer's disease, MCI, and normal aging. *Neuroimage Clin.* **2013**; 3: 180-195.
14. Bergamino M., Schiavi S., Daducci A., et al. Analysis of brain structural connectivity networks and white matter integrity in patients with mild cognitive impairment. *Front. Aging Neurosci.* **2022**; 14: 793991.
15. Kinney J.W., Bemiller S.M., Murtishaw A.S., et al. Inflammation as a central mechanism in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement. (N.Y.)* **2018**; 4: 575-590.
16. Morgan B.P. Complement in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Semin. Immunopathol.* **2018**; 40: 113-124. Erratum in: Morgan B.P. Correction to: Complement in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Semin. Immunopathol.* **2018**; 40: 517.
17. Narayanaswami V., Dahl K., Bernard-Gauthier V., et al. Emerging PET radiotracers and targets for imaging of neuroinflammation in neurodegenerative diseases: outlook beyond TSPO. *Mol. Imaging* **2018**; 17: 1536012118792317.
18. Fleeman R.M., Proctor E.A. Astrocytic propagation of tau in the context of Alzheimer's disease. *Front. Cell Neurosci.* **2021**; 15: 645233.
19. Fixemer S., Ameli C., Hammer G., et al. Microglia phenotypes are associated with subregional patterns of concomitant tau, amyloid- β and α -synuclein pathologies in the hippocampus of patients with Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies. *Acta Neuropathol. Commun.* **2022**; 10: 36.
20. Onyango I.G., Jauregui G.V., Čarná M., et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Biomedicines* **2021**; 9: 524.
21. Lim D., Rodríguez-Arellano J.J., Parpura V., et al. Calcium signalling toolkits in astrocytes and spatio-temporal progression of Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* **2016**; 13: 359-369.
22. Jack C.R. Jr., Bennett D.A., Blennow K., et al. NIA-AA Research Framework: toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* **2018**; 14: 535-562.
23. Armstrong R.A. Risk factors for Alzheimer's disease. *Folia Neuropathol.* **2019**; 57: 87-105.
24. Reitz C., Rogaeva E., Beecham G.W. Late-onset vs nonmendelian early-onset Alzheimer disease: a distinction without a difference? *Neurol. Genet.* 2020; 6: e512.
25. Seto M., Weiner R.L., Dumitrescu L., et al. Protective genes and pathways in Alzheimer's disease: moving towards precision interventions. *Mol. Neurodegener.* **2021**; 16: 29.
26. D'Argenio V., Sarnataro D. New insights into the molecular bases of familial Alzheimer's disease. *J. Pers. Med.* **2020**; 10: 26.
27. Baker E., Escott-Price V. Polygenic risk scores in Alzheimer's disease: current applications and future directions. *Front. Digit. Health* **2020**; 2: 14.
28. Zhou X., Li Y.Y.T., Fu A.K.Y., et al. Polygenic score models for Alzheimer's disease: from research to clinical applications. *Front. Neurosci.* **2021**; 15: 650220.
29. Rabinovici G.D. Late-onset Alzheimer Disease. *Continuum (Minneap. Minn.)* 2019; 25: 14-33.
30. Kunkle B.W., Grenier-Boley B., Sims R., et al. Genetic meta-analysis of diagnosed Alzheimer's disease identifies new risk loci and implicates A β , tau, immunity and lipid processing. *Nat. Genet.* 2019; 51: 414-430. Erratum in: *Nat. Genet.* **2019**; 51: 1423-1424.
31. Schliebs R., Arendt T. The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. *Behav. Brain Res.* **2011**; 221: 555-563.
32. Andrews S.J., Fulton-Howard B., Goate A. Protective variants in Alzheimer's disease. *Curr. Genet. Med. Rep.* 2019; 7: 1-12.
33. Ferreira Silva M.V., de Mello Gomide Loures C., Vieira Alves L.C., et al. Alzheimer's disease: risk factors and potentially protective measures. *J. Biomed. Sci.* 2019; 26: 33.

34. Wang Y., Cella M., Mallinson K., *et al.* TREM2 lipid sensing sustains the microglial response in an Alzheimer's disease model. *Cell* **2015**; 160: 1061-1071.
35. Andersen S.L. Centenarians as models of resistance and resilience to Alzheimer's disease and related dementias. *Adv. Geriatr. Med. Res.* 2020; 2: e200018.
36. Stern Y., Arenaza-Urquijo E.M., Bartrés-Faz D., *et al.* Whitepaper: defining and investigating cognitive reserve, brain reserve, and brain maintenance. *Alzheimers Dement.* 2020; 16: 1305-1311.
37. Hohman T.J., McLaren D.G., Mormino E.C., *et al.* Asymptomatic Alzheimer disease: defining resilience. *Neurology* 2016; 87: 2443-2450.
38. Kockx M., Traini M., Kritharides L. Cell-specific production, secretion, and function of apolipoprotein E. *J. Mol. Med. (Berl.)* 2018; 96: 361-371.
39. Abondio P., Sazzini M., Garagnani P., *et al.* The genetic variability of *APOE* in different human populations and its implications for longevity. *Genes (Basel)* **2019**; 10: 222.
40. Lanfranco M.F., Ng C.A., Rebeck G.W. ApoE lipidation as a therapeutic target in Alzheimer's disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**; 21: 6336.
41. Liu C.C., Kanekiyo T., Xu H., *et al.* Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. *Nat. Rev. Neurol.* **2013**; 9: 106-118.
42. Matsunaga A., Saito T. Apolipoprotein E mutations: a comparison between lipoprotein glomerulopathy and type III hyperlipoproteinemia. *Clin. Exp. Nephrol.* 2014; 18: 220-224.
43. Blennow K., Zetterberg H., Fagan A.M. Fluid biomarkers in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2012**; 2: a006221.
44. McGrowder D.A., Miller F., Vaz K., *et al.* Cerebrospinal fluid biomarkers of Alzheimer's disease: current evidence and future perspectives. *Brain Sci.* **2021**; 11: 215.
45. Femminella G.D., Rengo G., Komici K., *et al.* Autonomic dysfunction in Alzheimer's disease: tools for assessment and review of the literature. *J. Alzheimers Dis.* **2014**; 42: 369-377.
46. Folch J., Petrov D., Ettcheto M., *et al.* Masitinib for the treatment of mild to moderate Alzheimer's disease. *Expert Rev. Neurother.* **2015**; 15: 587-596.
47. Blennow K., Zetterberg H. Biomarkers for Alzheimer's disease: current status and prospects for the future. *J. Intern. Med.* **2018**; 284: 643-663.
48. Clarke M.T.M., Brinkmalm A., Foini M.S., *et al.* CSF synaptic protein concentrations are raised in those with atypical Alzheimer's disease but not frontotemporal dementia. *Alzheimers Res. Ther.* **2019**; 11: 105.
49. Abdullah M., Kimura N., Akatsu H., *et al.* Flotillin is a novel diagnostic blood marker of Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* **2019**; 72: 1165-1176.
50. Bălașa A.F., Chircov C., Grumezescu A.M. Body fluid biomarkers for Alzheimer's disease-an up-to-date overview. *Biomedicines* **2020**; 8: 421.
51. Villa C., Lavitrano M., Salvatore E., *et al.* Molecular and imaging biomarkers in Alzheimer's disease: a focus on recent insights. *J. Pers. Med.* **2020**; 10: 61.
52. Del Prete E., Beatino M.F., Campese N., *et al.* Fluid candidate biomarkers for Alzheimer's disease: a precision medicine approach. *J. Pers. Med.* **2020**; 10: 221.
53. Altuna-Azkargorta M., Mendioroz-Iriarte M. Blood biomarkers in Alzheimer's disease. *Neurologia (Engl. Ed.)* **2021**; 36: 704-710.
54. d'Abramo C., D'Adamio L., Giliberto L. Significance of blood and cerebrospinal fluid biomarkers for Alzheimer's disease: sensitivity, specificity and potential for clinical use. *J. Pers. Med.* **2020**; 10: 116.
55. Manzano S., Agüera L., Aguilar M., *et al.* A review on Tramiprosate (homotaurine) in Alzheimer's disease and other neurocognitive disorders. *Front. Neurol.* **2020**; 11: 614.
56. Fan Y., Gao Y., Therriault J., *et al.* The effects of CSF neurogranin and *APOE* ϵ 4 on cognition and neuropathology in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Front. Aging Neurosci.* **2021**; 13: 667899.
57. Nilsson J., Gobom J., Sjödin S., *et al.* Cerebrospinal fluid biomarker panel for synaptic dysfunction in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement. (Amst.)* **2021**; 13: e12179.
58. Cano A., Turowski P., Ettcheto M., *et al.* Nanomedicine-based technologies and novel biomarkers for the diagnosis and treatment of Alzheimer's disease: from current to future challenges. *J. Nanobiotechnology* **2021**; 19: 122.

59. Jie C.V.M.L., Treyer V., Schibli R., *et al.* Tauvid™: the first FDA-approved PET tracer for imaging tau pathology in Alzheimer's disease. *Pharmaceuticals (Basel)* **2021**; 14: 110.
60. Bao W., Xie F., Zuo C., *et al.* PET neuroimaging of Alzheimer's disease: radiotracers and their utility in clinical research. *Front. Aging Neurosci.* **2021**; 13: 624330.
61. van Waarde A., Marcolini S., de Deyn P.P., *et al.* PET agents in dementia: an overview. *Semin. Nucl. Med.* **2021**; 51: 196-229.
62. West T., Kirmess K.M., Meyer M.R., *et al.* A blood-based diagnostic test incorporating plasma A β 42/40 ratio, ApoE proteotype, and age accurately identifies brain amyloid status: findings from a multi cohort validity analysis. *Mol. Neurodegener.* **2021**; 16: 30.
63. Sheynkman G.M., Shortreed M.R., Cesnik A.J., *et al.* Proteogenomics: integrating next-generation sequencing and mass spectrometry to characterize human proteomic variation. *Annu. Rev. Anal. Chem. (Palo Alto Calif.)* **2016**; 9: 521-545.
64. Raftery D., Ed. *Mass Spectrometry in Metabolomics: Methods and Protocols*. N.Y.: Springer, Humana Press, **2014**.
65. Yates J.R. 3rd. The revolution and evolution of shotgun proteomics for large-scale proteome analysis. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**; 135: 1629-1640.
66. Gomes F.P., Yates J.R. 3rd. Recent trends of capillary electrophoresis-mass spectrometry in proteomics research. *Mass Spectrom. Rev.* **2019**; 38: 445-460.
67. Reddy G., Dalmasso E.A. SELDI proteinchip(R) array technology: protein-based predictive medicine and drug discovery applications. *J. Biomed. Biotechnol.* **2003**; 2003: 237-241.
68. Clarke C.H., Bankert McCarthy D.L., Eds. *SELDI-TOF Mass Spectrometry: Methods and Protocols*. Series Methods in Molecular Biology, Vol 818, Springer; softcover reprint of the original 1st ed. 2012 edition. N.Y.: Humana, **2016**.
69. Human Brain Proteome Project (HBPP). En: Human Proteome Organization (HUPO), 2021. Available from <https://www.hupo.org/Human-Brain-Proteome-Project>. Acceso en Febrero de 2022.
70. Abe K., Shang J., Shi X., *et al.* A new serum biomarker set to detect mild cognitive impairment and Alzheimer's disease by peptidome technology. *J. Alzheimers Dis.* **2020**; 73: 217-227.
71. Costerus J.M., Brouwer M.C., van de Beek D. Technological advances and changing indications for lumbar puncture in neurological disorders. *Lancet Neurol.* **2018**; 17: 268-278.
72. Blennow K. Cerebrospinal fluid protein biomarkers for Alzheimer's disease. *NeuroRx* **2004**; 1: 213-225.
73. Liu Y., Han P.R., Hu H., *et al.* A multi-dimensional comparison of Alzheimer's disease neurodegenerative biomarkers. *J. Alzheimers Dis.* **2022** Mar 5. doi: 10.3233/JAD-215724. Epub ahead of print.
74. Russo M.J., Gustafson D., Vázquez S., *et al.* Creation of the Argentina-Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. *Alzheimers Dement.* **2014**; 10 (1 Suppl): S84-87.
75. Hendrix J.A., Finger B., Weiner M.W., *et al.* The Worldwide Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative: An update. *Alzheimers Dement.* **2015**; 11: 850-859.
76. Rathore S., Habes M., Iftikhar M.A., *et al.* A review on neuroimaging-based classification studies and associated feature extraction methods for Alzheimer's disease and its prodromal stages. *Neuroimage* **2017**; 155: 530-548.
77. de Paula Faria D., Estessi de Souza L., Duran F.L.S., *et al.* Cannabidiol treatment improves glucose metabolism and memory in streptozotocin-induced Alzheimer's disease rat model: a proof-of-concept study. *Int. J. Mol. Sci.*, **2022**; 23: 1076.
78. Márquez F., Yassa M.A. Neuroimaging biomarkers for Alzheimer's disease. *Mol. Neurodegener.* **2019**; 14: 21.
79. American Psychiatric Association (APA). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-5)*. Available from <https://www.psychiatry.org/psychiatrists/practice/dsm>. Acceso en Febrero de **2022**.
80. American Psychiatric Association (APA). *Updates to DSM-5 Criteria, Text and ICD-10 Codes*. Available from <https://www.psychiatry.org/psychiatrists/practice/dsm/updates-to-dsm-5>. Acceso en Febrero de **2022**.

81. Jack C.R. Jr., Bennett D.A., Blennow K., *et al.* A/T/N: an unbiased descriptive classification scheme for Alzheimer disease biomarkers. *Neurology* **2016**; 87: 539-547.
82. Allegri R.F., Chrem Méndez P., Calandri I., *et al.* Prognostic value of ATN Alzheimer biomarkers: 60-month follow-up results from the Argentine Alzheimer's disease neuroimaging initiative. *Alzheimers Dement. (Amst.)* **2020**; 12: e12026.
83. Hampel H., Cummings J., Blennow K., *et al.* Developing the ATX(N) classification for use across the Alzheimer disease continuum. *Nat. Rev. Neurol.* **2021**; 17: 580-589.
84. Janelidze S., Stomrud E., Palmqvist S., *et al.* Plasma β -amyloid in Alzheimer's disease and vascular disease. *Sci. Rep.* **2016**; 6: 26801.
85. Palmqvist S., Janelidze S., Stomrud E., *et al.* Performance of fully automated plasma assays as screening tests for Alzheimer disease-related β -amyloid status. *J.A.M.A. Neurol.* **2019**; 76: 1060-1069.
86. Ashton N.J., Suárez-Calvet M., Karikari T.K., *et al.* Effects of pre-analytical procedures on blood biomarkers for Alzheimer's pathophysiology, glial activation, and neurodegeneration. *Alzheimers Dement. (Amst.)* **2021**; 13: e12168.
87. Hugon J., Mouton-Liger F., Cognat E., *et al.* Blood-based kinase assessments in Alzheimer's disease. *Front. Aging Neurosci.* 2018; 10: 338.
88. Dowjat K., Adayev T., Wojda U., *et al.* Abnormalities of DYRK1A-cytoskeleton complexes in the blood cells as potential biomarkers of Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 2019; 72: 1059-1075.
89. Fossati S., Ramos Cejudo J., Debure L., *et al.* Plasma tau complements CSF tau and P-tau in the diagnosis of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement. (Amst.)* 2019; 11: 483-492.
90. Karikari T.K., Pascoal T.A., Ashton N.J., *et al.* Blood phosphorylated tau 181 as a biomarker for Alzheimer's disease: A diagnostic performance and prediction modelling study using data from four prospective cohorts. *Lancet Neurol.* 2020; 19: 422-433.
91. Lewczuk P., Ermann N., Andreasson U., *et al.* Plasma neurofilament light as a potential biomarker of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Alzheimers Res. Ther.* 2018; 10: 71.
92. Forgrave L.M., Ma M., Best J.R., *et al.* The diagnostic performance of neurofilament light chain in CSF and blood for Alzheimer's disease, frontotemporal dementia, and amyotrophic lateral sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *Alzheimers Dement.* **2019**; 11: 730-743.
93. Zou K., Abdullah M., Michikawa M. Current biomarkers for Alzheimer's disease: from CSF to blood. *J. Pers. Med.* **2020**; 10: 85.
94. Vishnu V.Y., Modi M., Sharma S., *et al.* Role of plasma clusterin in Alzheimer's disease-a pilot study in a tertiary hospital in northern India. *PLoS ONE* 2016; 11: e0166369.
95. Hye A., Lynham S., Thambisetty M., *et al.* Proteome-based plasma biomarkers for Alzheimer's disease. *Brain* **2006**; 129 (Pt 11): 3042-3050.
96. Ray S., Britschgi M., Herbert C., *et al.* Classification and prediction of clinical Alzheimer's diagnosis based on plasma signaling proteins. *Nat. Med.* **2007**; 13: 1359-1362.
97. Hye A., Riddoch-Contreras J., Baird A.L., *et al.* Plasma proteins predict conversion to dementia from prodromal disease. *Alzheimers Dement.* **2014**; 10: 799-807.e2.
98. Mapstone M., Cheema A.K., Fiandaca M.S., *et al.* Plasma phospholipids identify antecedent memory impairment in older adults. *Nat. Med.* **2014**; 20: 415-418.
99. Varma V.R., Oommen A.M., Varma S., *et al.* Brain and blood metabolite signatures of pathology and progression in Alzheimer disease: a targeted metabolomics study. *PLoS Med.* **2018**; 15: e1002482.
100. Thambisetty M., Hye A., Foy C., *et al.* Proteome-based identification of plasma proteins associated with hippocampal metabolism in early Alzheimer's disease. *J. Neurol.* **2008**; 255: 1712-1720.
101. Fonseca M.I., McGuire S.O., Counts S.E., *et al.* Complement activation fragment C5a receptors, CD88 and C5L2, are associated with neurofibrillary pathology. *J. Neuroinflammation* **2013**; 10: 25.
102. Carpanini S.M., Torvell M., Morgan B.P. Therapeutic inhibition of the complement system in diseases of the central nervous system. *Front. Immunol.* **2019**; 10: 362.

103. Pietronigro E.C., Della Bianca V., Zenaro E., *et al.* NETosis in Alzheimer's disease. *Front. Immunol.* **2017**; 8: 211.
104. Zhang M., Han W., Xu Y., *et al.* Serum miR-128 serves as a potential diagnostic biomarker for Alzheimer's disease. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* **2021**; 17: 269-275. Erratum in: *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* **2021**; 17: 513.
105. Doecke J.D., Ward L., Burnham S.C., *et al.* Elecsys CSF biomarker immunoassays demonstrate concordance with amyloid PET imaging. *Alzheimers Res. Ther.* **2020**; 12: 36.
106. Hansson O., Seibyl J., Stomrud E., *et al.* CSF biomarkers of Alzheimer's disease concord with amyloid- β PET and predict clinical progression: A study of fully automated immunoassays in BioFINDER and ADNI cohorts. *Alzheimers Dement.* **2018**; 14: 1470-1481.
107. Rabinovici G.D., Gatsonis C., Apgar C., *et al.* Association of amyloid positron emission tomography with subsequent change in clinical management among medicare beneficiaries with mild cognitive impairment or dementia. *J.A.M.A.* **2019**; 321: 1286-1294.
108. Hoffmann-La Roche (Sponsor and Responsible Party). A study of gantenerumab in participants with prodromal Alzheimer's disease (Scarlet Road). Clinical Trial. Last Update Posted: December 13, 2021. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01224106. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01224106>. Acceso en Febrero de **2022**.
109. Ostrowitzki S., Lasser R.A., Dorflinger E., *et al.* A phase III randomized trial of gantenerumab in prodromal Alzheimer's disease. *Alzheimers Res. Ther.* **2017**; 9: 95. Erratum in: *Alzheimers Res. Ther.* **2018**; 10: 99.
110. Klein G., Delmar P., Voyle N., *et al.* Gantenerumab reduces amyloid- β plaques in patients with prodromal to moderate Alzheimer's disease: a PET substudy interim analysis. *Alzheimers Res. Ther.* **2019**; 11: 101.
111. FDA. FDA Grants Accelerated Approval for Alzheimer's Drug. June 07, **2021**. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-grants-accelerated-approval-alzheimers-drug>. Acceso en Febrero de **2022**.
112. Taylor NP. FDA awards breakthrough status to blood test for Alzheimer's risk. Medtechdive [cited 2019 January 30]. <https://www.medtechdive.com/news/fda-awards-breakthrough-status-to-blood-test-for-alzheimers-risk/547198/>. Acceso en Febrero de **2022**.
113. The PrecivityAD(TM) Test: Advanced Diagnostics in Alzheimer's Disease, 2020. www.PrecivityAD.com. Acceso en Febrero de **2022**.
114. Kirmess K.M., Meyer M.R., Holubasch M.S., *et al.* The PrecivityAD (TM) test: Accurate and reliable LC-MS/MS assays for quantifying plasma amyloid *beta* 40 and 42 and apolipoprotein E proteotype for the assessment of brain amyloidosis. *Clin. Chim. Acta* **2021**; 519: 267-275.
115. Practical Neurology. FDA grants breakthrough device designation for Alzheimer's Disease screening test. <http://v2.practicalneurology.com/news/?id=53504¢er=43>. Acceso en Febrero de **2022**.
116. Thijssen E.H., Rabinovici G.D. Rapid progress toward reliable blood tests for Alzheimer Disease. Editorial. *J.A.M.A. Neurol.* **2021**; 78: 143-145.
117. Kitamura Y., Usami R., Ichihara S., *et al.* Plasma protein profiling for potential biomarkers in the early diagnosis of Alzheimer's disease. *Neurol. Res.* **2017**; 39: 231-238.
118. Güntert A., Campbell J., Saleem M., *et al.* Plasma gelsolin is decreased and correlates with rate of decline in Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* **2010**; 21: 585-596.
119. Thambisetty M., Simmons A., Velayudhan L., *et al.* Association of plasma clusterin concentration with severity, pathology, and progression in Alzheimer disease. *Arch. Gen. Psychiatry* **2010**; 67: 739-748.
120. Park J.K., Lee K.J., Kim J.Y., *et al.* The association of blood-based inflammatory factors IL-1 β , TGF- β and CRP with cognitive function in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Psychiatry Investig.* **2021**; 18: 11-18.
121. Estrada L.D., Oliveira-Cruz L., Cabrera D. Transforming growth factor *beta* type I role in neurodegeneration: implications for Alzheimer's Disease. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2018**; 19: 1180-1188.
122. Nakamura A., Kaneko N., Villemagne V.L., *et al.* High performance plasma amyloid- β biomarkers for Alzheimer's disease. *Nature* **2018**; 554: 249-254.

123. Ridler C. Alzheimer disease: Blood amyloid- β successfully signals AD. *Nat. Rev. Neurol.* **2018**; 14: 195.
124. Pekov S.I., Ivanov D.G., Bugrova A.E., *et al.* Evaluation of MALDI-TOF/TOF mass spectrometry approach for quantitative determination of aspartate residue isomerization in the amyloid- β peptide. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2019**; 30: 1325-1329.
125. Araki Y., Nonaka D., Hamamura K., *et al.* Clinical peptidomic analysis by a one-step direct transfer technology: its potential utility for monitoring of pathophysiological status in female reproductive system disorders. *J. Obstetrics Gynaecology Res.* **2013**; 39: 1440-1448.
126. Tanaka K., Tsugawa N., Kim Y.O., *et al.* A new rapid and comprehensive peptidome analysis by one-step direct transfer technology for 1-D electrophoresis/MALDI mass spectrometry. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2009**; 379: 110-114.
-

Glutaraldehyde diperoxide in isopropanol solution

SYNTHESIS AND REACTIVITY OF GLUTARALDEHYDE DIPEROXIDE IN ISOPROPANOL SOLUTION

Alexander G. Bordón¹, Maria J. Jorge², Lilian C. Jorge³, Mariela I. Profeta¹,
Jorge M. Romero¹, and Nelly L. Jorge^{1*}

¹ Laboratorio de Investigaciones en Tecnología Ambiental, IQUIBA-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura. Av. Libertad 5460. (3400) Corrientes, Argentina. nelly.jorge@gmail.com

² Departamento de Matemáticas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura. Av. Libertad 5460. (3400) Corrientes, Argentina.

³ Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Nordeste. Juan Bautista Cabral, Argentina.

* Autor correspondiente: nelly.jorge@gmail.com

Recibido: 21 de agosto de 2022 Aceptado: 21 de octubre de 2022

Resumen

Nos hemos comprometido con el estudio de los peróxidos orgánicos cíclicos con dos funciones peroxilo en sus moléculas, motivados por los múltiples usos y posibilidades de aplicación que se encuentran para estos compuestos. En este trabajo, analizamos la cinética de descomposición térmica de 3,6-dibutanol-1,2,4,5-tetroxano (DPG) en solución de isopropanol. A la concentración ($1,06 \times 10^{-3} \text{M}$) y temperaturas estudiadas (403-439 K), la cinética cumple satisfactoriamente con una ley cinética de primer orden hasta el 80% de conversión del diperoxido. A partir de los datos cinéticos obtenidos experimentalmente, se determinaron los parámetros de activación $\Delta H^\ddagger = 53,80 \text{ kJ mol}^{-1} \pm 0,6$ y $\Delta S^\ddagger = -170,51 \pm 0,7 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$. Se pudieron realizar diferentes correlaciones y tratamientos. Los resultados obtenidos con anterioridad a este trabajo se incluyeron en los análisis, para establecer comparaciones.

Palabras claves: Descomposición térmica; mecanismo; cromatografía; diperoxido; síntesis.

Abstract

We have committed ourselves to the study of cyclic organic peroxides with two peroxy functions in their molecules, motivated by the multiple uses and application possibilities found for these compounds. In this paper, we analyze the thermal decomposition kinetics of 3,6-dibutanol-1,2,4,5-tetroxane (DPG) in isopropanol solution. At the concentration ($1.06 \times 10^{-3} \text{M}$) and temperatures studied (403-439 K), the kinetics satisfactorily fulfills with a first-order kinetic law up to 80% conversion of the diperoxide. From the kinetic data obtained experimentally, the

activation parameters were determined $\Delta H^\ddagger = 53.80 \text{ kJ mol}^{-1} \pm 0.6$ and $\Delta S^\ddagger = -170.51 \pm 0.7 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ different correlations and treatments could be made. The results obtained prior to this work were included in the analyses, to establish comparisons.

Keywords: *Thermal decomposition; mechanism; chromatography; diperoxide; synthesis.*

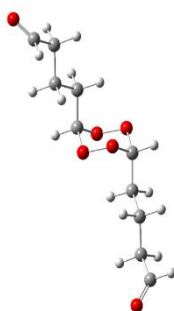
Introduction

Organic diperoxides are liquid or solid organic substances that contain two bivalent bonds -O-O- in their structure and can be synthesized with hydrogen peroxide, and ketones or aldehydes and one or both hydrogens are replaced by organic radicals [1-6].

Organic diperoxides are thermally unstable substances or mixtures, which can undergo self-accelerating exothermic decomposition. In addition, they may have one or more of the following properties: be susceptible to explosive decomposition; burn quickly; be sensitive to shock or friction and react dangerously to other substances. However, they are currently considered essential since their structure allows them to act as drugs against malaria and another action is that of herbicides [7-9].

As a contribution to these last two activities of diperoxides, we are investigating the synthesis and reactivity of diperoxides derived from aldehydes to know their possible action on different reaction media [10-12].

That is why this work focuses on the thermal decomposition of 3,6-dibutanal-1,2,4,5-tetroxane (DPG) in isopropanol solution (**Scheme 1**).



Scheme 1. 3,6-Dibutanal-1,2,4,5-tetroxane (DPG).

Materials and methods

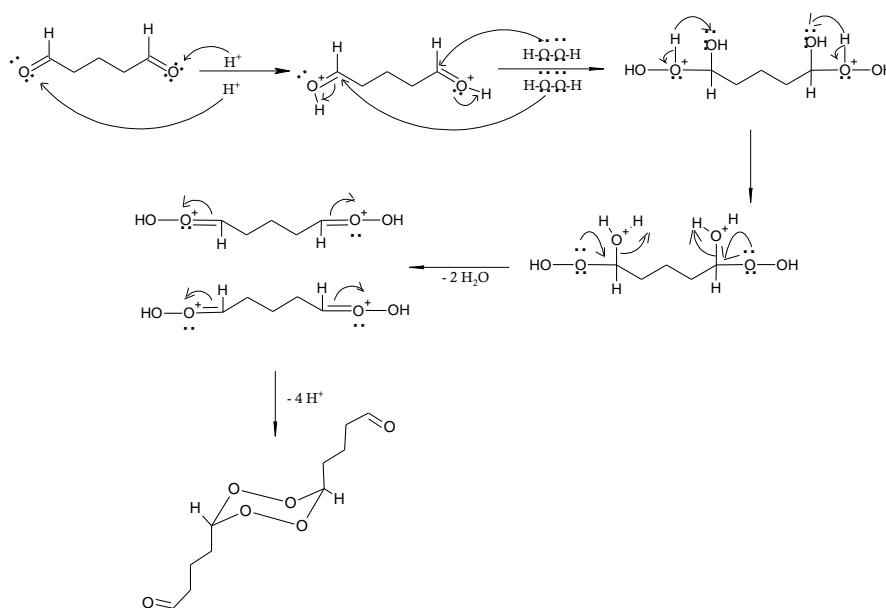
Synthesis

Glutaraldehyde diperoxide (**Scheme 1**) was synthesized by oxidation of glutaraldehyde with oxygen peroxide in the presence of concentrated sulfuric acid, following the Bayer and Viller method modified by Jorge *et al.* [10-12].

Hydrogen peroxide 60% (H₂O₂: 0.051 mol, 0.975 g) and glutaraldehyde (35.4 mmol, 4.02 g) were added by consecutive dropwise addition to a stirred solution of water (15 mL), EtOH (25 mL) and H₂SO₄ (35 mL) at -10°C.

Stirring was continued for 1 h at -10°C. The resulting white precipitate was centrifuged, washed with water, and dried in a vacuum desiccator to constant weight. The precipitate was recrystallized from acetonitrile (**Scheme 2**).

The synthesized compound was characterized by infrared spectroscopy and UV-visible spectroscopy. The gas chromatography technique was also carried out, which is necessary to be able to see its degree of purity and if it is possible to analyze it by this method of quantification of DPG in the kinetics in solution and in the gas phase.



Scheme 2. DPG synthesis mechanism.

Solvent

Isopropanol: The commercial solvent Fluka (p.a.) was treated with the disodium salt of ethylenediaminetetraacetic acid (Na₂-EDTA, Merck brand p.a.), leaving it at rest in a covered Erlenmeyer flask for 24 hours with occasional stirring. It was then distilled, collecting the 83°C boiling point fraction. Its purity was controlled by Gas Chromatography.

Preparation of DPG-solvent samples for thermolysis tests

The thermolysis reaction was carried out in vacuum-closed Pyrex glass ampoules 14 cm long and with an external diameter of 7 mm. The ampoules were prepared as follows: they were filled with 1 mL of DPG in isopropanol, using a Pasteur pipette. The open end was connected to a vacuum system ($p < 1$ torr), containing a trap (cooled with liquid N_2) and Teflon caps that allow the ampoule to be isolated from the rest of the system. Subsequently, the ampoule was immersed in a thermos with liquid N_2 ($-196^\circ C$), left for 2 or 3 minutes, and then evacuated for another 2 or 3 minutes. The vacuum passage was closed and the ampoule was removed from the flask until the solution had completely melted. The degassing process was repeated 3 times to eliminate all gases present in the solution. At the end of degassing, keeping the ampoule submerged in liquid nitrogen, it was closed with a gas and O_2 torch.

Thermolysis reaction

The reaction ampoules, containing the DPG solution in the appropriate solvent, were immersed in a thermostatic bath of stabilized silicone oil at the chosen temperature ($\pm 0.2^\circ C$); and they were removed at conveniently determined times, stopping the reaction by immersion in a water/ice bath at $0^\circ C$. The remaining DPG of the pyrolyzed solutions was quantified by Gas Chromatography using the external standard method.

Results and discussion

Fig. 1 shows the IR spectrum obtained experimentally for DPG. It is interesting to observe about this spectrum the presence of an absorption peak corresponding to the peroxide O-O bond and the C=O bond, characteristic of this type of compounds.

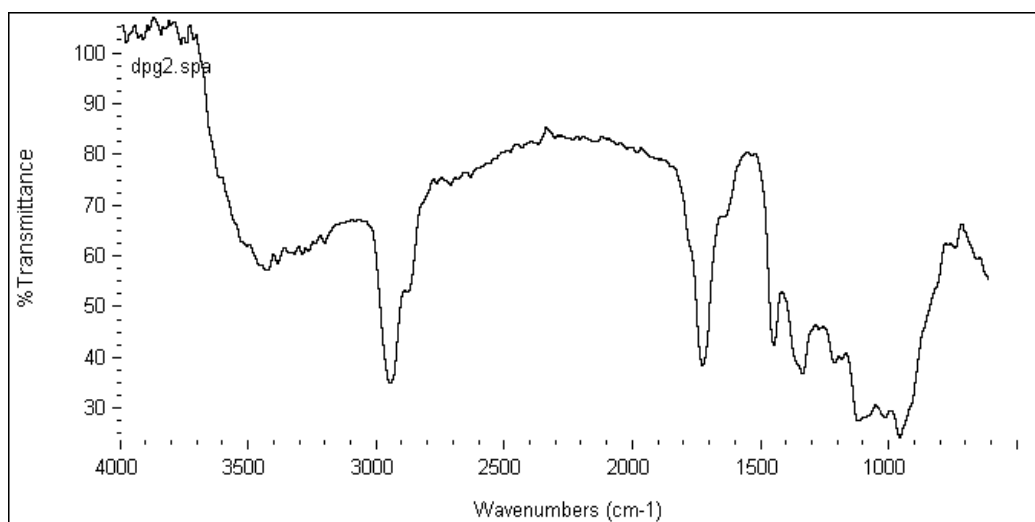


Figure 1. Experimental IR spectra obtained from the DPG.

The assignment of vibrational frequencies was carried out by comparison with the density functional method (DFT) with the functional BhandHlyp and the base 6-311+G**. The calculated frequencies and the corresponding assignment are for the most stable isomer, which is the one where the butanal groups are in the axial-axial position.

The symmetric and asymmetric C-H stretching of the CH₂ group generally appear at 2926 and 2853 cm⁻¹, respectively. The symmetric modes in DPG are located at 2870 and 2877 cm⁻¹ and the asymmetric modes at 2960 and 3047 cm⁻¹. The largest changes observed in the CH₂ stretching bands must be associated with the nearby presence of peroxide. The calculated asymmetric stretching modes are in the range of 3094 cm⁻¹. The calculated symmetric CH₂ stretching modes, on the other hand, are at 2984 cm⁻¹.

The carbonyl groups of aldehydes absorb at slightly higher frequencies than those of the corresponding methyl ketones. The C=O groups in the DPG absorb at 1708 and 1729 cm⁻¹ and the corresponding calculated values are 1903 and 1905 cm⁻¹, the values have a high shift with respect to the experimental ones, it could be due to the fact that the diffuse ones were coupled and that it could affect the calculation of this group.

The experimental bands at 1445, 1404, 1371, 1348, 1346, 1333, 1270, 1250, 1209, 1206 cm⁻¹, and calculated at 1439, 1399, 1371, 1345, 1343, 1340, 1265, 1256, 1209, 1206 cm⁻¹, respectively, are assigned as, movement of the hydrogens of the CH₂ group: wagging, bending and twisting, CC stretching, symmetric stretching of the H CH₂, bending of the H of the ring, stretching CO, asymmetric out of phase of the CCC, bending and δOCH, out of phase symmetric of the CCC, respectively. The band at 1333 cm⁻¹ is due to the C-H aldehyde bending vibration, the calculated one is 1304 cm⁻¹.

The bands calculated between 1206-1445 cm⁻¹ to the different bending modes of H of CH₂, which are twisting, wagging, and rocking. The peak at 1270 cm⁻¹ corresponds to the stretching of the CO bond, the calculated value corresponds to 1265 cm⁻¹. The value of 1206 cm⁻¹ corresponds to the stretching of the CC bond close to the carbonyl and the calculated value is 1209 cm⁻¹. The bands at 1117 and 1114 cm⁻¹ and calculated 1137, 1114 cm⁻¹, respectively, correspond to the stretching coupling modes of the C=O, CH, and CC bonds and to the bending modes of the CH of CH₂. The calculated CO bond stretching bands 1155 and 1165 cm⁻¹ are correlated with the experimental peaks 1178 and 1182 cm⁻¹. The bands at 1007, 1025, and 1078 cm⁻¹ correspond to the stretching

modes of the CO and CC bonds and their calculated values are 1002, 1022, and 1056 cm^{-1} , respectively.

The stretching of the O-O bond is characterized by being present within the range of 900-700 cm^{-1} . The stretching modes corresponding to the O-O bond of the ring are found to be 910-952 cm^{-1} and calculated to be 911-952 cm^{-1} . The bands in the range 810 to 570 cm^{-1} , calculated at 819 to 578 cm^{-1} , are assigned to COO deformation modes, symmetric and asymmetric ring deformation, and OCO deformation modes, respectively.

The bands located between 570 and 415 cm^{-1} and calculated between 578 and 428 cm^{-1} correspond to the couplings between the torsion angle and the bending modes of H of CH_2 .

Symmetric and asymmetric stretching CCC appears at 1080 and 1078 cm^{-1} , theoretical at 1082 and 1056 cm^{-1} . The electronic bands that appear between 400 and 600 cm^{-1} experimental and theoretical between 428 and 601 cm^{-1} correspond to deformations of the HCO skeleton.

Thermal decomposition

To determine the amount of **DPG** remaining or unreacted in the thermal decomposition kinetics, the external standard method was used. The calibration curve was made by plotting the area of diperoxide (**DPG**) as a function of the concentration of the **DPG**, which turned out to be linear (**Fig. 2**).

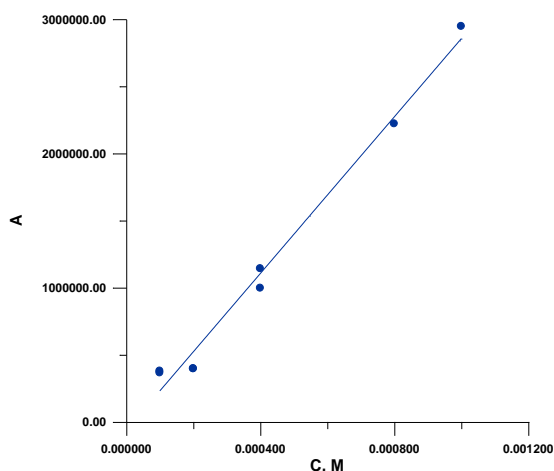


Figure 2. Calibration curve of DPG in isopropanol.

The decomposition of **DPG** has been studied in isopropanol solution, in the temperature range of 403-439 K and at an initial concentration of 1.06×10^{-3} M. The thermolysis of DPG in isopropanol solution complies with a first-order kinetic law of

peroxide conversion from *ca.* 80%. At the concentration studied, the effects of secondary decomposition reactions induced by free radicals originating in the reaction medium can be considered minimal or negligible. **Fig. 3** shows the linearity of the $\ln C$ as a function of time.

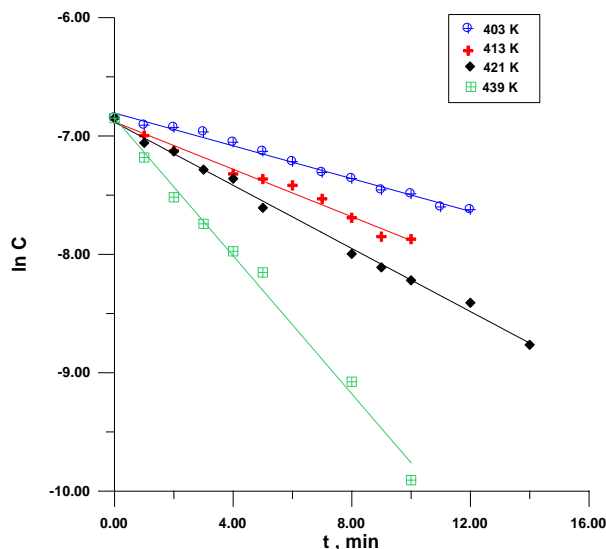


Figure 3. Thermal decomposition kinetics of DPG (1.06×10^{-3} M) in isopropanol solution at different temperatures.

The rate constant values of the thermal decomposition reaction of DPG show that the reactivity of this compound at a temperature of 403 K increases up to two times with respect to the protic polar solvent methanol ($k_{\text{isoprop}}/k_{\text{met}} = 2$). With respect to acetonitrile 13 times, ($k_{\text{isoprop}}/k_{\text{aceto}} = 13$), decreasing slightly at other temperatures. Therefore, it is evident that in polar aprotic solvents the reaction occurs more slowly than in polar protic solvents and the rate constant increases as the polarity of the solvent increases.

Table 1. Rate constants of the thermal decomposition of DPG in isopropanol solution at different temperatures.

Temperature K	$C_{\text{DPG}} \times 10^3$ M	$k_{\text{exp}} \times 10^3 \text{ s}^{-1}$	R^2
403	1,06	1,15	0,999
413	1,06	1,64	0,996
423	1,06	2,24	0,987
439	1,06	4,72	0,991

The variations in the rate constants are probably caused by the presence of the protic solvent, which slightly dominates the preferential solvation around the cyclic diperoxide

molecules. This solvation effect accounts for the specific interaction between isopropanol and the more polar activated complex represented by the biradical, initially formed (**Scheme 3**). As has been observed, the decomposition reaction of DPG in isopropanol is accelerated compared to that found in acetonitrile and methanol. The effect of temperature on the k_{exp} values (**Table 2, Fig. 4**) can be represented by the Arrhenius equation, where the errors correspond to the standard deviations obtained by treating the kinetic data with the least squares method, and the activation energy is expressed in J mol^{-1} .

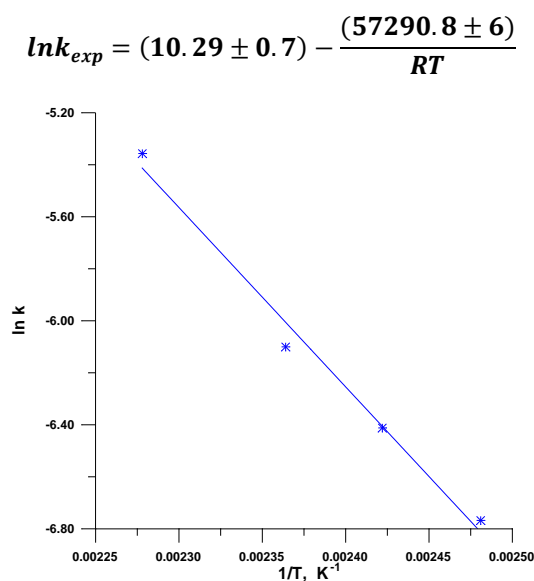


Figure 4. Graphic representation of the effect of temperature on the values of the reaction rate constant corresponding to the thermal decomposition of DPG in isopropanol solution.

The kinetic parameters determined with the Eyring equation are displayed in **Fig. 5**. **Table 2** also showed the variation in the activation parameters with the change in solvent, especially between the values of activation enthalpy and activation entropy. The proximity between the activation enthalpies (ΔH^\ddagger) of the reaction in alcohols and the separation of acetonitrile can be appreciated, in the same way there are also contrasts between the values of the activation entropies ($\Delta \Delta S^\ddagger = 54.32$) (isopropanol and methanol and $151.32 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ between isopropanol and acetonitrile). Among these three solvents, were the highest in acetonitrile, followed by methanol and finally isopropanol. Which indicates that there is an effect of the solvent in the thermolysis of DPG and that may be related to the difference in the polarity of these solvents; however, the values of the free energies of activation are very close to each other, which suggests that although the solvents accelerate the reaction, these thermal decompositions are equivalent [13].

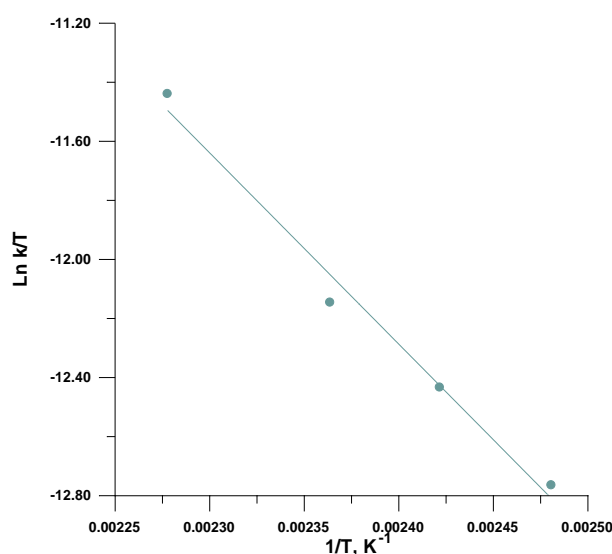


Figure 5. Graphical representation of the Eyring equation corresponding to the thermal decomposition of DPG in isopropanol solution.

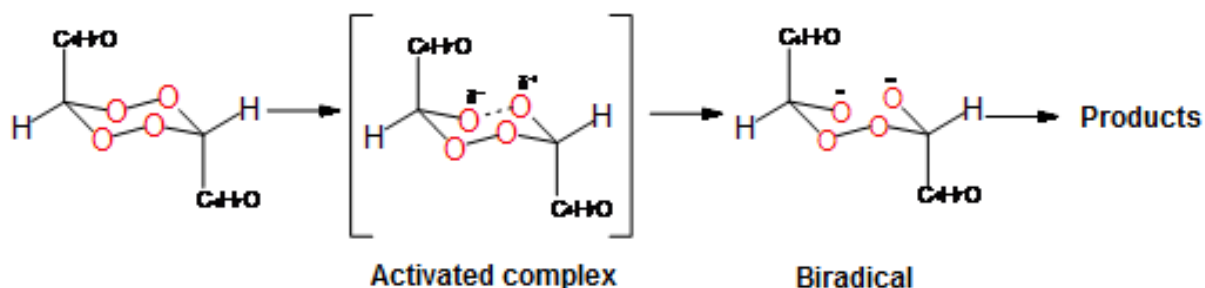
In the isopropanol solvent, the reactive transition state and biradical species are more solvated by isopropanol. It can be assumed that preferential solvation is an influential reactivity factor for the homolytic cleavage of the O-O bond of diperoxides. Specific interactions between the O atom in the peroxide bond and the H atom in the OH of isopropanol can be taken into account. However, in addition, in this solvent an adduct is formed between DPG and isopropanol that favors more bond breaking, making the transition state more solvated than the reagents, thus the activation parameters E_a and ΔH^\ddagger are lower [14].

Table 2. Activation parameters of the systems with different solvents.

Solvent	$E_T^{N(30)}$	Dielectric constant	ΔH^\ddagger kJ mol ⁻¹	ΔS^\ddagger J.mol ⁻¹ K ⁻¹	E_a kJ mol ⁻¹	ΔG^\ddagger kJ mol ⁻¹
Acetonitrile	0.460	37.5	123.54	-19.12	127.03	131.56
Methanol	0.762	32.6	77.95	-116.13	81.45	126.61
Isopropanol	0.546	18.0	53.80	-170.51	57.36	125.33

The rate-determining step in the thermal decomposition reaction of cyclic peroxides is the intermediate biradical formation [13] (**Scheme 3**). It is highly unlikely that the activated complex would dissolve to the same extent as the starting reagent, since there should be differences in the electronic configuration and thus polarization. The

differential solvation of the starting material and the activated complex should lead to a difference in the reaction rate constant and subsequently in the activation parameter (e.g., activation energy). The solvent cavity requirement for the activated complex in a radical reaction must certainly be different (in size and shape) from that of the reactant. Changes in solvent reactions or diperoxide substituents cause changes in reaction rates.



Scheme 3. Rate-determining step of the thermal decomposition reaction of cyclic peroxides (biradical formation).

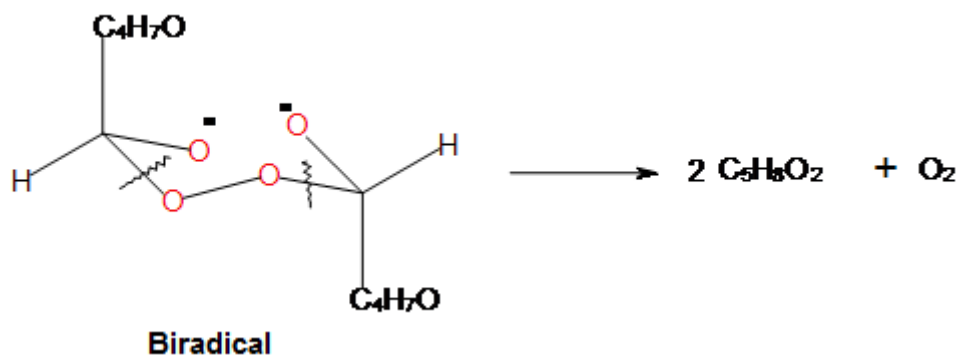
The identification of the reaction products was carried out by GC analysis comparing the retention time of each product from a sample prepared with the corresponding products, with the retention time of that compound in the reaction mixture. Identification was confirmed by chromatography.

Regarding the analysis of the reaction products, it was possible to verify the formation of glutaraldehyde as the main product, expressing the results by means of the relationship:

$$\text{Molar yield of product} = \text{moles of glutaraldehyde formed} / \text{moles of DPG decomposed}$$

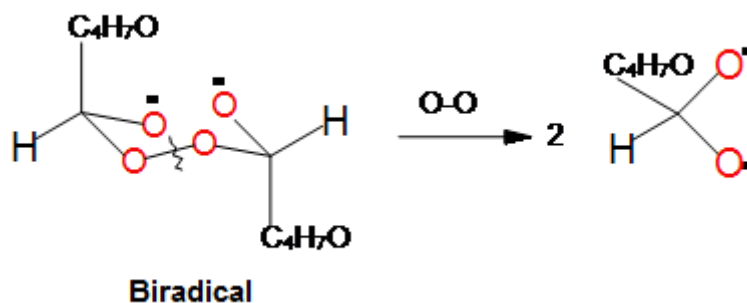
The molar yield of glutaraldehyde should be 2. However, the values are between 1.6-1.8, and if the kinetics is allowed to elapse until the DPG is exhausted, it can reach a value of 1.9 at the highest temperatures, allowing to support the postulated decomposition mechanism in all stages.

The organic products derived from the thermolysis of DPG in the different reaction media can be interpreted in terms of an initial OO bond homolysis to give an intermediate biradical (**Scheme 3**), which can then undergo CO bond cleavage (**Scheme 4**), cleavage of the OO link (**Scheme 5**), or subsequent CC link splits (**Scheme 6**). The glutaraldehyde obtained from the decomposition of diperoxide in the solvents studied can be explained as a product derived from the breakdown of CO (**Scheme 4**).

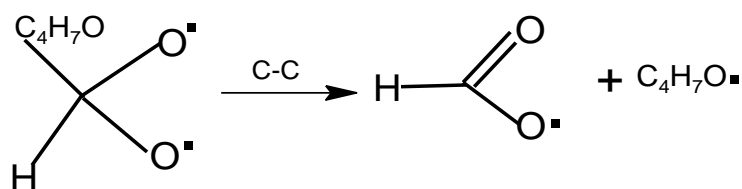


Scheme 4. Formation of glutaraldehyde and molecular oxygen.

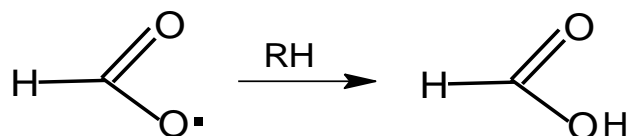
As a consequence of the O-O bond cleavage represented in **Scheme 5**, new highly unstable biradicals were formed. Later, the decomposition of these ones through C-C bond cleavage generated different free radicals (**Scheme 6**) capable of participating in radical-radical reactions (**Scheme 7**) or in the abstraction reaction of hydrogen atoms (**Scheme 8**). Some detected products confirm the existence of radical-radical coupling reactions (for example, 2,2,3,3-tetramethylbutane from 2c and ethane from 1a and 2a). The identified esters (butanal methanoate of 2b and tert-butyl acetate of 2c) are interpreted with the help of **Scheme 6**.



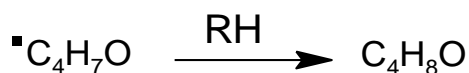
Scheme 5. Breaking of the O-O bond and formation of other unstable oxime biradical.



Scheme 6. Formation of the formyl radical and butanal.



Scheme 7. Abstraction of H and formation of formic acid.



Scheme 8. Abstraction of H and formation of butyraldehyde.

Conclusiones

The thermal decomposition reaction of the DPG compound in the different solvents studied, carried out in the temperature range between (403.15 and 439.15) K with a difference of 10 degrees, was in accordance with the pseudo-first order kinetic law, where the solvent was in excess and did not influence the reaction mechanism.

According to the products obtained in the thermolysis and the values of the activation parameters, a unimolecular mechanism with a cyclic transition state of six members, concerted and of a semipolar nature is proposed.

It was found that there is an effect of solvents, which accelerated the speed of thermolysis in solution, being higher with isopropanol, affecting the kinetics of thermal decomposition.

It can be assumed that preferential solvation is an influential reactivity factor for the homolytic cleavage of the O-O bond of this peroxide.

Acknowledgments

The Authors thanked the Secretary General of Science and Technology of the National University of the Northeast for the support received in carrying out this work.

References

1. Mc Cullough K.J., Morgan A.R., Nonhebel D.C., *et al. J. Chem. Res. Synop.* **1980**; 2, 34. M 0601.
2. Mc Cullough K.J., Morgan A.R., Nonhebel D.C., *et al. J. Chem. Res. Synop.* **1980**; 2, 36-37, M0651.
3. Dong Y., Andersen S.L., Ager A.L. Jr, *et al. J. Med. Chem.* **2000**; 43, 2753-2758.
4. Opsenica I., Opsenica D., Smith K.S., *et al. J. Med. Chem.* **2008**; 51, 2261-2266.
5. Leiva L.C.A., Jorge N.L., Romero J.M., *et al. J. Argent. Chem. Soc.* **2009**; 96 (1-2), 110-122.
6. Pila A.N., Profeta M.I., Romero J.M., *et al. Int. J. Chem. Model.* **2013**; 4 (4), 5-10.
7. Bagchi G.D., Jain D.C., Kumar S. *J. Med. Arom. Plant Sci.* **1998**; 20, 5-11.
8. Dayan F.E., Hernández A., Allen S.N., *et al. Phytochemistry* **1999**; 50, 6007-6014.
9. Stiles L.H., Leather G.R., Chen P.K., *et al. J. Chem. Ecol.* **1994**; 20(4), 969-978.
10. Reguera M.B., Romero J.M., Gómez Vara M.E., *et al. Int. J. Appl. Chem.* **2006**; 2(5), 221-225.
11. Jorge N.L., Leiva L.C.A., Romero J.M., *et al. Inf. Tecnol. Chile* **2002**; 13 (2), 23-26.
12. Castellanos M.G., Jorge N.L., Gómez Vara M.E. *Inf. Tecnol. Chile* **2000**; 11 (3), 125-128.
13. Bustillo S., Leiva L.C.A., Jorge N.L., *et al. Trends Appl. Sci. Res.* **2006**; 1 (6), 640-644.
14. Moryganov B.N., Kalinin A.I., Mikhotova L.N. *J. Gen. Chem. USSR* **1962**; 32, 3414-3419.

ESTUDIO ESTRUCTURAL Y CONFORMACIONAL DE LAS ANTOCIANIDINAS: PELARGONIDINA, CIANIDINA Y DELFINIDINA

Nicolas A. Szewczuk ^{*1}, Rosana M. Lobayan ², Pablo R. Duchowicz ¹ y
Alicia B. Pomilio ³

¹ Instituto de Investigaciones Físicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA), CONICET, Universidad Nacional de La Plata (UNLP), Diag. 113 y 64, C.C. 16, Sucursal 4, B1900 La Plata, Argentina.

² Departamento de Física, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura, Universidad Nacional del Nordeste, Avda. Libertad 5300, 3400 Corrientes, Argentina.

³ Laboratorio de Química y Bioquímica Estructural, Departamento de Bioquímica Clínica, Área Hematología, Hospital de Clínicas “José de San Martín”, Universidad de Buenos Aires, Av. Córdoba 2351, C1120AAF Buenos Aires, Argentina.

* **Autor Corresponsal:** nicolas.szewczuk@hotmail.com

Recibido: 15 de noviembre de 2022 Aceptado: 18 de diciembre de 2022

Resumen

Esta investigación trata de una visión detallada del espacio conformacional de las tres antocianidinas hidroxiladas, como pelargonidina, cianidina y delfinidina. Se realizaron escaneos rígidos de los ángulos diedros de interés para la comprensión de las estructuras químicas de este tipo de compuestos, así como de las diferentes disposiciones espaciales que adoptan. Los conformeros planos (P) y no planos (Z) obtenidos por esta búsqueda sistemática integral se analizaron en el nivel teórico B3LYP/6-311++G**. Por medio de rotaciones rígidas, seguidas por optimizaciones completas tanto de los máximos como los mínimos de energía, se estimaron las variaciones de energía en relación a la flexibilidad de estos compuestos. De esta manera, se estimaron las restricciones energéticas en función de la libre rotación de los diferentes enlaces. Se presenta una nomenclatura completa y detallada, con el fin de agilizar el estudio de estos compuestos, agrupando los conformeros según características estructurales en común. Se analizaron en detalle los aspectos geométricos de los diferentes conformeros optimizados, destacando similitudes y diferencias entre los mismos. Derivado del análisis geométrico, se encontraron aspectos estructurales novedosos que no se encuentran en línea con la representación típica de sal de oxonio para estos compuestos.

Palabras Clave: *Antocianidinas; pelargonidina; cianidina; delfinidina; espacio conformacional.*

Abstract

This research deals with a detailed view of the conformational space of the three hydroxylated anthocyanidins, such as pelargonidin, cyanidin and delphinidin. Rigid scans of the dihedral angles of interest were carried out to understand the chemical structures of this type of compounds, as well as the different spatial arrangements adopted. Planar (P) and non-planar (Z) conformers from this comprehensive systematic search were analyzed at the theoretical level B3LYP/6-311++G**. Through rigid rotations and subsequent full optimizations of both the maximum and the minimum energies, estimates of the energy variations in relation to the flexibility of these compounds were achieved. Therefore, energy constraints were estimated based on the different bond free rotations. A complete and detailed nomenclature is shown, in order to speed up the study of these compounds, grouping conformers according to common structural characteristics. The geometric features of the optimized conformers were analyzed, highlighting similarities and differences between them. Derived from the geometric analysis, novel structural contributions were found that are not in line with the typical representation of oxonium salt for these compounds.

Keywords: *Anthocyanidins; pelargonidin; cyanidin; delphinidin; conformational space.*

1. Introducción

Las antocianinas son pigmentos hidrosolubles naturales e inoocuos, pertenecientes a la familia de los flavonoides, que se encuentran comúnmente en frutos, hojas, flores, tallos y tubérculos, junto con carotenoides, betacianinas o betalaínas y derivados de tetrapirrol [1]. Estructuralmente, las antocianinas son *O*-glucósidos de las antocianidinas (agliconas), que se encuentran como sales de flavilio, también llamadas sales de oxonio, representadas por una carga positiva en O-1. En realidad, esta carga positiva se encuentra deslocalizada a lo largo de los tres anillos aromáticos conjugados (A, B y C).

Las antocianinas presentes en los vegetales han mostrado una variedad de aplicaciones medicinales y usos como tintes o colorantes alimentarios para reemplazar a los sintéticos. Además, los alimentos ricos en antocianinas forman parte de los denominados alimentos funcionales por sus características nutraceuticas [2]. Las antocianinas han demostrado ser efectivas en la prevención de diversas enfermedades crónicas, como las enfermedades cardiovasculares [3,4], la diabetes, la osteoartritis y la obesidad [5–7], así como para retrasar el proceso de envejecimiento, disminuyendo el riesgo de trastornos neurodegenerativos como el Alzheimer [8–10], mejora de la visión [11] y tratamiento del cáncer [12]. Los posibles efectos antitumorales de las antocianinas se basan en las actividades antioxidantes, antiinflamatorias,

antimutagénicas y antiangiogénicas, la inducción de la diferenciación celular, la inhibición de la proliferación mediante la modulación de las vías de transducción de señales, la inducción de la detención del ciclo celular y la estimulación de la apoptosis o autofagia de las células cancerosas [13]. La acción antiinvasiva y antimetastásica de las antocianinas, con reversión de la resistencia de las células cancerosas a los fármacos, y aumento de la sensibilidad a la quimioterapia [14].

Nuestros laboratorios tienen experiencia en aislamiento, purificación e identificación de nuevas estructuras de flavonoides bioactivos desde 1970, incluidos estudios de bioactividad, conformacionales, semiempíricos y *ab initio* (algunos artículos de investigación desde 2010 están incluidos en la lista de referencia). En particular, hemos llevado a cabo investigaciones sobre las estructuras y bioactividades de antocianinas aciladas, flavonoides (catequinas y proantocianinas), flavonoides monoméricos y diméricos [15–18], así como relaciones cuantitativas estructura-actividad (QSAR) de flavonoides y biflavonoides como neuraminidasa inhibidor del virus de la influenza H1N1 [19], y estudios 2D- y 3D-QSAR de flavonoides, biflavonas y chalconas como agentes antivirales, antibacterianos, antifúngicos y antimicobacterianos [20] y actividades antialimentarias contra insectos [21] y actividad insecticida [22]. También se realizaron estudios QSAR de flavonas como posibles compuestos con actividad ansiolítica [23,24], y como inhibidores de aldosa reductasa para la prevención de la formación de cataratas [25].

Por otro lado, se estudiaron las características conformacionales, las estructuras electrónicas y los efectos de los solventes en fenilflavanos no sustituidos y sustituidos, como los isómeros *Z* de ($4\alpha \rightarrow 6''$, $2\alpha \rightarrow O \rightarrow 1''$)-fenilflavanos, pertenecientes al grupo de las proantocianidinas diméricas tipo A, y también las catequinas, analizando la estabilidad y reactividad en vacío y en solución acuosa, entalpías de disociación de enlaces y potenciales de ionización [26–34].

Uno de los primeros estudios QSAR sobre antocianinas se desarrolló recientemente en nuestro grupo de investigación, involucrando su actividad antioxidante, dando lugar a modelos de valor predictivo para el diseño de nuevos antioxidantes [35]. Recientemente, también informamos el análisis QSAR para la inhibición de la actividad mutagénica de las antocianinas [36].

La planaridad de las antocianidinas ha sido objeto de debate durante las últimas cinco décadas. Incluso el análisis de estructuras de rayos X de antocianidinas, como punto de partida para la investigación teórica geométrica, no resultó exitoso ya que el

empaquetamiento de cristales puede inducir restricciones severas que no existen en vacío ni en solución. Los primeros estudios, que optaron por métodos semiempíricos, informaron que el residuo benzopirilio y el anillo B eran aproximadamente planos, posiblemente estabilizados por la interacción entre el heteroátomo de oxígeno en el anillo C y los átomos de hidrógeno en el anillo B, o entre los átomos de hidrógeno en estos anillos [37,38]. De acuerdo con la mayoría de los estudios teóricos, las antocianidinas son sistemas cuasiplanares sujetos a la rotación libre del anillo B, lo que resulta en una amplia distribución de isómeros rotacionales en condiciones ambientales [39–42]. Por lo tanto, sustituyentes voluminosos como azúcares en las antocianinas, pueden impedir la rotación libre del anillo B. Los funcionales híbridos, ampliamente utilizados para los cálculos basados en la teoría del funcional de la densidad (DFT), pueden describir bien el potencial de torsión y la distribución conformacional de las antocianidinas. Los valores informados en la literatura para el ángulo diedro O-C2-C1'-C2' están en el rango de -10 a +8 grados, dependiendo de los sustituyentes en la sal de flavilio y el método/conjunto base adoptado para los cálculos [39,42].

Recientemente hemos realizado un estudio electrónico estructural de las tres agliconas que contienen sustituyentes oxidrilos en el anillo B (pelargonidina, cianidina y delphinidina), permitiendo relacionar aspectos estructurales y conformacionales con actividades biológicas de interés (actividad antioxidante y antimutagénica) [43]. En el presente trabajo, se realizó una búsqueda exhaustiva y sistemática del espacio conformacional de las antocianidinas pelargonidina, cianidina y delphinidina, como así también un análisis geométrico estructural.

2. Materiales y Métodos

El estudio computacional se llevó a cabo usando la teoría del funcional de la densidad (DFT) implementada en los programas de Gaussian 09 (<https://gaussian.com/>) [44]. El análisis del espacio conformacional y el funcional de intercambio de tres parámetros de Becke [45], sumado al funcional de correlación de Lee, Yang y Parr [46], dieron lugar al híbrido funcional conocido como B3LYP. Para los cálculos se usó el nivel de teoría B3LYP/6-311G++(d,p).

Las estructuras químicas de las antocianidinas en estudio se muestran en la **Fig. 1**. Se utilizaron las reglas de nomenclatura y numeración según IUPAC [47].

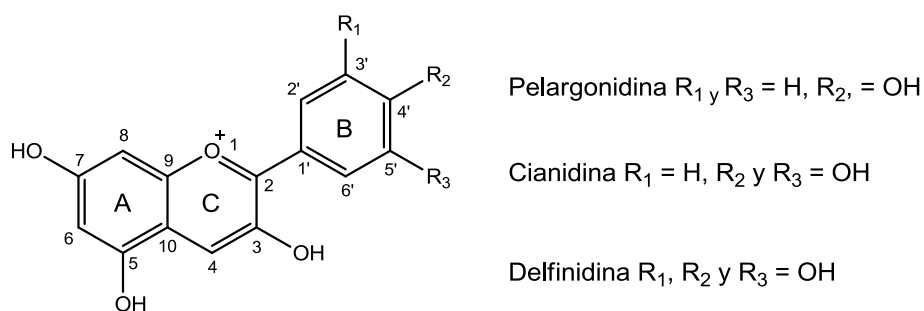


Figura 1. Estructura química de pelargonidina, cianidina y delfinidina.

El estudio del espacio conformacional de pelargonidina, cianidina y delfinidina se realizó fijando la posición de los grupos hidroxilo, como HO-3, HO-5, HO-7, HO-3', HO-4' y HO-5'.

Se realizaron escaneos rígidos de 10° para los ángulos diedros (τ) H-O-C3-C2, O-C2-C1'-C2', H-O-C5-C6, H-O-C7-C6 y H-O-C4'-C3' en pelargonidina, cianidina y delfinidina. También se estudiaron variaciones similares para τ H-O-C3'-C4' en cianidina y delfinidina, y τ H-O-C5'-C4' en delfinidina. Esto permitió conocer las superficies de energía potencial de los compuestos en estudio. Con base en este conocimiento, se seleccionaron los conformeros de mínima y máxima energía, que luego se optimizaron al mismo nivel de teoría, con las geometrías completamente relajadas.

Con las estructuras optimizadas, se determinaron las distancias de enlace, los ángulos de enlace y los ángulos diedros de interés para realizar el análisis de la estructura geométrica de cada antocianidina en estudio.

3. Resultados y Discusión

3.1. Nomenclatura

Los conformeros se clasificaron en *syn* (*cis*) y *anti* (*trans*) de acuerdo con la disposición de los enlaces H-O5 y H-O7 en el anillo A en relación con los enlaces C5-C6 y C6-C7 respectivamente.

Por lo tanto, los ángulos diedros H-O5-C5-C6 y H-O7-C7-C6 estaban cerca de 0° para arreglos **C** (*cis*) y cerca de 180° para **T** (*trans*). Pelargonidina tiene un solo hidroxilo en el anillo B (HO-4'), mostró dos conformaciones llamadas **u** (*arriba*) y **d** (*abajo*) (**Fig. 1**) según la ubicación del enlace HO-O4'. Un ángulo diedro cercano a 180° con respecto a C-3' (**Fig. 2**) dio **d**, mientras que cercano a 0° llevó a **u**.

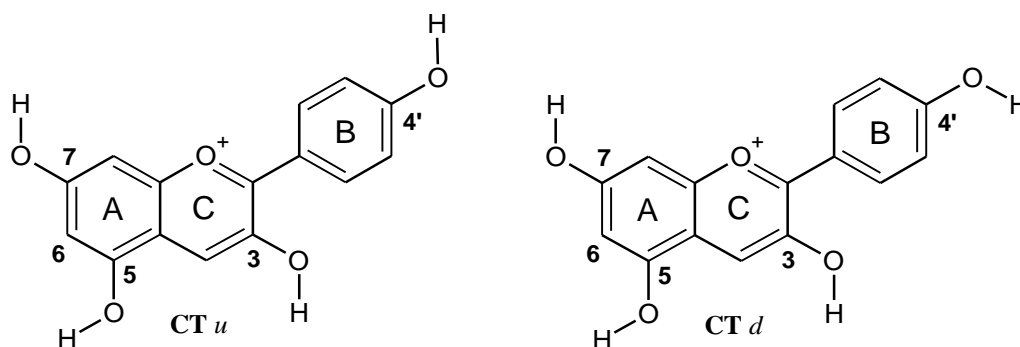


Figura 2. Estructuras *u* (arriba) y *d* (abajo) de pelargonidina según la orientación de HO-4'.

Cianidina tiene dos hidroxilos (HO-3' y HO-4') en el anillo B; dio las estructuras *cc*, *ct*, *tc* o *tt* según la disposición de los enlaces H-O3' y H-O4' con respecto a el enlace C3'-C4' (**Fig. 3**). Estos arreglos se nombraron utilizando un criterio similar al abordado en la estructura similar al resorcinol del anillo A. Los arreglos *c* (*cis*) o *t* (*trans*) representan ángulos diedros cercanos a 0° o 180° para H-O3'-C3'-C4' y H-O4'-C4'-C3' respectivamente.

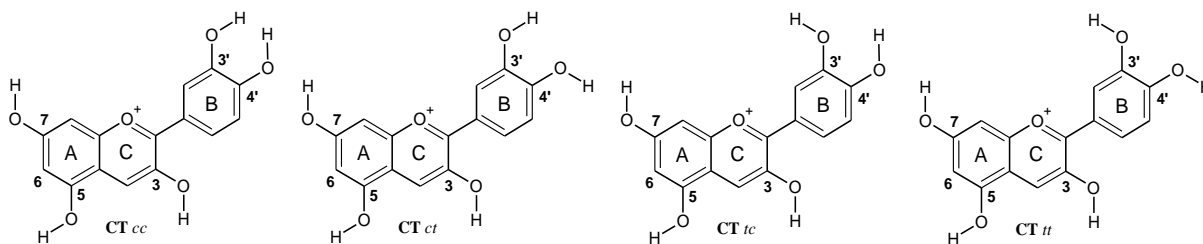


Figura 3. Estructuras *cc*, *ct*, *tc* o *tt* de cianidina según la disposición de los enlaces H-O3' y H-O4' en relación con el enlace C3'-C4'.

Delfinidina tiene tres hidroxilos en el anillo B, como HO-3', HO-4' y HO-5'. La orientación de HO-5' se definió de acuerdo con la disposición del enlace H-O5' con respecto al enlace C4'-C5' (**Fig. 4**).

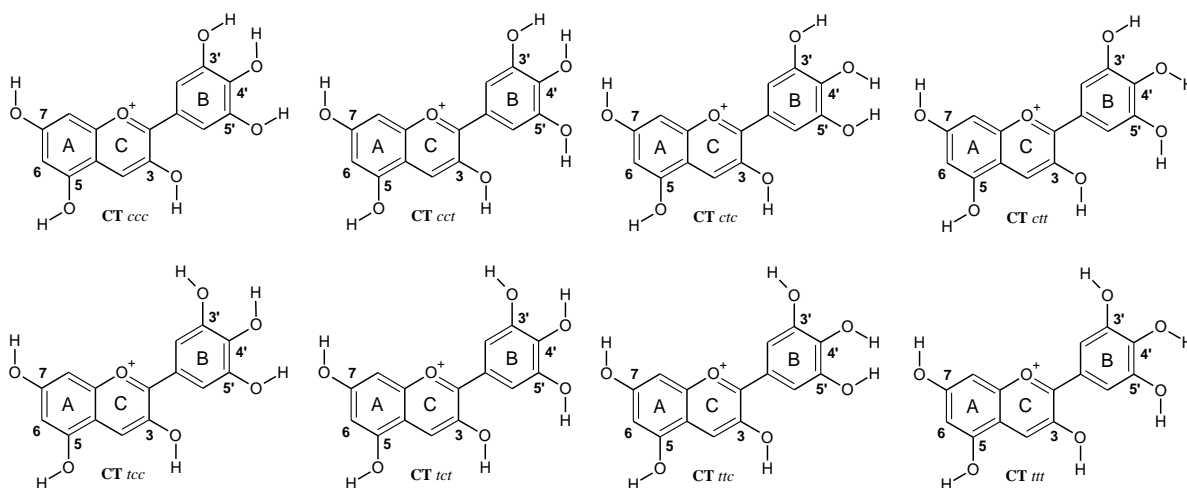


Figura 4. Estructuras *ccc*, *cct*, *ctc*, *ctt*, *tcc*, *tct*, *ttc*, o *ttt* de delphinidina según los arreglos H-O3' y H-O4' con respecto al enlace C3'-C4', y el de H-O5' con respecto a C4'-C5'.

La aparición de HO-3' y HO-4' en el anillo B de cianidina resultó en una singularidad. La rotación del anillo B alrededor del eje del enlace C2-C1' dio lugar a dos estructuras distintas, denominadas **A** o **B** (**Fig. 5**). Estas estructuras se caracterizaron por un ángulo diedro O-C2-C1'-C2' cercano a 0° para **A** y cercano a 180° para **B**.

La estructura **A** mostró un patrón de sustitución 3',4'. En la estructura **B**, HO-3' estaba espacialmente más cerca de HO-3 [HO-3' era equivalente a HO-5' de **A** cuando se numeraba en el sentido de las agujas del reloj (patrón de sustitución de 4', 5')]. En consecuencia, se definieron dos patrones de sustitución 3',4' y 4',5' no equivalentes.

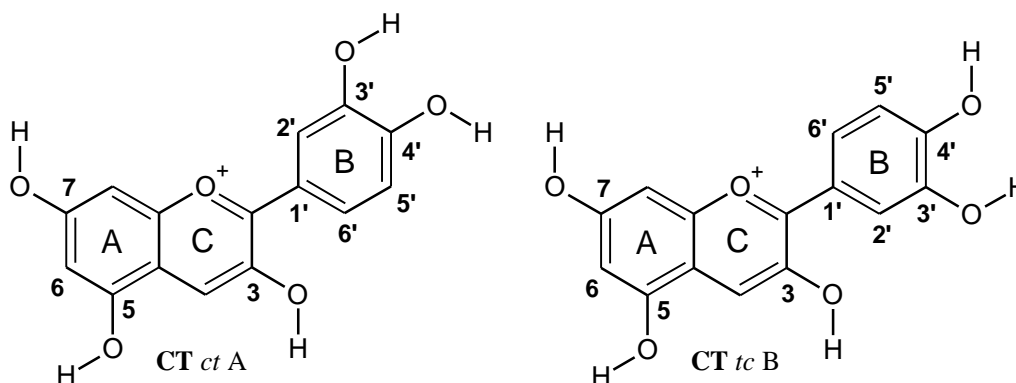


Figura 5. Estructuras **A** y **B** de la cianidina según la disposición de los dos hidroxilos en el anillo B.

Las estructuras que presentan los anillos AC-B en un mismo plano, se nombran como **P** al inicio de cada nombre (**Fig. 6**).

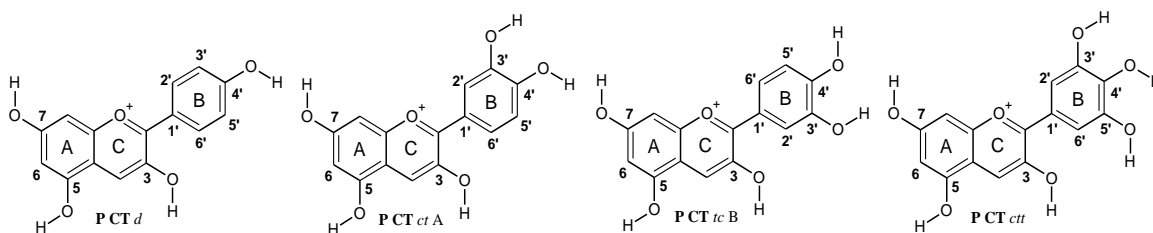


Figura 6. Estructuras **PCT_d**, **PCT_{ctA}**, **PCT_{tcB}** y **PCT_{ctt}** mostrando la coplanaridad de los anillos AC-B.

Ciertas estructuras no presentan la coplanaridad entre los anillos AC-B, mostrando valores distintos a 0° o 180° para el ángulo diedro O-C2-C1'-C2'. En estos casos, el HO-3 se ubica hacia el anillo B, presentando valores para el ángulo diedro H-O3-C3-C2 que rondan -20° o 20° . Este comportamiento se combina con la rotación del ángulo diedro O-C2-C1'-C2', tomando valores cercanos a -30° o 30° para pelargonidina, cianidina **A** y delphinidina, o valores cercanos a -150° o 150° para cianidina **B**. Cuando el HO-3 se ubica por encima del anillo B se nombra como **Z1**, mientras que si se ubica por debajo del anillo B como **Z2** (**Fig. 7**).

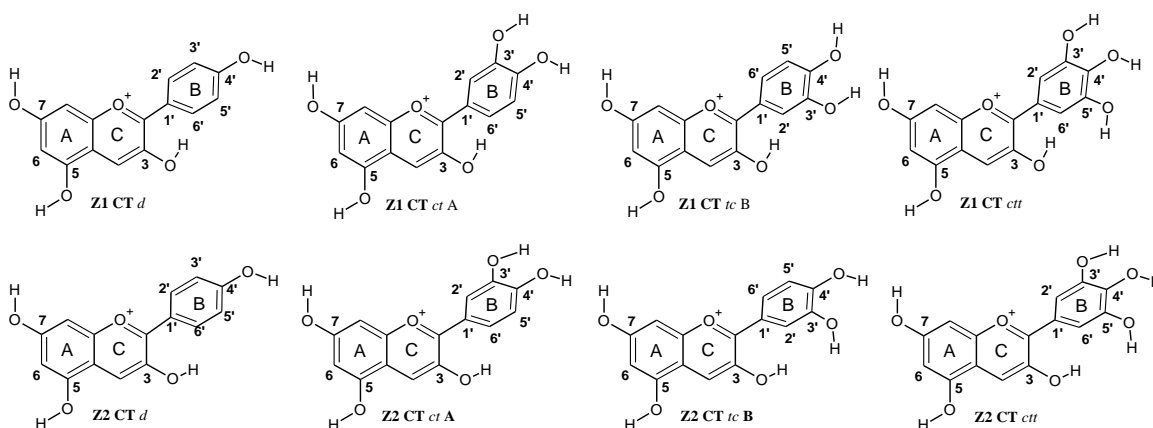


Figura 7. Disposiciones **Z1** y **Z2** para los arreglos **CT_d**, **CT_{ctA}**, **CT_{tcB}** y **CT_{ctt}**.

3.2. Espacio conformacional

A partir de los arreglos tipo **CT** y el HO-3 con un ángulo diedro C2-C3-O-H de 180° , que representa la estructura de más baja energía para cada compuesto, se analizó el efecto de la rotación del anillo B a intervalos de 10° en las estructuras **d**, **tc B**, y **ctt** alrededor del eje de enlace C2-C1' (**Fig. 8**). Se adquirieron posiciones energéticamente favorables en el anillo B manteniendo la coplanaridad con los anillos A y C. A partir de este análisis, sólo dos estructuras fueron viables para cada compuesto, por ejemplo,

pelargonidina **P CT d** y **P CT u**, cianidina **P CT tc B** y **P CT tc A**, y delfinidina **P CT ctt** y **P CT tcc**, siendo la segunda estructura menos estable que la primera.

Como era de esperar, las variaciones máximas de energía se alcanzaron a rotaciones de 90° para todos los casos, es decir, cuando el anillo B se ubica perpendicularmente al anillo C.

Los máximos de energía a 90° y 270° para el ángulo diedro O-C2-C1'-C2' se optimizaron, no encontrándose conformeros no planos.

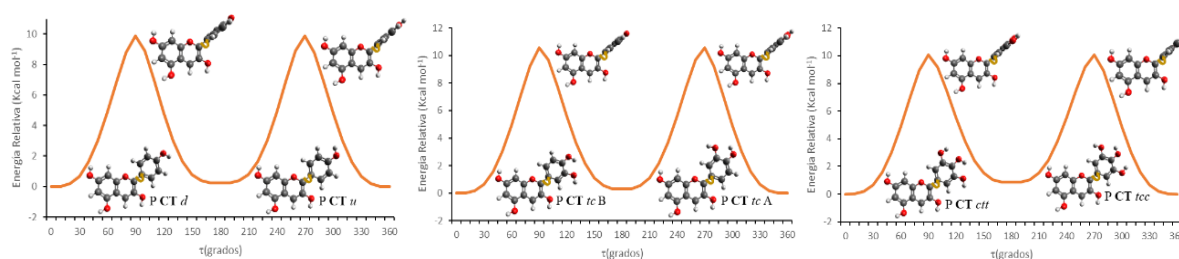


Figura 8. Energía de los conformeros pelargonidina **P CT d**, cianidina **P CT tc B** y delfinidina **P CT ctt**, al variar el ángulo diedro O-C2-C1'-C2', describiendo la rotación del anillo B con respecto al eje del enlace C2-C1'.

Todas las antocianidinas en estudio contenían HO-5 y HO-7, definiendo una distribución del tipo resorcinol en el anillo A. La rotación del enlace O5-H a intervalos de 10° alrededor del eje del enlace C5-O5 en pelargonidina, cianidina y delfinidina se muestra en la **Fig. 9**. Por lo tanto, el arreglo más estable (el único arreglo de energía mínima) para HO-5 se logró a 0° con respecto al enlace C6-C5, alcanzando para la orientación desfavorecida la máxima energía a 180° .

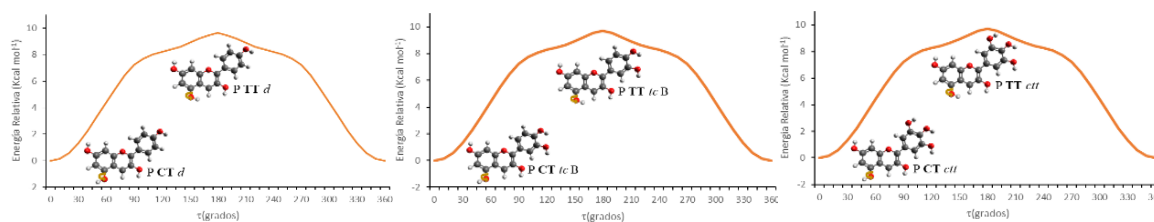


Figura 9. Energía de los conformeros pelargonidina **P CT d**, cianidina **P CT tc B** y delfinidina **P CT ctt**, al variar el ángulo diedro C6-C5-O5-H, describiendo la rotación del enlace O5-H con respecto al eje del enlace C5-O5.

La rotación del enlace O7-H a intervalos de 10° alrededor del eje del enlace C7-O7 en pelargonidina, cianidina y delfinidina se muestra en la **Fig. 10**. Esto surgió de la variación del ángulo diedro C6-C7-O7-H.

Cada compuesto bajo estudio mostró las estructuras de menor energía a 180° y las estructuras de mayor energía a 90° y 270° con HO-7 fuera del plano del anillo A. La

ubicación espacial de HO-5 y HO-7 en el mismo plano del anillo A estabilizó la estructura de la molécula.

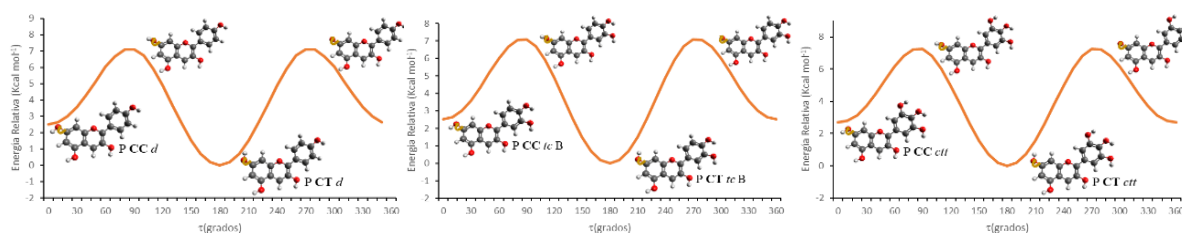


Figura 10. Energía de los conformeros pelargonidina **P CT d**, cianidina **P CT tc B** y delphinidina **P CT ctt** al variar el ángulo diedro C6-C7-O7-H, describiendo la rotación del enlace O7-H con respecto al eje del enlace C7-O7.

La rotación del enlace O4'-H con respecto al eje del enlace C4'-O4' (variación del ángulo diedro C3'-C4'-OH) desde 0° a intervalos de 10°, en cada una de las tres antocianidinas, se muestra en la **Fig. 11**.

Para pelargonidina, sólo se infirieron dos conformeros, **P CT d** y **P CT u**, siendo el segundo menos estable que el primero, como se analizó anteriormente. Los máximos de energía se alcanzaron a 90° y 270°, considerando estructuras con HO-4' fuera del plano del anillo B. Cianidina **P CT tc B** mostró la mínima energía a 0° y la máxima energía a 90° y 270°, similar al análisis anterior. Apareció un mínimo local a 180°, debido a la desestabilización producida por la repulsión estérica entre HO-3' y HO-4'. La conformación con ambos hidroxilos orientados hacia la misma dirección, en el sentido de las agujas del reloj, se encontró a 0° (energía más baja). Después de la adición de otro sustituyente, como HO-5' en delphinidina **P CT ctt**, se mostró un único mínimo a 180°. El máximo de energía a 0° representó la repulsión estérica entre los dos hidrógenos de HO-3' y HO-4', ambos enfrentados. Una vez más, la disposición coordinada en el sentido de las agujas del reloj de los tres sustituyentes del anillo B proporcionó una mayor estabilidad al conformero.

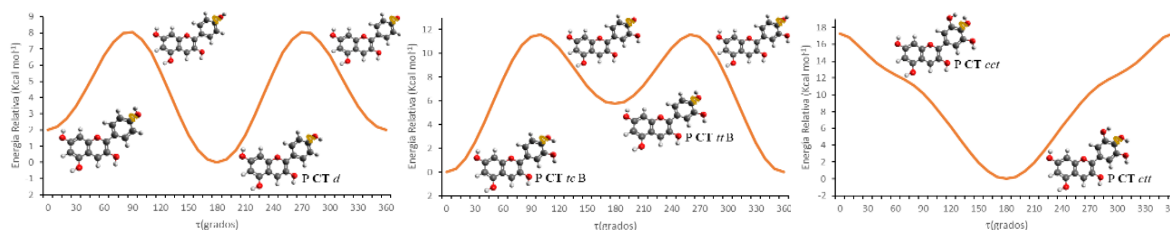


Figura 11. Energía de los conformeros pelargonidina **P CT d**, cianidina **P CT tc B** y delphinidina **P CT ctt**, al variar el ángulo diedro C3'-C4'-O-H describiendo la rotación del enlace O4'-H con respecto al eje del enlace C4'-O4'.

Para encontrar todas las disposiciones posibles del anillo B en cianidina, también se analizó la variación del ángulo diedro C3'-C4'-OH desde 0° a intervalos de 10° en los conformeros **P CT *ct* B**, **P CT *tc* A** y **P CT *ct* A**, como se muestra en la **Fig. 12**. Cianidina **P CT *ct* B** mostró un mínimo de energía a 180° y un máximo de energía a 0°, similar a cianidina **P CT *ct* A**. Por el contrario, la curva para cianidina **P CT *tc* A** se asemeja a la obtenida para cianidina **P CT *tc* B**, donde el mínimo de energía se alcanzó a 0° y dos máximos de energía a 90° y 270°, en los que HO-4' se encontraba fuera del plano del anillo B. Al observar las estructuras, la disposición opuesta de HO-3' y HO-4' en el anillo B desestabilizó significativamente la molécula, principalmente debido a los efectos estéricos. Este arreglo ocurrió en cianidina **P CT *ct* B** y **P CT *ct* A**, donde la repulsión entre los hidroxilos HO-3' y HO-4' produce mayor desestabilización que la ubicación fuera del plano de alguno de estos hidroxilos. Cuando se observa el gráfico para cianidina **P CT *tc* B** y **P CT *tc* A**, los máximos de energía se muestran cuando el HO-4' se desplaza fuera del plano del anillo B. Se logró un mínimo de energía local a 180°, cuando HO-3' y HO-4' se disponen hacia direcciones opuestas. Cabe mencionar que tanto la orientación en sentido de las agujas del reloj (para cianidina **P CT *tc* B**) como en sentido contrario a las agujas del reloj (para cianidina **P CT *tc* A**) proporcionó estabilidad a la molécula.

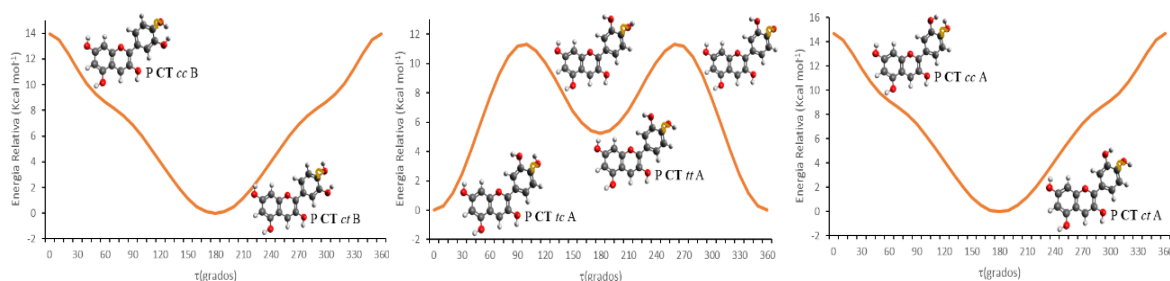


Figura 12. Energía de los conformeros cianidina **P CT *ct* B**, **P CT *tc* A** y **P CT *ct* A** al variar el ángulo diedro C3'-C4'-O-H, describiendo la rotación del enlace O4'-H con respecto al eje del enlace C4'-O4'.

Cuando se consideró el ángulo diedro C4'-C3'-O-H se obtuvieron curvas similares a las mencionadas anteriormente. Las tendencias y comportamientos se mantuvieron, alcanzando mínimos de energía cuando los hidroxilos estaban orientados en sentido horario o antihorario, como se muestra en la **Fig. 13**. La rotación del enlace O3'-H con respecto al eje del enlace C3'-O3' de cianidina **P CT *tc* B**, **P CT *ct* B**, **P CT *tc* A** y **P CT *ct* A**, condujeron a los conformeros de mayor energía **P CT *cc* B**, **P CT *tt* B**, **P CT *cc* A** y **P CT *tt* A** respectivamente.

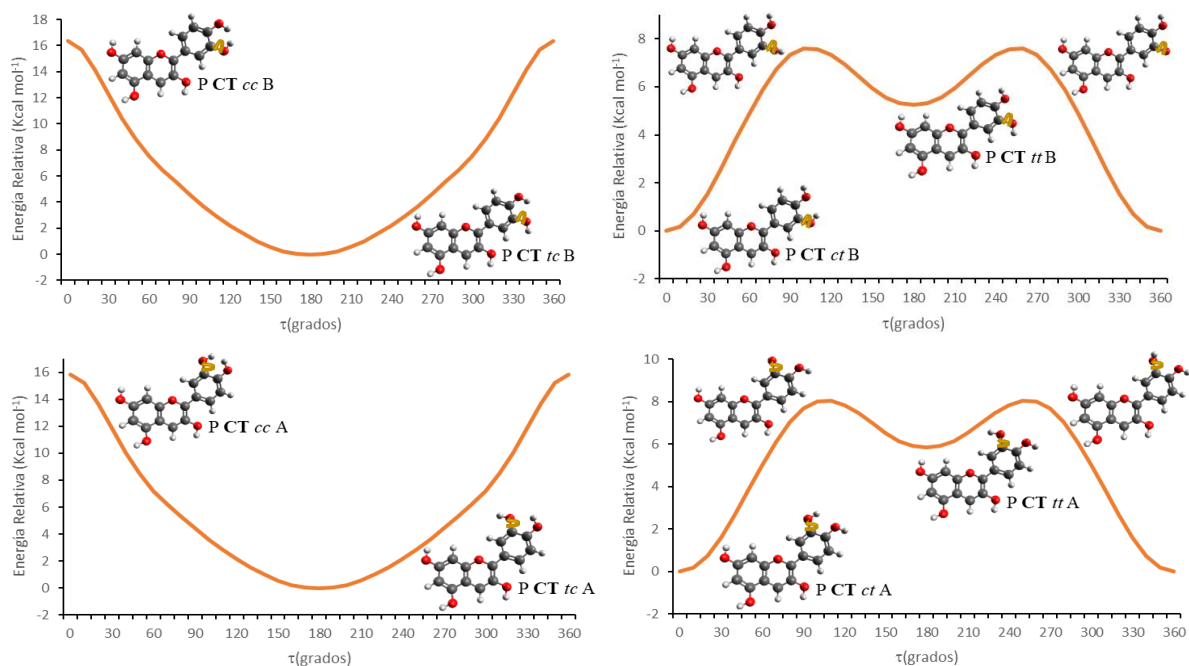


Figura 13. Energía de los conformeros cianidina **P CT tc B**, **P CT ct B**, **P CT tc A**, and **P CT ct A**, al variar el ángulo diedro C4'-C3'-O-H, describiendo la rotación del enlace O3'-H con respecto al eje del enlace C3'-O3'.

Dado que la rotación del enlace O3'-H con respecto al eje del enlace C3'-O3' para delfinidina proporcionó resultados similares a los mencionados anteriormente, se realizó un escaneo rígido desde 0° a intervalos de 10° rotando el enlace O5'-H respecto al eje del enlace C5'-O5' (variación del ángulo diedro C4'-C5'-O-H) en delfinidina (**Fig. 14**). La estructura de delfinidina **P CT ctt** alcanzó el mínimo de energía a 180° y el máximo de energía a 0°. Este comportamiento fue consistente con la explicación anterior, donde la mayor estabilidad se logró coordinando los sustituyentes en sentido de las agujas del reloj y luego aumentando la energía hasta alcanzar un pico máximo, donde se encuentra la mayor repulsión estérica con HO-4'. Por otra parte, la curva de delfinidina **P CT tcc** explica el otro comportamiento descrito anteriormente, donde el mínimo de energía se alcanza a 0° y el máximo de energía a 90° y 270°. El mínimo está relacionado con la orientación coordinada en sentido antihorario de los tres hidroxilos en el anillo B y el máximo con la ubicación de HO-5' fuera del plano del anillo B. El mínimo de energía local a 180° (**P CT tct**) proporcionó información sobre el hecho de que no sólo los efectos estéricos entre los sustituyentes juegan un papel importante, sino también que la disposición en sentido horario o antihorario estabiliza considerablemente la molécula.

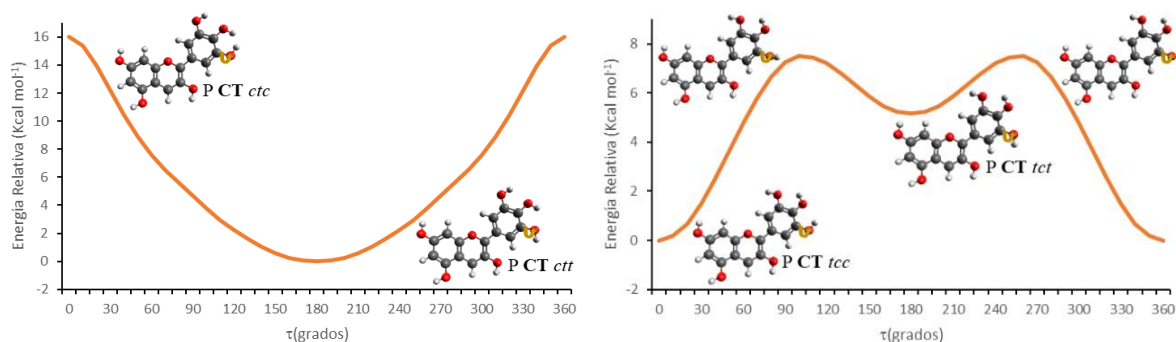


Figura 14. Energía de los conformeros delphinidina **P CT ctt** y **P CT tcc**, al variar el ángulo diedro $C4'-C5'-O-H$, describiendo la rotación del enlace $O5'-H$ con respecto al eje del enlace $C5'-O5'$.

Este minucioso análisis también se realizó para las conformaciones no planas, tomando como estructuras de partida las de menor energía en cada caso. Luego de este análisis, se encontró el conjunto de conformeros no planos que constituyen el espacio conformacional para cada antocianidina en estudio.

Teniendo en cuenta los puntos de partida y las estructuras de mínima energía encontradas, este análisis del espacio conformacional condujo a los siguientes conformeros (estructuras de mínima energía, respaldadas por la ausencia de frecuencias imaginarias). Veinte para pelargonidina (**P CT d**, **P CT u**, **P CC d**, **P CC u**, **Z1 CT d**, **Z2 CT d**, **Z1 CT u**, **Z2 CT u**, **Z1 CC u**, **Z2 CC u**, **Z1 CC d**, **Z2 CC d**, **Z1 TC u**, **Z2 TC u**, **Z1 TC d**, **Z2 TC d**, **Z1 TT d**, **Z2 TT d**, **Z1 TT u**, y **Z2 TT u**), sesenta para cianidina (**P CT tc B**, **P CT ct A**, **P CT tc A**, **P CC tc B**, **P CC tc A**, **P CC ct A**, **P CT ct B**, **P CC ct B**, **Z1 CT ct A**, **Z2 CT ct A**, **Z1 CT ct B**, **Z2 CT ct B**, **Z2 CT tc A**, **Z1 CT tc A**, **Z1 CC ct A**, **Z2 CC ct A**, **Z1 CC ct B**, **Z2 CC ct B**, **Z1 CC tc A**, **Z2 CC tc A**, **Z2 CT tc B**, **Z1 CT tc B**, **Z1 CC tc B**, **Z2 CC tc B**, **P CT tt A**, **P CT tt B**, **P CC tt A**, **P CC tt B**, **Z1 TC ct B**, **Z2 TC ct B**, **Z1 TC ct A**, **Z2 TC ct A**, **Z1 TC tc A**, **Z2 TC tc A**, **Z1 TT ct A**, **Z2 TT ct A**, **Z1 TC tc B**, **Z2 TC tc B**, **Z1 CT tt A**, **Z2 CT tt A**, **Z1 TT ct B**, **Z2 TT ct B**, **Z1 CC tt A**, **Z2 CC tt A**, **Z2 TT tc A**, **Z1 TT tc A**, **Z1 CT tt B**, **Z2 CT tt B**, **Z1 TT tc B**, **Z2 TT tc B**, **Z1 CC tt B**, **Z2 CC tt B**, **Z1 TC tt A**, **Z2 TC tt A**, **Z1 TC tt B**, **Z2 TC tt B**, **Z1 TT tt A**, **Z2 TT tt A**, **Z2 TT tt B**, y **Z1 TT tt B**) y treinta y siete para delphinidina (**P CT ctt**, **P CC ctt**, **P CT tcc**, **P CC tcc**, **Z1 CT tcc**, **Z2 CT tcc**, **Z2 CT ctt**, **Z1 CT ctt**, **Z1 CC tcc**, **Z2 CC tcc**, **Z1 CC ctt**, **Z2 CC ctt**, **P CC ttt**, **P CT tct**, **P CC tct**, **Z2 TC tcc**, **Z1 TC tcc**, **Z1 TC ctt**, **Z2 TC ctt**, **Z1 TT tcc**, **Z2 TT tcc**, **Z1 TT ctt**, **Z2 TT ctt**, **Z1 CT tct**, **Z2 CT tct**, **Z1 CC ttt**, **Z2 CC ttt**, **Z1 CC tct**, **Z2 CC tct**, **Z2 TC tct**, **Z1 TC tct**, **Z1 TC ttt**, **Z2 TC ttt**, **Z1 TT ttt**, **Z2 TT ttt**, **Z2 TT tct**, y **Z1 TT tct**), enumeradas en orden decreciente de estabilidad. De todos los conformeros encontrados, sólo nueve han sido

informados previamente para pelargonidina (P CT *d*, P CT *u*, P CC *d*, P CC *u*, Z1 CT *d*, Z1 CC *d*, Z2 CC *d*, Z1 TC *u*, y Z1 TT *u*), seis para cianidina (P CT *ct A*, P CC *ct A*, P CT *tt A*, Z1 CT *ct A*, Z1 TC *tc A*, y Z1 TT *ct A*) y seis para delfinidina (P CT *ctt*, P CC *ctt*, P CT *tcc*, P CC *tcc*, Z1 CT *ctt*, y Z1 TT *ctt*).

3.3. Análisis geométrico

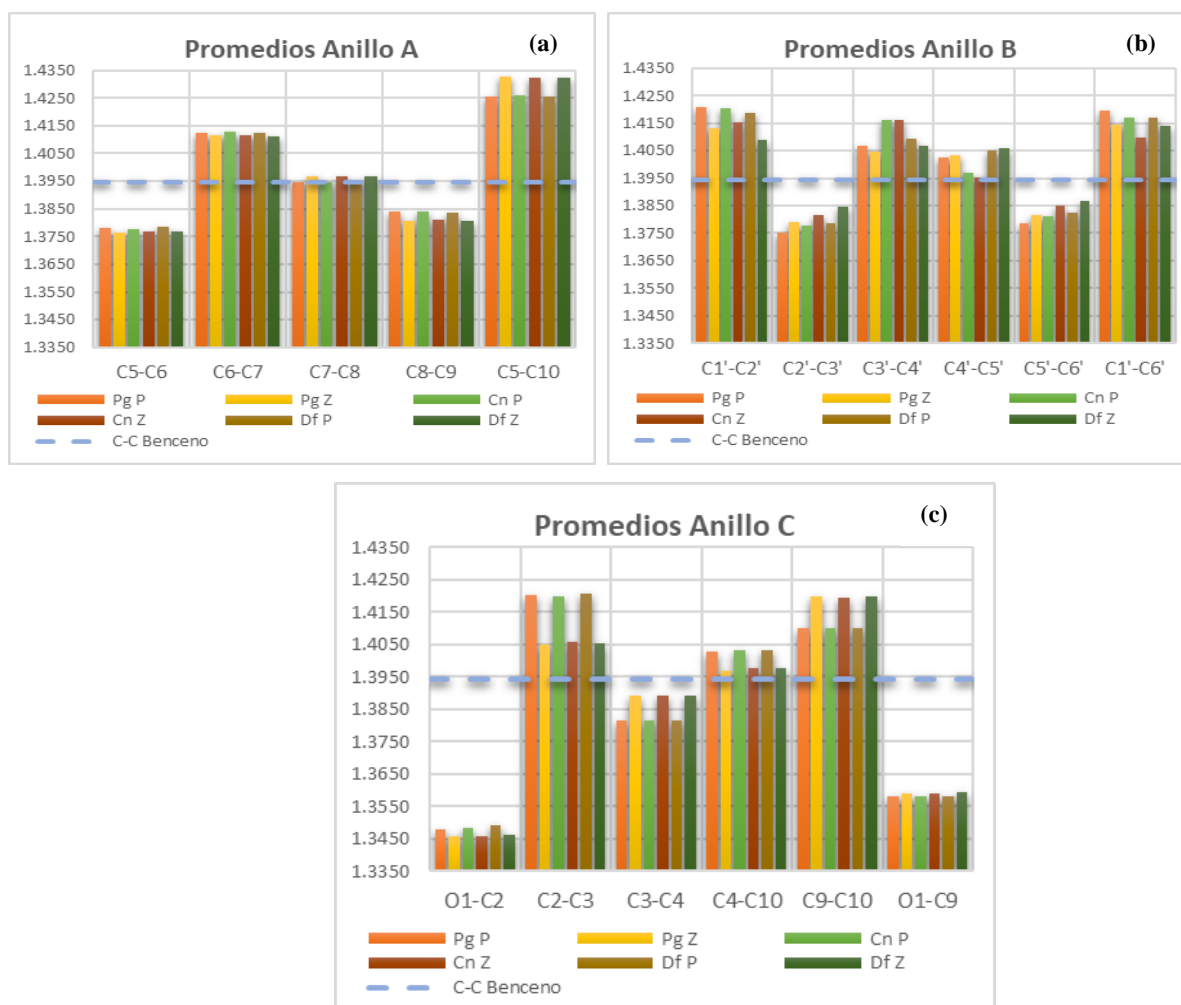
3.3.1. Distancias de enlace

Las antocianinas, junto con otros miembros de la familia de los flavonoides, contienen tres anillos aromáticos (A, B y C), en el que uno de ellos (anillo C) tiene un heteroátomo (oxígeno). Las características de estos anillos se analizaron calculando las longitudes de enlace de los átomos que los componen. Los anillos A y B de las tres antocianidinas bajo estudio arrojan longitudes de enlace más similares que el anillo C, como se muestra en la **Fig. 15 a, b y c**. También se muestran las longitudes de enlace promedio de los conformeros **P** y **Z** de pelargonidina, cianidina y delfinidina, así como la longitud de enlace C-C del benceno (~ 1.394 Å), calculada al nivel de teoría B3LYP/6-311G++(d,p). Dado que el anillo C es un heterociclo, el átomo de oxígeno altera todo el anillo, con respecto a los anillos A y B, incluyendo las longitudes de enlace. A su vez, algunos enlaces en ambos anillos A y B mostraron longitudes más cortas. Dentro del anillo A, los enlaces C5-C6 y C8-C9 eran considerablemente más cortos que los otros enlaces, oscilando entre 1,376-1,386 y 1,374-1,386 Ångstroms (Å) para pelargonidina, cianidina y delfinidina. Por el contrario, los enlaces C6-C7 y C5-C10 tenían una longitud de 1,412 a 1,433 Å para los tres compuestos.

Asimismo, las longitudes de enlace C2'-C3' y C5'-C6' del anillo B, con rangos estimados de 1,370-1,390 Å, fueron más cortas que el resto. Por el contrario, los enlaces C1'-C2' y C1'-C6' fueron los más largos, con valores entre los 1,410-1,420 Å para los tres compuestos. Las diferencias para ambos anillos A y B pueden mostrar la presencia de dos tipos distintivos de enlaces, evidenciando la pérdida de aromaticidad en comparación a un anillo de benceno. Los enlaces que involucran al átomo de oxígeno dentro del anillo C mostraron una diferencia en sus longitudes de enlace para las tres antocianidinas, siendo el enlace O1-C2 más corto que el enlace O1-C9 para todas las antocianidinas en estudio. Esta longitud de enlace no alcanzó el valor de un doble enlace aromático, pero fue menor que un enlace simple. Ambos enlaces eran diferentes, mostrando la falta de aromaticidad del anillo C. Además, C3-C4 del anillo C, era el enlace C-C de longitud más corta, con valores de aproximadamente 1,380-1,390 Å para

pelargonidina, cianidina y delfinidina. Este enlace mostró longitudes comparables a las de un doble enlace. Este hecho está de acuerdo con la representación típica de las antocianidinas, en las que existe un doble enlace entre C-3 y C-4.

Dado que las tres antocianidinas difieren en el patrón de sustitución del anillo B, se compararon las longitudes de los enlaces para distinguirlas. Los enlaces C3'-C4' y C4'-C5' fueron los más afectados por la variación del patrón de sustitución. Pelargonidina y delfinidina mostraron longitudes de enlace similares, siendo C3'-C4' ligeramente más largas. La longitud del enlace C3'-C4' mostró valores en el rango de 1,404-1,407 Å y 1,403-1,414 Å para pelargonidina y delfinidina respectivamente, mientras que C4'-C5' proporcionó rangos de 1,402-1,403 Å y 1,401-1,410 Å respectivamente. Estos datos pueden justificarse por la disposición relativamente simétrica de los sustituyentes en ambas antocianidinas. En cambio, la gran diferencia en estas longitudes de enlace para cianidina se debió a la disposición asimétrica de HO-3' y HO-4'. El enlace C3'-C4' de cianidina mostró un rango de 1,410-1,422 Å, mientras que C4'-C5' un rango de 1,392-1,401 Å.



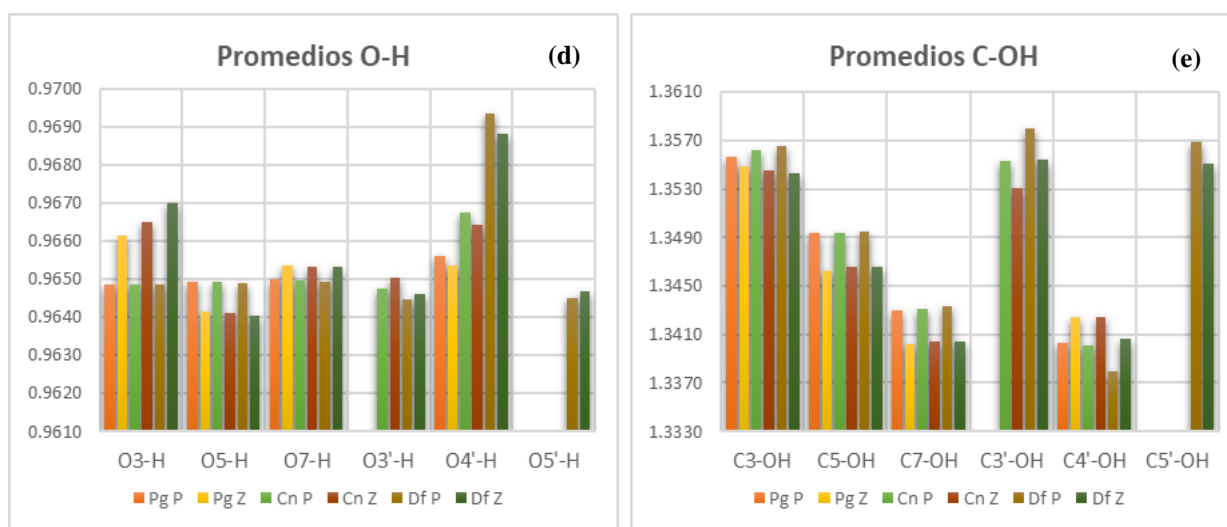


Figura 15. Promedios de las longitudes de los enlaces C-C en el anillo A (a), C-C en el anillo B (b), C-C en el anillo C (c), O-H (d) y C-OH (e), para los conformeros **P** y **Z** en pelargonidina, cianidina y delfinidina. Longitud del enlace C-C para el benceno (~1,394 Å) calculada al mismo nivel de teoría B3LYP/6-311G++(d,p).

También se analizaron las longitudes de los enlaces C-H. Los valores de mayor interés para el análisis fueron la posición 6' de pelargonidina y delfinidina, así como las posiciones 2' y 6' de cianidina. Estas longitudes de enlace mostraron los valores más bajos, lo que respalda la mayor estabilidad de estos enlaces. Para pelargonidina y delfinidina, H-6' se encuentra próximo al HO-3 del anillo C. En cianidina, los conformeros **A** también mostraron esta disposición, obteniéndose para la posición 2' en los conformeros **B**. Por lo tanto, es probable que exista un puente de hidrógeno entre H-2' y/o H-6' y el O del HO-3, favorecido por la formación de un anillo de seis miembros [37,38].

3.3.2. Ángulos de enlace

Los ángulos de enlace son otro tema de interés dentro de la estructura de las antocianidinas, pudiendo brindar información sobre el grado de aromaticidad en los tres anillos, siendo un anillo aromático conformado por ángulos de enlace típicos de 120° debido a la hibridación sp^2 en sus átomos de carbono. Sin embargo, ninguna de las tres antocianidinas presenta ángulos de enlace de 120° en alguno de sus anillos. Las desviaciones de 120° fueron, en promedio, de hasta $5,50^\circ$ para el anillo C, $3,60^\circ$ para el anillo A y $2,30^\circ$ para el B ($2,27^\circ$ en pelargonidina, $1,87^\circ$ en cianidina y $1,50^\circ$ en delfinidina).

El anillo B resultó ser el de mayor similitud respecto a un anillo aromático, donde el ángulo C6'-C1'-C2' mostró mayor desviación que los demás ángulos del anillo, tanto para los conformeros **P** como **Z** de pelargonidina ($\sim 2,29^\circ$ y $\sim 1,74^\circ$ respectivamente) y cianidina ($\sim 1,87^\circ$ y $\sim 1,38^\circ$ respectivamente). En cuanto a delfinidina, el ángulo C4'-C5'-C6' presentó la mayor variación ($\sim 1,49^\circ$ para **P** y $\sim 1,28^\circ$ para **Z**). Con respecto al anillo C, el ángulo C9-O1-C2 mostró la mayor variación tanto para los conformeros **P** como **Z** de los tres compuestos. Las mayores desviaciones para este ángulo fueron $\sim 5,43^\circ$ para **P** de pelargonidina, $\sim 4,47^\circ$ para **Z** de pelargonidina, $\sim 5,49^\circ$ para **P** de cianidina, $\sim 5,46^\circ$ para **Z** de cianidina, $\sim 5,51^\circ$ para **P** de delfinidina y $\sim 4,06^\circ$ para **Z** de delfinidina. Finalmente, para el anillo A, el ángulo C8-C9-C10 mostró la mayor variación para las tres antocianidinas, con valores similares para los conformeros **P** y **Z** ($\sim 3,65^\circ$ para pelargonidina, $\sim 3,59^\circ$ para cianidina y $\sim 3,58^\circ$ para delfinidina).

La disposición espacial del patrón de sustitución 3,5,7 de las tres antocianidinas también se relacionó con los ángulos de enlace, en particular los ángulos C3-O-H, C5-O-H y C7-O-H. Para las estructuras planas, el ángulo C3-O-H fue el de menor valor para los tres compuestos ($\sim 111,1^\circ$), seguido de C5-O-H ($\sim 111,7^\circ$), y finalmente, C7-O-H ($\sim 112,0^\circ$). En particular, para pelargonidina, el ángulo C3-O-H de los conformeros *d* fue ligeramente menor ($\sim 111,2^\circ$) que el de los conformeros *u* ($\sim 111,4^\circ$). Asimismo, los conformeros *ct* y *tt* para **A** de cianidina y los conformeros *tc* y *tt* para **B** mostraron los menores valores ($\sim 110,8^\circ$) del ángulo C3-O-H. En delfinidina, los conformeros *ctt*, *tct* y *ttt* tuvieron valores más bajos ($\sim 110,7^\circ$) que el conformero *tcc* ($\sim 111,1^\circ$). **Como aspecto común para las tres antocianidinas, los conformeros más estables resultaron ser aquellos con los grupos HO del anillo B espacialmente orientados cerca del HO-3 del anillo C. Esto sugirió algún tipo de interacción a larga distancia o efecto estructural entre estos sustituyentes, favoreciendo el acortamiento de este ángulo de enlace.**

En el anillo A de tipo resorcinol, los ángulos C5-O-H y C7-O-H mostraron valores dependientes en función de su orientación espacial. Para las tres antocianidinas, el ángulo C5-O-H fue ligeramente menor que C7-O-H. Los ángulos C5-O-H y C7-O-H para las conformaciones **CT** fueron más bajos ($\sim 111,6^\circ$ y $\sim 111,9^\circ$) que para **CC** ($\sim 111,9^\circ$ y $\sim 112,1^\circ$) para las tres antocianidinas probablemente debido a la deslocalización de electrones y efectos estéricos.

En el anillo B, dado que la cianidina tiene dos sustituyentes vecinos (HO-3' y HO-4'), otras interacciones y efectos pueden modificar estructuralmente esta subestructura

de la molécula. Para las estructuras planas, la conformación *tt* del anillo B mostró valores de ángulos similares para C3'-OH y C4'-OH ($\sim 110,0^\circ$ y $\sim 111,3^\circ$ respectivamente). Pero esto cambió cuando los sustituyentes se orientaron de manera coordinada, como los arreglos espaciales *ct* y *tc*. Para los conformeros *ct* del anillo B, el ángulo C4'-OH fue considerablemente mayor ($\sim 112,4^\circ$) que C3'-OH ($\sim 110,0^\circ$), mientras que para los conformeros *tc* fue inverso, donde el ángulo C4'-OH ($\sim 110,0^\circ$) fue menor a C3'-OH ($\sim 112,4^\circ$). **Este comportamiento puede explicarse por interacciones intramoleculares de tipo puente de hidrógeno, como C4'-O---H-O-C3' para los conformeros *ct* y C3'-O---H-O-C4' para los conformeros *tc*.**

Estos resultados del estudio geométrico-conformacional están de acuerdo con lo que informamos anteriormente [32–36,43]. Los anillos que involucran estructuras de tipo catecol y pirogalol mostraron interacciones intramoleculares y efectos de deslocalización de carga debido a la presencia de sustituyentes OH.

Este comportamiento también se encontró en los conformeros de delfinidina, pudiéndose dividir en dos grupos según la orientación de los tres sustituyentes del anillo B. El primer grupo representa los conformeros con sus sustituyentes orientados coordinadamente (**CC *ctt*, CC *tcc*, CT *ctt* y CT *tcc***). Los arreglos *ctt* mostraron una coordinación en sentido horario, en donde los ángulos C3'-O-H y C4'-O-H fueron considerablemente menores ($\sim 110,1^\circ$ y $\sim 110,4^\circ$ respectivamente) respecto al ángulo C5'-O-H ($\sim 112,3^\circ$). De acuerdo con lo expresado para cianidina, **esta disminución del ángulo puede deberse a interacciones de tipo puente de hidrógeno**, como C3'-O--H-O-C4' y C4'-O---H-O-C5'.

El segundo grupo representa los conformeros *tcc* con una coordinación antihoraria, siendo los ángulos C4'-O-H y C5'-O-H menores ($\sim 110,4^\circ$ y $\sim 110,1^\circ$ respectivamente) respecto al ángulo C3'-O-H ($\sim 112,2^\circ$). Por lo tanto, las interacciones de tipo puente de hidrógeno fueron C4'-O---H-O-C3' y C5'-O---H-O-C4', lo que provocó una disminución en los ángulos C4'-OH y C5'-OH.

En los arreglos no coordinados (**CC *tct*, CC *ttt* y CT *tct***), los tres sustituyentes mostraron diferentes ángulos de enlace. El ángulo C5'-O-H para los conformeros *tct* ($\sim 111,2^\circ$) y el ángulo C3'-O-H para los *ttt* ($\sim 111,1^\circ$) son opuestos a los otros dos sustituyentes, impidiendo la formación de puentes de hidrógeno. Además, se podría generar cierta repulsión entre los orbitales *n* de los electrones libres en los oxígenos vecinos, viéndose una disminución en los ángulos de enlace C4'-O-H respecto a pelargonidina ($\sim 111,7^\circ$) (con un único sustituyente en 4').

El HO-4' se coordina con el ángulo de enlace C3'-O-H para conformeros *tct* y con C5'-O-H para *ttt*. Como era de esperar, se obtiene un menor ángulo de enlace para C4'-O-H (~109,6°) respecto a C3'-O-H y C5'-O-H, como también a los valores discutidos previamente. La existencia de posibles puentes de hidrógeno, como C3'-O---H-O-C4' para los conformeros *tct* y C5'-O---HO-C4' para el conformero *ttt*, junto a la repulsión entre los orbitales *n* de oxígenos vecinos, permite explicar la disminución de este ángulo de enlace. Por otro lado, estos efectos muestran un aumento en los ángulos de enlace C3'-OH para los conformeros *tct* y C5'-OH para el conformero *ttt* respecto a los de C4'-OH.

Los ángulos diedros de las estructuras de menor energía (conformeros **P**) indicaron la coplanaridad tanto de los tres anillos A-C-B, como de los sustituyentes OH, con ángulos cercanos a cero (0,00° o 180,00°). Cuando el anillo B sale del plano (conformeros **Z1** y **Z2**), los ángulos diedros para los anillos A, B y C tienen valores distintos de 0°, indicando torsiones en los mismos. Los conformeros **Z1** y **Z2** presentan torsiones opuestas, pero de igual magnitud en valor absoluto. El anillo C es el que presenta la mayor torsión, seguido del B y finalmente el A.

Esta pérdida de planaridad explica la existencia de nuevos conformeros de tipo **Z**, llamados **Z***, los cuales no poseen correlatos planos; por ejemplo, **Z1 TC d**, **Z2 TC d**, **Z1 TC u**, **Z2 TC u**, **Z1 TT d**, **Z2 TT d**, **Z1 TT u** y **Z2 TT u** para pelargonidina. Estos conformeros **Z***, como era de esperar, mostraron mayor torsión.

4. Conclusiones

El estudio de las tres antocianidinas en todo el espacio conformacional condujo a veinte conformeros de mínima energía para pelargonidina, sesenta para cianidina y treinta y siete para delfinidina. Se identificaron conformeros planos y no planos dentro del espacio conformacional de cada compuesto.

El posterior análisis estructural de los conformeros encontrados permitió conocer en detalle aspectos geométricos dentro la estructura común entre las tres antocianidinas. Estas variaciones en el patrón de sustitución dentro del anillo B generaron cambios a corto y largo alcance dentro del esqueleto carbonado de las diferentes agliconas. Gracias a este estudio, se conoce en detalle la flexibilidad del espacio conformacional, brindando características detalladas de la torsión molecular presentada por estas tres antocianidinas.

En base al minucioso análisis geométrico, se sugirieron interacciones del tipo puente de hidrógeno entre los diferentes sustituyentes hidroxilos en el anillo B. Por otro lado, las distancias de enlaces encontradas para los diferentes conformeros muestran un apartamiento estructural respecto a la representación común de este tipo de compuestos como sal de oxonio. No en todos los conformeros se muestra al enlace C3-C4 con carácter doble. Por otro lado, las distancias de enlaces C2'-C3' y C5'-C6' inferiores a la distancia de enlace C-C del benceno, siendo cercanas a enlaces de carácter doble, dan lugar a otro tipo de representación para este grupo de compuestos alejada a la de un anillo aromático regular.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación de Argentina por las instalaciones de la biblioteca electrónica. N.A.S. agradece al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) de Argentina por una beca de investigación. A.B.P. y P.R.D. son Miembros Investigadores del CONICET.

Se agradece el financiamiento del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET, Argentina) (PRD; subsidio PIP0311) y de la Secretaría General de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional del Nordeste (Corrientes, Argentina) (RML; subsidio 17F012).

Referencias

1. Delgado-Vargas F., Jiménez A.R., Paredes-López O., et al. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2000**; 40 (3), 173–289.
2. Khoo H.E., Azlan A., Tang S.T., et al. *Food Nutr. Res.* **2017**; 61, 1361779.
3. Alvarez-Suarez J.M., Giampieri F., Tulipani S., et al. *J. Nutr. Biochem.* **2014**; 25 (3), 289–294.
4. Cerletti C., De Curtis A., Bracone F., et al. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2017**; 83 (1), 103–106.
5. Wu T., Yu Z., Tang Q., et al. *Food Funct.* **2013**; 4 (11), 1654–1661.
6. Li D., Zhang Y., Liu Y., et al. *J. Nutr.* **2015**; 145 (4), 742–748.
7. Pomilio A.B., Szewczuk N.A., Duchowicz P.R. Dietary anthocyanins balance immune signs in osteoarthritis and obesity—Update of human *in vitro* studies and clinical trials. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **2022**. Publicado online: 23 Sep 2022. doi: [10.1080/10408398.2022.2124948](https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2124948).
8. Ames B.N., Shigenaga M.K., Hagen T.M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**; 90 (17), 7915–7922.
9. Nikkhah E., Khayami M., Heidari R. *Int. J. Cancer Manag. (Iranian J. Cancer Prev.)* **2008**; 1 (4), 167–172.
10. Ali T., Kim T., Rehman S.U., et al. *Mol. Neurobiol.* **2018**; 55 (7), 6076–6093.
11. Lila M.A. *J. Biomed. Biotechnol.* **2004**; 5 (2004), 306–313.
12. Bobe G., Wang B., Seeram N.P., et al. *J. Agric. Food Chem.* **2006**; 54 (25), 9322–9328.
13. Bishayee A., Haskell Y., Do C., et al. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2015**; 56 (10), 1753–1775.
14. Lin B.W., Gong C.C., Song H.F., et al. *Br. J. Pharmacol.* **2017**; 174 (11), 1226–1243.
15. Mercader A.G., Pomilio A.B. *Biflavonoids: Occurrence, Structural Features and Bioactivity*. Nova Science Publishers, Inc., New York, **2011**. ISBN: 978-1-62100-354-0.
16. Mercader A.G., Pomilio A.B. *Curr. Med. Chem.* **2012**; 19 (25), 4324–4347.
17. Mercader A.G., Pomilio A.B. *Anticancer. Agents Med. Chem.* **2013**; 13 (8), 1217–1235.
18. Pomilio A.B., Mercader A.G. Natural acylated anthocyanins and other related

- flavonoids: structure elucidation of *Ipomoea cairica* compounds and QSAR studies including multidrug resistance. In: *Studies in Natural Products Chemistry*; Elsevier: Amsterdam, **2018**; Vol.55, pp 293–322.
19. Mercader A.G., Pomilio A.B. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**; 45 (5), 1724–1730.
 - 20.) Mercader A.G., Pomilio A.B. *Anti-Infective Agents* **2012**; 10 (1), 41–54.
 21. Duchowicz P.R., Goodarzi M., Ocsachoque M.A., *et al.* *Sci. Total Environ.* **2009**; 408 (2), 277–285.
 22. Romanelli G.P., Virla E.G., Duchowicz P.R., *et al.* *J. Agric. Food Chem.* **2010**; 58 (10), 6290–6295.
 23. Duchowicz P.R., Vitale M.G., Castro E.A., *et al.* *Eur. J. Med. Chem.* **2008**; 43 (8), 1593–1602.
 24. Goodarzi M., Duchowicz P.R., Wu C.H., *et al.* *J. Chem. Inf. Model.* **2009**; 49 (6), 1475–1485.
 25. Mercader A.G., Duchowicz P.R., Fernández F.M., *et al.* *Bioorganic Med. Chem.* **2008**; 16 (15), 7470–7476.
 26. Lobayan R.M., Jubert A.H., Vitale M.G., *et al.* *J. Mol. Model.* **2009**; 15 (5), 537–550.
 27. Bentz E.N., Jubert A.H., Pomilio A.B., *et al.* *J. Mol. Model.* **2010**; 16 (12), 1895–1909.
 28. Lobayan R.M., Bentz E.N., Jubert A.H., *et al.* *J. Mol. Model.* **2012**; 18 (4), 1667–1676.
 29. Lobayan R.M., Bentz E.N., Jubert A.H., *et al.* *Comput. Theor. Chem.* **2013**; 1006, 37–46.
 30. Bentz E.N., Pomilio A.B., Lobayan R.M. *J. Mol. Model.* **2014**; 20 (2), 2105–2118.
 31. Bentz E.N., Pomilio A.B., Lobayan R.M. *J. Mol. Model.* **2014**; 20 (12), 2522.
 32. Bentz E.N., Pomilio A.B., Lobayan R.M. *J. Mol. Model.* **2016**; 22 (8), 187.
 33. Bentz E.N., Pomilio A.B., Lobayan R.M. *Comput. Theor. Chem.* **2017**; 1110, 14–24.
 34. Lobayan R.M., Bentz E.N., Pomilio A.B. *Estudio Cuántico Molecular de Flavanos Como Antioxidantes Potenciales. Estructuras, Reactividad, Distribución Electrónica y Efectos de Deslocalización*. Editorial Académica Española, OmniScriptum GmbH & Co. KG, 66111 Saarbrücken, Alemania, **2020**. 292 pp. ISBN: 978-620-0-37445-5.
 35. Duchowicz P.R., Szewczuk N.A., Pomilio A.B. *J. Food Sci. Technol.* **2019**; 56 (12), 5518–5530.
 36. Szewczuk N.A., Duchowicz P.R., Pomilio A.B. *Int. J. Quant. Struct. Relationships* **2020**; 5 (4), 69–82.
 37. Pereira G.K., Donate P.M., Galembeck S.E. *J. Mol. Struct. THEOCHEM* **1996**; 363 (1), 87–96.
 38. Pereira G.K., Donate P.M., Galembeck S.E. *J. Mol. Struct. THEOCHEM* **1997**; 392 (1–3), 169–179.
 39. Barone V., Ferretti A., Pino I. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**; 14 (46), 16130–16137.
 40. Meyer M. *Int. J. Quantum Chem.* **2000**; 76 (6), 724–732.
 41. Torskangerpoll K., Børve K.J., Andersen Ø.M., *et al.* *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **1999**; 55 (4), 761–771.
 42. Woodford J.N. *Chem. Phys. Lett.* **2005**; 410 (4–6), 182–187.
 43. Szewczuk N.A., Duchowicz P.R., Pomilio A.B., *et al.* *J. Mol. Model.* **2023**; 29 (1), 2.
 44. Frisch M.J., Trucks G.W., Schlegel H.B., *et al.* Gaussian 09, **2009**. <https://gaussian.com/>.
 45. Becke, A. D. *J. Chem. Phys.* **1993**; 98 (7), 5648–5652.
 46. Lee C., Yang W., Parr R.G. *Phys. Rev. B* **1988**; 37 (2), 785–789.
 47. Favre H.A., Powell W.H. *Nomenclature of Organic Chemistry: IUPAC Recommendations and Preferred Names 2013*, **2014**.

Contents

Vol. 109 N° 1-2, January-December 2022

CONTENT	Page
Editorial.....	4
QSAR study of the acute toxicity of pesticides in the earthworm <i>Eisenia foetida</i>	5-19
<i>Pablo R. Duchowicz, Daniel O. Bennardi, and José F. Aranda</i>	
Synthesis and characterization of doped nanocrystalline SnO ₂ applied in high sensitivity gas sensors to detect ppm of H ₂ S (g) in air.....	20-38
<i>M. P. Poiasina, M. F. Bianchetti, E. Heredia, H. Canepa, and N. E. Walsøe de Reca</i>	
Structural and spectroscopic properties of some triple metal Oxalates.....	39-45
<i>María M. Torres, Daniel Palacios, Vicente L. Barone, Ana C. González-Baró, and Enrique J. Baran</i>	
Evaluation of the resistance to corrosion of Ni-W alloys electrodeposited on carbon steel in a medium containing chloride anions.....	46-56
<i>Gerardo R. Ocampo, Facundo E. Herrera, Patricio A. Orrillo, and Susana B. Ribotta</i>	
Plasma biomarkers for diagnosis and progression of Alzheimer's disease by mass spectrometry.....	57-89
<i>Alicia B. Pomilio, Arturo A. Vitale, and Alberto J. Lazarowski</i>	
Synthesis and reactivity of glutaraldehyde diperoxide in isopropanol solution.....	90-101
<i>Alexander G. Bordón, María J. Jorge, Lilian C. Jorge, Mariela I. Profeta, Jorge M. Romero, and Nelly L. Jorge</i>	
Structural and conformational study of anthocyanins: pelargonidia, cyanidin and delphinidin.....	102-122
<i>Nicolas A. Szewczuk, Rosana M. Lobayan, Pablo R. Duchowicz, and Alicia B. Pomilio</i>	