



UNIVERSIDAD
DE LOS ANDES
Mérida - Venezuela

ISSN: 1856-5301

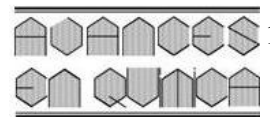
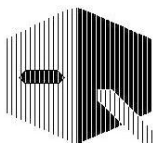
Avances en Química

Volumen 16

Número 1

Año 2021





Comité editorial

Dra. Marcela Pascu de Burguera

Universidad de Los Andes,
Facultad de Ciencias, Departamento
de Química. Laboratorio de Espectros-
copia Molecular. Mérida 5101, Vene-
zuela.

pascu@ula.ve

Dr. Issa Katime Amashta

Universidad del País Vasco.
Grupo de Nuevos Materiales. Apartado
Postal 644, Bilbao, España.

issa.katime@ehu.es

Dr. Wilmer Olivares

Universidad de Los Andes,
Facultad de Ciencias, Departamento
de Química. Grupo de Química Teóri-
ca. Mérida 5101, Venezuela.

wilmer@ula.ve

Dr. Jairo Márquez.

Universidad de Los Andes,
Facultad de Ciencias, Departamento
de Química. Laboratorio de Electro-
química. Mérida 5101, Venezuela.

jamar@ula.ve

Dr. Enrique Millán Barrios

Universidad de Los Andes,
Facultad de Ciencias, Departamento
de Química. Laboratorio de Electro-
química. Mérida 5101, Venezuela.

ejmb@ula.ve

Editor Jefe

Dr. Cristóbal Lárez Velásquez

Universidad de Los Andes,
Facultad de Ciencias, Departamento
de Química, Grupo de Polímeros.
Mérida 5101, Venezuela

Teléfono: 0058-274-2401381

Fax: 0058-274-2401286

e-mail: clarez@ula.ve

La resiliencia de Avances en Química

Cristóbal Lárez Velásquez
Editor Jefe, Avances en Química

La resiliencia, o la entereza, es un concepto que según la RAE tiene al menos dos acepciones: (i) capacidad de adaptación de un ser vivo frente a un agente perturbador o un estado o situación de adversidad, (ii) capacidad de un material, mecanismo o sistema para recuperar su estado inicial cuando ha cesado la perturbación a la que había estado sometido. La continuidad de nuestra revista a lo largo de 16 años denota que ésta posee una gran resiliencia si se considera la primera acepción, debido a que ha logrado adaptarse a muchos de los agentes que han perturbado su accionar. Un ejemplo claro de esta capacidad lo constituye su supervivencia a pesar del deterioro gigantesco del entorno donde habitualmente se desarrollaban físicamente sus principales tareas. Y aunque esto pudiera parecer un logro menor, comparto una fotografía de la realidad actual del último piso de la Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, parte del Departamento de Química, donde se ubicaba hasta el año 2013 el extinto equipo de computación que permitía realizar nuestro trabajo editorial. El sitio está prácticamente abandonado, con mucho excremento de palomas y murciélagos, y dista mucho del aspecto que tenían las diversas reuniones de cientos de jóvenes de nuestra región y del país que buscaban acercarse a la ciencia, bien por curiosidad o por ganas de formarse en esta área del saber humano, tan indispensable en la actualidad, como lo ha demostrado la pandemia del SARS-COV-19.



Y si lo anterior pareciera ser una gran calamidad, es preciso entender que en verdad se trata de una las menores adversidades que atravesamos. Entre muchas de las dificultades importantes podemos mencionar, por ejemplo, los robos continuados y el deterioro de todos los equipos e instrumentos de investigación de la Facultad, alguno de los cuales fueron en su momento orgullo de esta comunidad, como los daños irreversibles del equipo de resonancia magnética nuclear de 400 MHz (a pesar de la lucha titánica de algunos de sus responsables), la inexistencia de una política gubernamental de reposición de material fungible y reactivos (la única vez que se hizo algo no se consultó a los laboratorios y luego se dotaron con materiales y equipos poco relacionados a su actividad), la pérdida de cepas de microorganismos (que fueron mantenidas por sus responsables hasta donde pudieron con un esfuerzo digno de elogios), etc. Todo ello debido a la recontra continuada carencia de presupuesto para desarrollar proyectos que, entre otras cosas, llevaban a la graduación de un lote grande de nuevos profesionales en el área. Sin embargo, lo que realmente puede catalogarse como grave es la migración hacia otras latitudes del personal de alto nivel que daba vida y reconocimiento a esta Facultad, que al igual que el personal de otras facultades de la Universidad de Los Andes y de otras universidades autónomas del país, han huido del hambre y la miseria a la que hemos sido sometidos por muchos años. Igualmente, la retirada forzada de un estudiantado entusiasta (que constituía la esperanza de una generación de relevo de buen nivel académico) para buscar comida y ayudar a sus familiares, es también igual de peligrosa. ¿Quiénes tendrán en algunos pocos años la preparación técnico-científica para valorar con patriotismo los recursos que posee el país? No hay que ser clarividente para saber que no lo harán los socios internacionales de los gobernantes de turno. Tales recursos serán, de nuevo, cambiados por baratijas; pero no por espejitos como hace algunos pocos siglos, sino por teléfonos o sistemas de comunicación más inteligentes que los usuarios locales de esa época: los hijos y los nietos de los que quedamos acá. Por ello, es necesario insistir en el llamado a invertir en educación, especialmente en la relacionada con el desarrollo de la ciencia y las nuevas tecnologías, con énfasis en la investigación de sistemas sustentables. Es la única vía que puede llevarnos, al menos, a no perder el paso impuesto por las naciones que luchan por establecerse o mantenerse como potencias dominantes.

Continúa en la página siguiente

En relación a la segunda acepción del término, es difícil predecir si **Avances en Química** logrará recuperar su estado inicial cuando hayan cesado las graves perturbaciones actuales. La dificultad para esta predicción surge de la incertidumbre política existente en el país, la cual no permite vislumbrar a corto plazo el retorno a las condiciones económicas de años anteriores, las cuales si permitieron lograr una educación gratuita y de verdadera calidad, que incluía la creación y sostenimiento de revistas científicas en idioma español, como **Avances en Química**, para el beneficio de investigadores y estudiantes no solo del país sino de la región iberoamericana.

Como muestra de la resiliencia de **Avances en Química** durante su corta existencia de 15 años se presentan en la tabla 1 los datos relacionados con el número de citas de sus artículos, los cuales indican que sus artículos han recibido a la fecha un promedio de 3,56 citaciones cuando se considera todos los artículos publicados y 4,06 citaciones si se consideran solo los artículos citables. Igualmente, la tabla 2 permite establecer que a pesar de las duras condiciones económicas del país en los últimos años, especialmente para la Universidad venezolana, junto a las restricciones adicionales creadas por la pandemia de la COVID-19, el esfuerzo editorial realizado ha logrado mantener estable el número de artículos publicados en alrededor de 12 artículos.

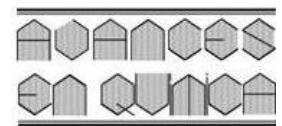
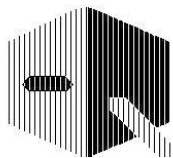
Tabla 1: Número de citas de artículos publicados en **Avances en Química** recibidas al 28/04/2021. Fuente: *Google Scholar*.

#	Artículo	Citas
1	C Lárez. Quitina y quitosano: materiales del pasado para el presente y el futuro. 1(2) , 1-15 (2006)	146
2	V Tkach, V Nechyporuk, P Yagodynets. Descripción matemática de la síntesis electroquímica de polímeros conductores en la presencia de surfactantes. 8(1) , 9-15 (2013).	38
3	DR Martínez, GG Carbajal. Hidróxidos dobles laminares: arcillas sintéticas con aplicaciones en nanotecnología. 7(1) , 87-99 (2012).	34
4	R Suarez, E Arévalo, LJ Linares, FJU Fajardo, G Hernández. Validación de un método analítico para la determinación de magnesio eritrocitario. 4(2) , 53-62 (2009).	26
5	MC Nevárez-Martínez, PJ Espinoza-Montero, FJ Quiroz-Chávez, B Ohtani. Fotocatálisis: inicio, actualidad y perspectivas a través del TiO ₂ . 12(2-3) , 45-59 (2017).	25
6	AG Martínez-Lopez, W Padrón-Hernández, OF Rodríguez-Bernal, O Chiquito-Coyotl, MA Escarola-Rosas, JM Hernández-Lara <i>et al.</i> Alternativas actuales al manejo de lixiviados. 9(1) , 37-47 (2014).	24
7	P Chacón-Morales, JM Amaro-Luis, A Bahsas. Isolation and characterization of (+)-mellein, the first isocoumarin reported in Stevia genus. 8(3) , 145-151 (2013).	22
8	L Veliz <i>et al.</i> Estudio de la hidrólisis del ion Niquel (II) y de la formación de los complejos de Niquel (II) con los ácidos Picolínico y Dipicolínico en NaCl 1,0 mol. dm ⁻³ a 25 °C. 6(1) , 3-8 (2011)	20
9	F Vargas, C Rivas, A Nursamaa, T Zoltan. Reacciones de radicales libres con relevancia biológica en la teoría del envejecimiento. 2(2) , 3-15 (2007).	18
10	A Kassim, AH Abdullah, HS Min, S Nagalingam. Influence of deposition time on the properties of chemical bath deposited manganese sulfide thin films. 5(3) , 141-145 (2010).	16
11	E Gomaa, M Hamada, R Galal. Apparent molal volumes of sodium fluoride in mixed aqueous-ethanol solvents. 5(2) , 117-121 (2010)	15
12	LE Seijas, GE Delgado, AJ Mora, A Bahsas, J Uzcátegui. Síntesis y caracterización de los derivados N-carbamoilo e hidantoina de la L-prolina. 1(2) , 3-7 (2006).	14
13	C Cabello Alvarado, A Sáenz Galindo, L Barajas Bermúdez, CM Pérez Berúmen, CA Ávila Orta, D Valdés Garza JA Romero, E Rodríguez.. Cera de candelilla y sus aplicaciones. 8(2) , 105-110 (2013)	13
14-16	3 artículos con 12 citas	36
17-18	2 artículos con 11 citas	22
19-20	2 artículos con 10 citas	20
21	1 artículo con 9 citas	9
22-26	5 artículos con 8 citas	40
27-36	10 artículos con 7 citas	70
37-47	11 artículos con 6 citas	66
48-58	11 artículos con 5 citas	55
59-74	16 artículos con 4 citas	64
75-88	14 artículos con 3 citas	42
89-114	26 artículos con 2 citas	52
115-153	39 artículos con 1 cita	39
154-228	75 artículos citables sin citas	---
229-260	32 artículos no citables sin cita	---
Total	260 artículos (228 citables)	926

Tabla 2: Total de artículos publicados por año en **Avances en Química**.

Año	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	Total
Artículos	14	16	15	16	25	16	26	24	16	28*	18	10	13	12	11	260

* Ese año se publicó adicionalmente un número especial con 8 artículos, con motivo de celebrarse el decimo aniversario de la revista.



Profesores doctores **Marcela Pascu** y **José Luís Burguera**



Dra. Marcela Pascu de Burguera



Dr. José Luís Burguera

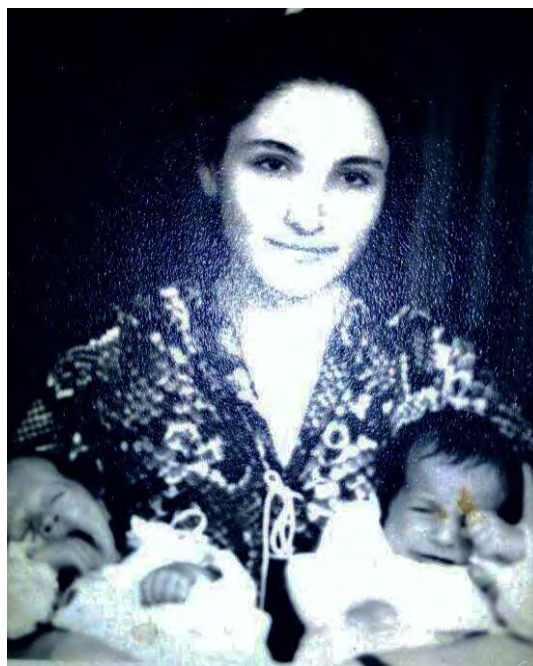
Es un gran honor el tener la oportunidad de escribir una semblanza de estas personas que dedicaron lo mejor de su vida productiva a construir nuestra Facultad de Ciencias. No es fácil acopiar y resumir todo el legado que nos han dejado con su esfuerzo y dedicación. Siempre fueron un equipo.

José Luís Burguera fue un muchacho nacido en Santa Cruz de Mora, estado Mérida, Venezuela, el 2 de junio de 1948, hijo de Elías Burguera y María E Montoya. Se graduó de Bachiller en el Liceo Libertador de la ciudad de Mérida, Venezuela y formó parte de los primeros estudiantes que ingresaron al incipiente Centro de Ciencias que dio origen a lo que hoy día es la Facultad de Ciencias. Poco tiempo después, obtuvo una beca para continuar sus estudios de licenciatura en química en la Facultad de Química, Universidad de Bucharest, Rumania.

Realizó investigaciones sobre el “Intercambio iónico de cationes orgánicos sobre zeolitas del tipo X” como tesis de Licenciatura, obteniendo el grado de Licenciado en 1973. Posteriormente, realizó una Especialidad en Química Analítica en esa misma universidad (1973-1974), realizando investigación sobre “Actividad superficial de surfactantes”, obteniendo el título de Especialista en Química Analítica. Allí conoció a una bella joven llamada Marcela Pascu y contrajeron nupcias en la iglesia ortodoxa.

Marcela Pascu nació en la población de Olari, comuna Darmanesti, estado Dambovita, Rumania, el 15 de diciembre de 1949. Hija de Constantin Pascu y Anica Pascu. Se graduó de bachiller en Ploiesti, Estado Prahova y realizó estudios de Licenciatura en la Facultad de Química de Bucharest Rumania, obteniendo el grado de Licenciada en Química en 1973. Realizó, seguidamente (1973-1974), estudios de Especialidad en Química Analítica, con el trabajo: “Determinación Polarográfica de molibdeno de en minerales”, obteniendo el título de Especialista en Química Analítica. De la unión de Marcela y José Luis, nacieron los gemelos Elías y Constantin Burguera Pascu. En esa época, coincidieron en Rumania, con los venezolanos Alí Primera y Ernesto Valiente.

A finales de 1973, la pareja Burguera Pascu, se vino a Mérida con sus hermosos gemelos y se incorporaron al personal docente y de Investigación del Departamento de Química. La Facultad se estaba comenzando a estructurar y había pocos grupos de investigación. Marcela ingresó al grupo de Cristalografía y José Luis al grupo de Electroquímica. En 1976, Marcela ingresó, por concurso, al área de Química Analítica, pero aún no existía un grupo de investigación de esa disciplina. Ese mismo año, reciben una beca de FONINVES y se matriculan en la Universidad de Birmingham, Inglaterra, para realizar estudios de postgrado. Primero obtuvieron título de maestría (M.Sc) en 1977 y luego de Doctorado (Ph.D) en 1979.





Tesis de Maestría de Marcela: Determinación de Arsénico y Silicio por Emisión Molecular en Cavidad.

Tesis de Maestría de José Luis: Determinación de Aminas por Quimioluminiscencia en Solución.

Tesis Doctoral de Marcela: Reacciones de Volatilización en Emisión Molecular en Cavidad.

Tesis Doctoral de José Luis: Métodos de análisis de trazas por quimioluminiscencia.

En 1979, los doctores Burguera Pascu regresan a Mérida y fundan el grupo de Espectroscopía Molecular (LEM). El LEM arrancó con mucho vigor y, afortunadamente, era una época de bonanza económica en Venezuela, lo cual permitió un rápido crecimiento del grupo y un excelente equipamiento. El LEM se convirtió en una referencia de trabajo en equipo y alta productividad, con énfasis en elementos trazas e incursionando en el área de Ciencias de la salud y así participan en los diferentes procesos patológicos y en el estado nutricional.



En 1980, traen al mundo una bella niña, llamada Margarita. Los tres niños crecieron y todos decidieron ser odontólogos.



Realmente han sido un gran equipo de trabajo

A grandes rasgos podría enumerarse sus líneas de investigación:

- Desarrollo de métodos y procedimientos analíticos para el análisis de diferentes tipos de muestras
- Automatización de métodos optimizados en el laboratorio para análisis de diferentes tipos de muestras
- Investigaciones de las relaciones básicas de reacciones quimioluminiscentes en llama y en solución
- Estudio sobre la Contaminación de la Región Andina (análisis de plaguicidas y metales pesados en agua, aire, suelos y muestras biológicas)
- Correlación entre el contenido de algunos elementos químicos y diferentes fases de enfermedades tropicales tales como Chagas y Leishmaniasis
- Automatización de métodos analíticos utilizando Generación de Hidruros
- Espectroscopía de Absorción Atómica
- Automatización de métodos de Preconcentración en línea en Flujo Continuo
- Automatización de métodos utilizando Cromatografía de Gases con Espectroscopía de Absorción Atómica
- Automatización de sistemas de limpieza de muestras en línea por HPLC.

Esto llevó al grupo a crear vínculos con investigadores de Medicina, Farmacia, Bioanálisis, Nutrición, entre otros de la ULA, así como colaboración con sus pares a nivel internacional y de la UCV.



La próxima fotografía muestra un aspecto social durante uno de los Congresos Nacionales de Química, celebrado en la ciudad de Mérida, compartiendo con integrantes del centro de Química Analítica de la UCV y algunos de la ULA.



En 1984, el grupo de Espectroscopia Molecular, junto con el de Electroquímica, generan un primer borrador de proyecto de postgrado con el nombre inicial de “Postgrado de Electroquímica y Espectroscopia” (comité redactor: Dres. Marcela Burguera, Olga Márquez, Jairo Márquez, José Luís Burguera). En 1986 se incorporan los grupos de Química Orgánica (Dr. Miguel Alonso) y cristalografía (Dras. Valentina Rivera y Eldrys Rodulfo de Gil) al proyecto de postgrado, presentándose finalmente al Consejo de Facultad con el nombre de “Postgrado de Química y Física” (este nombre fue rechazado por el Consejo de Facultad por estar involucrando dos departamentos), lo que finalmente dio origen al Postgrado Interdisciplinario en Química Aplicada (PIQA) en 1988, el cual está funcionando desde enero de 1989. El primer coordinador del postgrado fue el Dr. Miguel Alonso, quien, aunque no participó en la elaboración del proyecto, venía del IVIC con una experiencia en docencia de postgrado, lo cual fue de gran utilidad para el inicio del programa. El Grupo de Polímeros (Dres. Gilberto Perdomo y Hugo Martínez) se incorpora posteriormente como una opción del postgrado, lo cual evidenció la gran flexibilidad del diseño modular del

PIQA. Este proyecto ha sido uno de los grandes aportes de los doctores Burguera Pascu al desarrollo de la Química Analítica en Venezuela.

Desde 1989 hasta 1999, las opciones de Espectroscopia Molecular (del grupo de los profesores Burguera) y Electroquímica, alcanzaron un grado de desarrollo tal, que les permitió, con la aprobación del CNU, la separación de esas dos opciones como postgrados independientes, manteniendo su partida de nacimiento desde la creación del PIQA. Es así como los profesores Burguera Pascu fundan el Postgrado de Química Analítica (PQA) que está hoy día vigente en la Facultad de Ciencias de la ULA (con antigüedad a enero de 1989). El año 2005 Marcela y José Luis (como cariñosamente siempre los conocimos) tramitaron su jubilación administrativa, más no su retiro de las actividades académicas; continuaron 8 años más con labores de investigación y postgrado.

En 2018, ocurre un hecho inesperadamente doloroso en la familia Burguera Pascu, que les hizo dar un vuelco brusco a sus vidas: fallece su hijo Elías, uno de los gemelos. Eso les hace retomar la situación y se trasladan con sus otros 2 hijos y dos de sus nietos, hacia Rumania. Viven en Targoviste, Estado Dambovita, en Rumania.



Premios y reconocimientos:

Durante su trayectoria académica, recibieron numerosos premios y reconocimientos tanto a nivel nacional como internacional.

Marcela:

- Premio anual de la Asociación de Profesores de la Universidad de Los Andes (APULA) por su "*Ejemplarizante y Consagrada Actividad Docente en Pro de la Juventud Venezolana*". 29/07/1989.
- Reconocimiento del Vicerrectorado Académico de la Universidad de Los Andes por sus "*Valiosos Aportes en el Campo de la Investigación*". 1990
- Reconocimiento del Colegio de Egresados en Ciencias del Estado Mérida por sus "*Valiosos Aportes en el Campo de la Investigación*". 1991
- Premio "Dr. Francisco de Venanzi", otorgado por la Facultad de Ciencias de la Universidad de Los Andes en el área de Ciencias Químicas. 22/03/1991.
- Reconocimiento del Sistema de Promoción de la Investigación del CONICIT, Caracas como Investigador Nivel III (desde 1990) y NIVEL IV (desde 2002).
- Premio Anual del CONICIT al mejor Trabajo Científico, Área Química (mención honorífica). 17/07/1992.
- Diploma de Honor otorgado por la Universidad de Los Andes. 11/11/1992.
- Miembro del Comité Organizador y Chairman de los eventos internacionales: Flow Analysis Conference. Kumamoto, Japón, 1991; Toledo España, 1994; Piracicaba, Brasil, 1997, Varsovia, Polonia, 2000.
- Premio al mejor trabajo científico y tecnológico, mención Química, otorgado por FUNDACITE, Mérida. Año 1994.
- Miembro del Programa de Estímulo al Investigador (PEI), de la Universidad de Los Andes desde 1995.
- Reconocimiento de la Comisión Nacional de Beneficio Académico (CONABA). Nivel (Años 1997 y 2000).
- Reconocimiento por el Sistema de Promoción al Investigador del CONICIT, Caracas, como: Investigador NIVEL III (desde 1990) y NIVEL IV (desde 2002).
- Premio anual al Mejor Trabajo Científico, Área Química (mención honorífica) CONICIT-Caracas. 1992.
- Miembro del Comité Organizador y Chairman de los eventos internacionales: Flow Analysis Conference. Kumamoto, Japón, 1991; Mérida, Venezuela, 2003.
- Miembro del comité científico del evento internacional "Internacional Conference on Flow Injection Analysis". Desde 1992.
- Individuo de Número de la Academia de Mérida (Sillón No. 20). Desde 1994.
- Miembro del comité organizador del Tercer Rio Symposium, Caracas. 1994.
- Premio al mejor trabajo científico y tecnológico, mención Química, otorgado por FUNDACITE, Mérida. Año 1994.
- Miembro del Programa de Estímulo al Investigador (PEI) de la Universidad de Los Andes, en el más alto nivel desde 1995.
- Reconocimiento de la Comisión Nacional de Beneficio Académico (CONABA). Nivel I (Años 1997 y 2000).
- Miembro del Programa CONADES. En
- Premio Regional de Ciencia y Tecnología: Subvención Premio a Grupo de Investigación, otorgado por Fundacite-Mérida y Gobernación del Estado Mérida. 2002
- Orden "Dr. Tulio Febres Cordero" en su primera clase, otorgado por el Consejo Legislativo del Estado Mérida, a través de FUNDACITE-Mérida. Julio de 2004.

José Luis:

- Premio anual de la Asociación de Profesores de la Universidad de Los Andes (APULA) por su "*Ejemplarizante y Consagrada Actividad Docente en Pro de la Juventud Venezolana*". 29/07/1989.
- Reconocimiento del Vicerrectorado Académico de la Universidad de Los Andes por sus "*Valiosos Aportes en el Campo de la Investigación*". 1990
- Reconocimiento del Colegio de Egresados en Ciencias del estado Mérida por sus "*Valiosos Aportes en el Campo de la Investigación*". 1991
- Premio "Dr. Francisco de Venanzi" otorgado por la Facultad de Ciencias de la Universidad de Los Andes en el área de Ciencias Químicas. 22/03/1991.
- JL Burguera, M Burguera, MS Sampol de Reyes, R Anderssen. *Las Fuentes Termales del Estado Mérida*. Imprenta de la Facultad de Ciencias Forestales, Universidad de Los Andes, Mérida, 80 páginas (Abril 1983).
- M Burguera, JL Burguera. *Concentrations of 15 Trace Elements in Some Selected Adult Human Tissues and Body Fluids of Clinical Interest from Several Countries*. Institute of Medicine, Julich Nuclear Research Center, F.R. Germany, ISSN 0366-0885 (1985)
- M Burguera, JL Burguera. Trends of Flow Injection-Atomic Spectroscopy. En: *Flow Injection Atomic Spectroscopy*, JL Burguera (Editor), Chapter 8, M. Dekker, New York (1989).
- M Burguera. *Manual de laboratorio de Química Analítica Cuantitativa*. Publicaciones Facultad de Ciencias, U L A, 176 páginas (1990).

- M Burguera, JL Burguera. Arsenic, Antimony, Boron, Silicon, Germanium and Tin. En: *Molecular Emission Cavity Analysis*. Chemical Analysis Series, A Townsend, D Stiles, AC Calokerinos (Editores), Chapter 5. John Wiley & Sons, NY (1994).
- JL Burguera, M Burguera. Flow Injection Systems for on-line Dissolution/Decomposition of Solid Samples. En: *Flow Analysis with atomic Spectrometric Detection*, A Sanz-Medel (Editor), Chapter 5. Elsevier, Amsterdam, pp. 135-167 (1999).
- JL Burguera, M Burguera. Flow injection techniques in environmental analysis. En: *Encyclopedia of Analytical Chemistry: Instrumentation and Applications*, RA Meyers (Editor). John Wiley, Chichester, A0820 (2000).
- Miembro del Advisory Board y referee del Journal of Analytical Atomic Spectrometry, The Royal Society of Chemistry, Inglaterra, desde 1995
- Miembro del Advisory Board y referee de TALANTA, the Internacional Journal of Pure and Applied Analytical Chemistry, Elsevier Amsterdam, desde 2002.

Artículos científicos

Se ha tomado una muestra representativa de las publicaciones, ya que son alrededor de 250 artículos científicos.

- J Goyo-Rivas, M Burguera, JL Burguera. Hipercincemia en Pacientes con Síndrome de Chediak-Higashi. **Boletín Médico Infantil de México**, **42**, 735-738 (1986).
- T Baptista, L Hernández, JL Burguera, M Burguera, Hoebel. Therapeutic Doses of Lithium Enhance Hypothalamic Serotonin Tumors in Rats: A Micro Dialysis Study. Psychotherapeutic Drugs: Anti-depress International Conference. Phoenix, Arizona, USA. **Society for Neuroscience Abstracts**, **5**, p. 851, Abstract 342.3 (1989).
- T Baptista, L Hernández, JL Burguera, M Burguera, BG Hoebel. Chronic Lithium Administration Enhances Serotonin Release in the Lateral Hypothalamus but not in the Hippocampus in Rats. A Micro-dialysis Study. **J. Neural Transmission**, **82**, 31-41 (1990).
- OM Alarcón, JL Burguera, M Burguera. Iron, Copper, and Zinc in Aqueous Humor of Humans. **Trace Elements in Medicine**, **8**, 19-22 (1991).
- T Baptista, E Murzi, L Hernández, JL Burguera, M Burguera M. Mechanism of the Sex-Dependent Effect of Lithium on Body Weighting Rats. **Pharmacology Biochemistry & Behaviour**, **38**, 533-537 (1991).
- JL Burguera, M Burguera. An Automated Micro-technique for Zinc Determination in Plasma, Blood Cells and Whole Blood by Flow Injection Atomic Absorption Spectrophotometry. **Laboratory Robotics & Automation (LRA)**, **3**, 119-124 (1991).
- JL Burguera, R Antón de Salager, M Burguera, JL Salager, C Rondón, P Carrero, M Gallignani, MR Brunetto, M Briceño. On-line Emulsification of Lubricating oils in a Flow-Injection System for Chromium Determination by ETAAS. **J. Anal. Atomic Spectrometry**, **15**, 549-555 (2000).
- M Burguera, JL Burguera, MR Brunetto, JR Materan, OM Alarcón, JL Burguera. Lead Concentration Found in Whole Human Blood in Association with Printing-Press Activities. En: *Heavy Metals in the Environment*, 1. JG Farmer (Editor), CEP Consultants, Edinburgh, Scotland, pp. 150-153 (1991).

Actividad editorial

Marcela:

- Editor - At - Large. Marcel Dekker, USA, desde 1989.
- Miembro del Advisory Board of the Encyclopedia of Analytical Science. Academic Press, New York (USA), desde 1991.
- Editora invitada del Vol. 15, número 2, de la Revista Española Química Analítica. Año 1996,
- Miembro del Comité Científico de la Revista Española Química Analítica, 1996-2000.
- Miembro del Advisory Board de la revista Talanta, 1998-2001.
- Miembro Fundador del Comité Editorial de la revista Avances en Química, Venezuela, desde 2006.

José Luis:

- Editor - At - Large, Marcel Dekker, USA, desde 1989.
- Miembro del Advisory Board of the Encyclopedia of Analytical Science. Academic Press, New York (USA), desde 1991.
- Editor del libro Flow Injection Atomic Spectroscopy, Marcel Dekker, New York, USA, 1989
- Miembro del Comité Editorial del Journal of the Trace Elements and Electrolytes in Health Disease, Walter de Gruyter, Berlin, Alemania, desde 1989
- Miembro del Comité Editorial del Journal of Food Composition and Analysis, Academic Press, San Diego, CA, USA, desde 1994
- Miembro del Advisory Board y referee del Journal of the Trace Elements in Medicine and Biology, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart-Jena, Alemania, desde 1994

- JL Burguera, M. Burguera, F. Silva, C. Rondón, M. Galignani, MR Brunetto, CR Burguera-Pascu, M. Burguera-Pascu. Determination of Zn in hair of patients with Chediak-Higashi syndrome. En: *Metal Ions in Biology and Medicine*, MA Cser, IS Laszlo, JC Etienne, JC, Y Maynard, JA Centeno, L Khassanova, PH Collery (Editores). John Libbey Eurotext, Paris, 8, 488-490 (2004).
- JL Burguera, M Burguera, C Rondon, P Carrero. Determination of beryllium in natural and waste waters using on-line flow-injection pre-concentration by precipitation/dissolution for electro-thermal atomic absorption. **Talanta**, **52(1)**, 27-37 (2000).
- M Galignani, M Valero, MR Brunetto, JL Burguera, M Burguera, YP de Peña. Sequential determination of Se (IV) and Se (VI) by flow injection-hydride generation-atomic absorption spectrometry with HCl/HBr microwave aided pre-reduction of Se(VI) to Se(IV). **Talanta**, **52 (6)**, 1015-1024 (2000).
- YP de Peña, W López, JL Burguera, M Burguera. Synthetic zeolites as sorbent material for on-line pre-concentration of copper traces and its determination using flame atomic absorption spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, **403 (1-2,3)**, 249-258 (2000).
- JL Burguera, M Burguera. Volatile species generation in FI for the on-line determination of species in environmental samples by ETAAS. **J. Flow Injection Analysis**, **18**, 5-12 (2001).
- M Burguera, JL Burguera, C Rondón. Determination of boron in blood, urine and bone by electro-thermal atomic absorption spectrometry using zirconium and citric acid as modifiers. **Spectrochimica Acta, Part B**, **56(10)**, 1845-1857 (2001).
- M Burguera, JL Burguera, ML Di Bernardo, OM Alarcón, E Nieto, JR Salinas, E Burguera. Age and sex-related Ca and Sr concentrations in different types of human bones. **Electrolytes**, **16**, 103-112 (2002)
- JL Burguera, M Burguera, C Rondón. An on-line flow-injection microwave-assisted mineralization and a precipitation/dissolution system for the determination of molybdenum in blood serum and whole blood by electro-thermal atomic absorption spectrometry. **Talanta**, **58(6)**, 1167-1175 (2002).
- JL Burguera, RM Ávila-Gómez, M Burguera. Optimum phase-behavior formulation of surfactant/oil/water systems for the determination of chromium in heavy crude oil and in bitumen-in-water emulsion. **Talanta**, **61 (3)**, 353-361 (2003).
- MR Brunetto, AR Morales, JL Burguera, M Burguera. Determination of Paraquat in human blood plasma using reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatography with direct sample injection. **Talanta**, **59 (5)**, 913-921 (2003).
- OM Alarcón, Y Guerrero, ML Di Bernardo, M Burguera, JL Burguera, C Burguera-Pascu, AO Alarcón-Silva. Distorsión del mapa enzimático renal en ratas tratadas con Menadiona (Vitamina K3). **Revista de la Facultad de Farmacia ULA**, **45(1)**, 25-29 (2003).
- C Rondón, D Paredes, OM Alarcón, P Carrero, M Burguera, JL Burguera, J Villarroel, YP de Peña. Effect of Cu on the serum lipid levels of rats with induced nephrotic syndrome. En: *Metal Ions in Biology and Medicine*, MA Cser, IS Laszlo, JC Etienne, Y Maynard, JA Centeno, L Khassanova, PH Collery (Editores). John Libbey Eurotext, Paris, 8, 373-377 (2004).
- J Goyo-Rivas, EB Padrino, JL Burguera, M Burguera, M Burguera-Pascu. Determination of Zn in hair of patients with Chediak-Higashi syndrome. 8th International Symposium on Metal Ions in Biology and Medicine, 18-22 Mayo, Budapest, Hungría (2004).
- JL Burguera, M Burguera. Analytical applications of organized assemblies for on-line spectrometric determinations: present and future. **Talanta**, **64(5)**, 1099-1108 (2004).
- M Burguera, Y Cova, OM Alarcón, JL Burguera, ML di Bernardo, M Burguera-Pascu. A Preliminary investigation into the potencial of Cu-based treatment for repigmentation of patients with different types of vitiligo. En: *Metal Ions in Biology and Medicine*, MA Cser, IS Laszlo, JC Etienne, Y Maynard, JA Centeno, L Khassanova, PH Collery (Editores). John Libbey Eurotext, Paris, 8, 37-42 (2004).
- MR Brunetto, MA Obando, M Galignani, OM Alarcon, E Nieto, R Salinas, JL Burguera, M Burguera. HPLC determination of Vitamin D3 and its metabolite in human plasma with on-line sample cleanup. **Talanta**, **67**, 1364-1370 (2004).
- P Carrero, J Villarroel, OM Alarcón, D Paredes, C Rondón, M Burguera, JL Burguera, YP de Peña. Trace elements content (Fe, Cu, Zn and Mg) in fingernails and hair of postpartum Venezuelan women and their full-term neonates. En: *Metal Ions in Biology and Medicine*, MA Cser, IS Laszlo, JC Etienne, Y Maynard, JA Centeno, L Khassanova, PH Collery (Editores). John Libbey Eurotext, Paris, 8, 432-435 (2004).
- J Goyo-Rivas, EB Padrino, JL Burguera, M Burguera-Pascu. Determination of Zn in hair of patients with Chediak-Higashi syndrome. En: *Metal Ions in Biology and Medicine*, MA Cser, IS Laszlo, JC Etienne, Y Maynard, JA Centeno, L Khassanova, PH Collery

(Editores). John Libbey Eurotext, Paris, 8, 488-490 (2004).

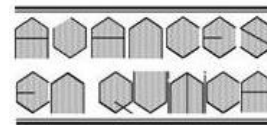
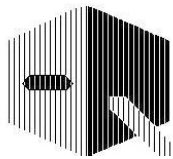
- JL Burguera, M Burguera, RE Antón, JL Salager. Determination of aluminum by electro-thermal atomic absorption spectroscopy in lubricating oils emulsified in a sequential injection analysis system. **Talanta**, **68(2)**, 179-186 (2005).
- M Gallignani, C Ayala, MR Brunetto, JL Burguera, M Burguera. A simple strategy for determining ethanol in all types of alcoholic beverages based on its on-line liquid-liquid extraction with chloroform, using a flow injection system and Fourier transform infrared spectrometric detection in the mid-IR. **Talanta**, **68(2)**, 470-479 (2005).
- P Carrero, A Malavé, E Rojas, C Rondón, YP de Peña, JL Burguera, M Burguera. On-line generation and hydrolysis of methyl borate for the spectrophotometric determination of boron in soil and plants with azomethine-H. **Talanta**, **68(2)**, 374-381 (2005).
- JL Burguera, M Burguera. Molybdenum in human whole blood of adult residents of the Merida State (Venezuela). **J. Trace Elements in Medicine and Biology**, **21(3)**, 178-183 (2007).
- M Burguera, JL Burguera. On-line Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry Configurations: Recent Developments and Trends. **Spectrochimica Acta Part B**, **62(9)**, 884-896 (2007).
- JL Burguera, M Burguera. Recent on-line processing procedures for biological samples for determination of trace elements by atomic spectrometric methods. **Spectrochimica Acta Part B**, **64(6)**, 451-458 (2009)
- JL Burguera, M Burguera. Pretreatment of oily samples for analysis by flow injection-spectrometric methods. **Talanta**, **83(3)**, 691-669 (2011).
- JL Burguera, M Burguera. Analytical applications of emulsions and micro-emulsions. **Talanta**, **96**, 11-20 (2012).

Agradecimientos

Nuestro agradecimiento a Constantin Burguera Pascu por facilitar información para hacer posible la elaboración de este trabajo y, especialmente, a Marcela y José Luis Burguera por su enorme aporte al desarrollo y proyección de nuestra Universidad. ¡Gracias amigos!

Olga Pérez de Márquez

Grupo de Electroquímica, Departamento de Química,
Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes,
Mérida 5101 - Venezuela
olgamq@gmail.com



Edición génica con el sistema CRISPR/Cas9: historia de su descubrimiento y alcances en agricultura

Matías Nicolás González^{1,2*}, Gabriela Alejandra Massa^{1,2,3} y Sergio Enrique Feingold¹

¹) Laboratorio de Agrobiotecnología, IPADS (INTA - CONICET), Balcarce, Argentina.

²) Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Buenos Aires, Argentina.

³) Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata, Balcarce, Argentina.

(*) gonzalez.matiasn@inta.gob.ar

Recibido: 13/04/2021

Aceptado: 27/04/2021

Resumen

La conversión del sistema inmune procarionta CRISPR/Cas9 en una herramienta molecular para edición génica representa el avance tecnológico más destacado de la última década, y ha revolucionado tanto la investigación básica como el desarrollo de aplicaciones en diversas áreas de las ciencias de la vida. Los alcances de esta tecnología han sido reconocidos con el Premio Nobel en Química del año 2020. En las especies vegetales, CRISPR/Cas9 permite la modificación de secuencias genómicas con una eficiencia y especificidad sin precedentes, lo que permite la creación de genotipos con caracteres beneficiosos que permiten afrontar la creciente demanda global de alimentos en un marco de adversidades crecientes dadas por el cambio climático. La creación de esta herramienta y los avances obtenidos con su empleo, no hubiesen sido posibles sin el fundamental aporte de las investigaciones pioneras que permitieron el descubrimiento de los sistemas CRISPR en procariontes. En este artículo, abordamos la historia del descubrimiento de CRISPR hasta el punto de inflexión en su adopción como sistema para edición génica y discutimos su potencial como herramienta en el mejoramiento de los cultivos y sus perspectivas a futuro.

Palabras claves: CRISPR/Cas9; edición génica; mejoramiento de cultivos; biotecnología

Abstract

The adoption of the prokaryotes-immune system CRISPR/Cas9 as a genome-editing tool represents the most outstanding technological advance of the last decade and has revolutionized both basic research and applied developments in many areas of life sciences. The recognition of this technology was reflected with the 2020 Nobel Prize in Chemistry. In plant research, CRISPR/Cas9 allows for the first time the precise modification of genomic sequences with unprecedented efficiency and specificity, allowing the creation of genotypes with beneficial traits that would allow facing the growing global food demand under the constraints of a global warming scenario. The development of this technology and the advances obtained with its use would not have been possible without the fundamental contribution of the basic research behind the discovery of the CRISPR systems in prokaryotes. In this article, we address the history of the discovery of CRISPR into the inflection point of its adoption as a genome-editing tool and discuss its potential in crop breeding and its future prospects.

Keywords: CRISPR/Cas9; Genome-editing; Crop breeding; Biotechnology

Introducción

La edición génica constituye uno de los avances más notables de la biotecnología moderna en la modificación del ADN de las células eucariotas, permitiendo la introducción de inserciones o deleciones, la sustitución de fragmentos, la introducción de nuevo material genético de forma dirigida, e incluso la modificación de secuencias a nivel de nucleótidos individuales¹. La estrategia básica de la edición génica involucra la introducción de cortes en la doble hebra de ADN (DSB, del inglés *double-stranded breaks*) en un punto definido del ge-

noma. Para preservar su integridad, las células emplean mecanismos endógenos que les permiten reparar los DSB previo a la replicación del genoma. Los principales mecanismos de reparación de DSB en las células eucariotas son la unión de extremos no-homólogos (NHEJ, del inglés *non-homologous end joining*) y la recombinación homóloga (HR, del inglés *homologous recombination*)². Como resultado de una reparación imprecisa mediada por NHEJ se pueden obtener pequeñas inserciones o deleciones en el sitio de unión, lo que puede ser explotado para producir la pérdida de función de genes especí-



Doctorando Lic. Matías Nicolás González. Laboratorio de Agrobiotecnología, IPADS (INTA-CONICET), Balcarce, Argentina.



Dra. Gabriela Alejandra Massa. Laboratorio de Agrobiotecnología, IPADS (INTA-CONICET), Balcarce, Argentina.



Dr. Sergio Enrique Feingold. Laboratorio de Agrobiotecnología, IPADS (INTA-CONICET), Balcarce, Argentina.

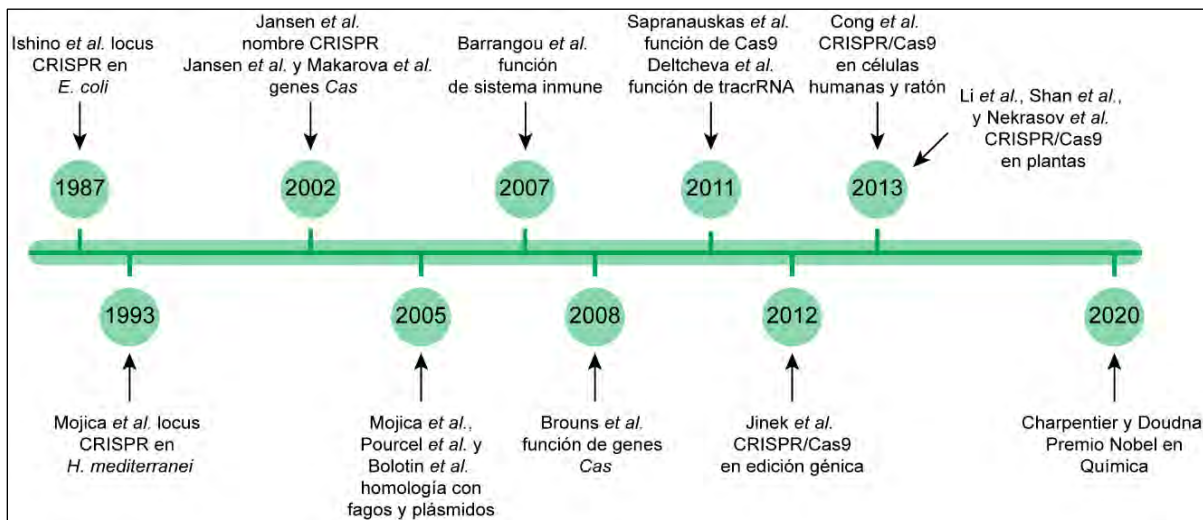


Fig. 1: Línea de tiempo con los hitos más destacados del descubrimiento de CRISPR/Cas9.

ficos, debido a la alteración de los marcos de lectura que conlleven a la generación de codones de terminación prematuros, o la pérdida de función de la proteína resultante, por la eliminación de aminoácidos clave a nivel funcional y/o estructural. Adicionalmente, la reparación por NHEJ permite la obtención de re-arreglos cromosómicos³. Por otro lado, para que se lleve a cabo la reparación mediada por HR es necesaria la presencia dentro de la célula de un fragmento de ADN con secuencia homóloga al sitio de corte, lo que puede ser utilizado para la integración dirigida de secuencias ectópicas o la corrección de mutaciones preexistentes⁴.

Los primeros sistemas de edición génica utilizados en los organismos eucariotas incluyen a las meganucleasas⁵, TALEN (del inglés *transcription activator-like effector nucleases*) y ZFN (del inglés *zinc finger nucleases*)⁶. Estos sistemas implican el reconocimiento específico de la secuencia blanco de ADN a través de un dominio proteico, lo que presenta limitaciones asociadas a la complejidad de su diseño y la validación de su actividad. Aunque los sistemas TALEN y ZFN aún se utilizan dentro de la comunidad científica de diversas áreas, las mencionadas limitaciones hacen que su adopción se encuentre lejos de ser considerada rutinaria⁷. Por el contrario, CRISPR/Cas (del inglés, *clustered regularly interspaced short palindromic repeats and CRISPR-associated proteins*), basado en el reconocimiento de secuencias blanco de ADN guiado por ARN, representa el sistema de edición génica más versátil descubierto en la historia de la biología molecular, debido a que puede ser aplicado para la modificación de genomas de plantas y animales (incluyendo humanos) con facilidad, precisión y eficiencia sin precedentes⁸. A menos de una década desde su adopción como herramienta para edición génica⁹, el sistema CRISPR/Cas9 originado de la bacteria *Streptococcus pyogenes* ha revolucionado tanto la investigación básica como la aplicada en las áreas de medicina, mejoramiento animal y vegetal, entre otras, lo que le valió a dos de sus desarrolladoras, Emmanuelle Charpentier (actualmente en el Instituto Max Planck de Berlín, Alemania) y Jennifer Doudna (Universidad

de California en Berkeley, Estados Unidos) el Premio Nobel en Química del año 2020⁷

En este artículo abordamos brevemente la historia detrás del descubrimiento del sistema CRISPR/Cas9, su biología y adopción como herramienta para edición génica y proveemos ejemplos concretos de sus aplicaciones más notables en agricultura. Por otro lado, discutimos las perspectivas a futuro en el uso de ésta y otras tecnologías desarrolladas recientemente a partir de CRISPR/Cas9, en el desarrollo de nuevas variedades de cultivos.

La historia detrás de CRISPR/Cas9

La figura 1 muestra una línea de tiempo con los hitos más destacados en el descubrimiento del sistema CRISPR/Cas9 y su subsiguiente transformación en una herramienta para edición génica. Como muchos otros de los más valiosos descubrimientos científicos, el hallazgo de CRISPR ocurrió de manera accidental. Fue a mediados de los 1980's, cuando Ishino *et al.* (1987) estudiaban un gen relacionado con la formación de isoenzimas de la fosfatasa alcalina (AP) en la bacteria *Escherichia coli*. En aquel trabajo, los investigadores aislaron y secuenciaron el gen *iap* (codificante de una proteasa aparentemente involucrada en la conversión isoenzimática de la AP), encontrando río abajo de dicha secuencia una estructura inusual, conformada por una secuencia corta repetida varias veces de forma directa, inter-espaciada por secuencias no conservadas¹⁰. Esta estructura fue tan inesperada, que los autores del trabajo la mencionaron brevemente en la discusión, a pesar de no haber identificado su función biológica¹⁰.

El siguiente avance en la historia de CRISPR se dio en 1993, cuando Mojica *et al.* identificaron repeticiones directas similares a las observadas por Ishino en el genoma de una especie de arquea, *Haloflex mediterranei*, durante el estudio de los mecanismos de regulación de la expresión génica que permi-

⁷ <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2020/press-release/>

ten a esta arquea adaptarse a distintas condiciones de salinidad¹¹. Más importante aún, los autores demostraron mediante técnicas de *Northern blot*, que estas repeticiones son capaces de transcribirse a ARN. Desde entonces, los avances en las técnicas de secuenciación logrados durante la década de 1990 pusieron a disponibilidad de los científicos datos de secuenciación de muchos genomas, a partir de los que se detectaron *loci* de repeticiones directas en múltiples especies de bacterias y arqueas, descritas bajo diversos nombres en la literatura¹². Su presencia en dos de los tres dominios de la vida, llamó el interés de muchos grupos de investigación especializados en microbiología, que se dedicaron a identificar su función biológica. En 2002, Jensen *et al.* realizaron estudios de genómica comparativa y llegaron a la conclusión de que estos *loci* guardan ciertas características conservadas en todos los genomas: i) contienen múltiples repeticiones directas conservadas; ii) las repeticiones están inter-espaciadas por secuencias no conservadas; iii) se localizan en regiones inter-génicas; y iv) una secuencia común de entre 300-500 pb se ubica río abajo o arriba del grupo de repeticiones¹³. Para resumir las características observadas, los autores propusieron por primera vez el nombre CRISPR, que fuera rápidamente aceptado por la comunidad científica que trabajaba en estas secuencias. En ese mismo trabajo y en otro publicado en la misma época, se identificaron los genes *Cas*, presentes en las regiones adyacentes a los *loci* CRISPR^{13,14}. El estudio de la secuencia proteica predicha a partir de estos genes, permitió sugerir que codifican para enzimas relacionadas con el metabolismo del ADN, posiblemente relacionadas con un sistema de reparación, recombinación o regulación de la transcripción¹⁴. El punto de inflexión en la determinación de la función biológica de los *loci* CRISPR se dio en 2005 cuando de forma independiente dos trabajos publicados por Mojica *et al.* y Pourcel *et al.*, demostraron que las secuencias no conservadas que separan las repeticiones directas en el locus CRISPR guardan homología con genomas de bacteriófagos y plásmidos exógenos^{15,16}. Los autores de ambos trabajos, propusieron además que las cepas de bacterias que conservan las secuencias espaciadoras homólogas a los genomas de los fagos, no son susceptibles a su infección, quedando establecido que CRISPR constituiría un sistema inmune. A su vez, en ambos trabajos se propuso que los genes *Cas* tendrían algún rol en la función de CRISPR como sistema inmune. Estas observaciones fueron confirmadas por el trabajo de Bolotin *et al.* (2005)¹⁷. La función de CRISPR fue experimentalmente probada por Barrangou *et al.* en 2007. Trabajando con la bacteria *Streptococcus thermophilus* demostraron que CRISPR es esencial para prevenir las contaminaciones con bacteriófagos en cultivos bacterianos benéficos para la preparación de yogurt, quesos y productos relacionados¹⁸. Los autores demostraron que las inserciones de fragmentos del ADN de bacteriófagos entre las repeticiones directas del locus CRISPR permiten a la bacteria resistir a la infección del fago correspondiente. A su vez, la eliminación de esta secuencia en el fago, restaura la susceptibilidad de la bacteria a su infección¹⁸. El mecanismo por el cual la bacteria es capaz de con-

trarrestar la infección por el fago, fue descrito más tarde por Brouns *et al.* (2008). Los autores fueron capaces de reconstruir el sistema inmune de la bacteria *E. coli*, demostrando que moléculas cortas de ARN procesadas a partir del locus CRISPR interactúan con las proteínas codificadas en los genes *Cas* para mediar la respuesta antiviral¹⁹. Posteriormente, la expresión del sistema CRISPR/Cas de *S. thermophilus* en *E. coli* demostró protección heteróloga a la infección por fagos. Este trabajo marcó un hito muy importante en el desarrollo de una herramienta para edición génica, ya que demostró que Cas9, la enzima codificada en el gen *Cas9* de *S. thermophilus* es la única proteína necesaria en esta bacteria para mediar la respuesta inmune²⁰. Ese mismo año, un grupo de investigadores liderados por Emmanuelle Charpentier, trabajando primero en la Universidad de Viena, Austria, y posteriormente en la Universidad de Umeå, Suecia, lograron identificar un componente fundamental del sistema CRISPR/Cas de la bacteria *Streptococcus pyogenes*. Al igual que su especie emparentada *S. thermophilus*, *S. pyogenes* requiere solo de la nucleasa Cas9 para mediar la respuesta inmune frente a bacteriófagos, además de las secuencias de ARN cortas codificadas en el locus CRISPR. Los investigadores lograron identificar un tercer componente constituido por una molécula de ARN no codificante (denominado tra-crRNA) cuyo rol es clave en la maduración de las moléculas pequeñas de ARN que median la respuesta inmune²¹. Este descubrimiento llevó a Charpentier a establecer una colaboración con Jennifer Doudna, de la Universidad de California en Berkeley, Estados Unidos, una reconocida bioquímica con vasta experiencia en ARN. Trabajando en conjunto, lograron reformular el sistema CRISPR/Cas9 de *S. pyogenes* para convertirlo en una herramienta programable de edición génica constituida por dos componentes⁹. Inmediatamente, el sistema CRISPR/Cas9 demostró su potencial en la edición de genes de células eucariotas; en mamíferos primero²², y en plantas más tarde²³⁻²⁵. Desde entonces, su utilización ha permitido innumerables investigaciones y aplicaciones en áreas de medicina, mejoramiento animal y agricultura¹.

Biología del sistema CRISPR/Cas9 y creación de una herramienta para edición génica

CRISPR/Cas fue descubierto como una forma de sistema inmune adaptativo presente en muchas bacterias y la mayoría de las arqueas. En general, se distinguen dos partes fundamentales en CRISPR/Cas: i) los genes *Cas*, que codifican proteínas involucradas en la adquisición de nuevas secuencias de ADN invasor y en la protección frente a la reinfección; y ii) el arreglo CRISPR que consiste en secuencias conservadas denominadas repeticiones directas, separadas por secuencias no conservadas de una longitud fija denominadas espaciadores. El arreglo CRISPR provee de una memoria inmune a la célula de invasiones de ADN previas²⁶. El sistema inmune CRISPR/Cas9, perteneciente a la bacteria *S. pyogenes* (figura 2) ha sido uno de los sistemas mejor estudiados y su completa descripción en el año 2011²¹, llevó al desarrollo de una herramienta

de edición génica⁹. En la bacteria, el mecanismo completo de defensa se desarrolla en tres etapas, denominadas de adaptación, de expresión y de interferencia⁸. Durante el proceso de adaptación, iniciado ante la primera exposición de la célula al fago o plásmido, una secuencia corta del ADN foráneo (espaciador) es integrada al arreglo CRISPR y separada del resto por repeticiones directas (figura 2A). Durante la fase de expresión, el arreglo CRISPR se transcribe para dar una única molécula larga de ARN, denominada ARN precursor CRISPR

(pre-crRNA), la cual es posteriormente procesada por ARNasas en moléculas cortas de ARN CRISPR maduros (crRNA). En su extremo 5' el crRNA posee la secuencia complementaria al espaciador integrado durante la etapa de inmunización, mientras que en el extremo 3' el crRNA posee una secuencia complementaria a la repetición directa. Durante la etapa de interferencia seguida a la segunda invasión del patógeno, el crRNA es unido por una segunda molécula de ARN no codi-

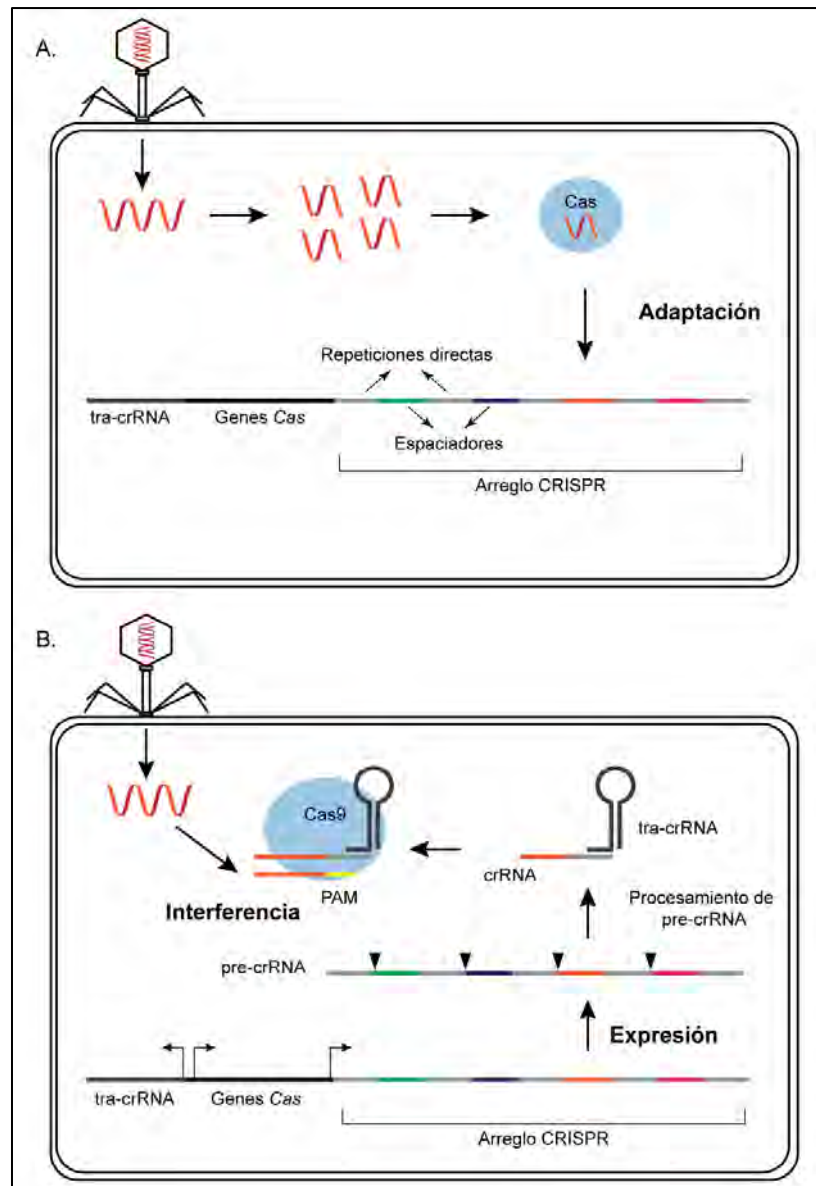


Fig. 2: El sistema inmune adaptativo CRISPR/Cas9 de *Streptococcus pyogenes*. (A) El locus CRISPR consta de un arreglo de secuencias cortas repetitivas (repeticiones directas) inter-espaciadas por fragmentos cortos no repetitivos (espaciadores), y de los genes asociados (genes *Cas*). Previo a los genes *Cas* se encuentra codificado el ARN transactivador del ARN CRISPR (*tra-crRNA*) que posee homología con las repeticiones directas. Durante el mecanismo de adaptación, un nuevo espaciador (barra anaranjada) originado del material genético invasor, es incorporado al arreglo CRISPR por enzimas codificadas en los genes *Cas*. (B) Durante la etapa de expresión, el nuevo espaciador es transcrito en conjunto con los otros espaciadores en una molécula de ARN larga denominada precursor de ARN CRISPR (*pre-crRNA*), el cual es procesado por ARNasas (puntas de flecha invertidas) en moléculas cortas maduras (*crRNA*), que contienen la secuencia del espaciador y una repetición directa (barra gris). El *tra-crRNA* se transcribe independientemente e hibrida por complementariedad de bases con la repetición directa contenida en el *crRNA*. Durante la interferencia, la estructura híbrida *crRNA/tra-crRNA* es incorporada por la nucleasa efectora Cas9, la cual es capaz de cortar el ADN invasor ante una segunda exposición, en un sitio complementario a la secuencia del espaciador, localizada río arriba de una secuencia PAM (barra amarilla).

ficante, denominada ARN transactivador del ARN CRISPR (tra-crRNA), el cual hibrida con el extremo 3' del crRNA. Ambos forman una estructura secundaria específica, capaz de reclutar a la nucleasa efectora Cas9, y el complejo resultante tiene la capacidad de monitorear secuencias de ADN, hasta hibridar con su complementaria en el ADN del patógeno (denominada protoespaciador) y producir el corte para su degradación. Para la identificación del ADN foráneo es necesario en la proximidad del protoespaciador, un motivo corto y conservado denominado motivo adyacente al protoespaciador (PAM, por sus siglas en inglés) (figura 2B). Este motivo se localiza exclusivamente en la secuencia del ADN foráneo y no así en el arreglo CRISPR, lo que ha sido propuesto como un mecanismo que evita al sistema interferir contra el propio

ADN del hospedador.

El paso fundamental dado en la creación de una herramienta programable de edición génica, se dio al combinar el crRNA y el tra-crRNA en una única molécula de ARN guía (sgRNA), quedando establecido un sistema de dos componentes (figura 3)⁹. Modificando la secuencia correspondiente al espaciador dentro de dicho sgRNA, se puede reprogramar el sistema y guiar la nucleasa Cas9 hacia cualquier secuencia de ADN (con la existencia de un motivo PAM como único requisito) para introducir cortes en la doble hebra⁸. La subsecuente reparación del corte por los mecanismos de reparación celular del ADN (NHEJ o HR), posibilita la introducción de modificaciones en la secuencia blanco (figura 3).

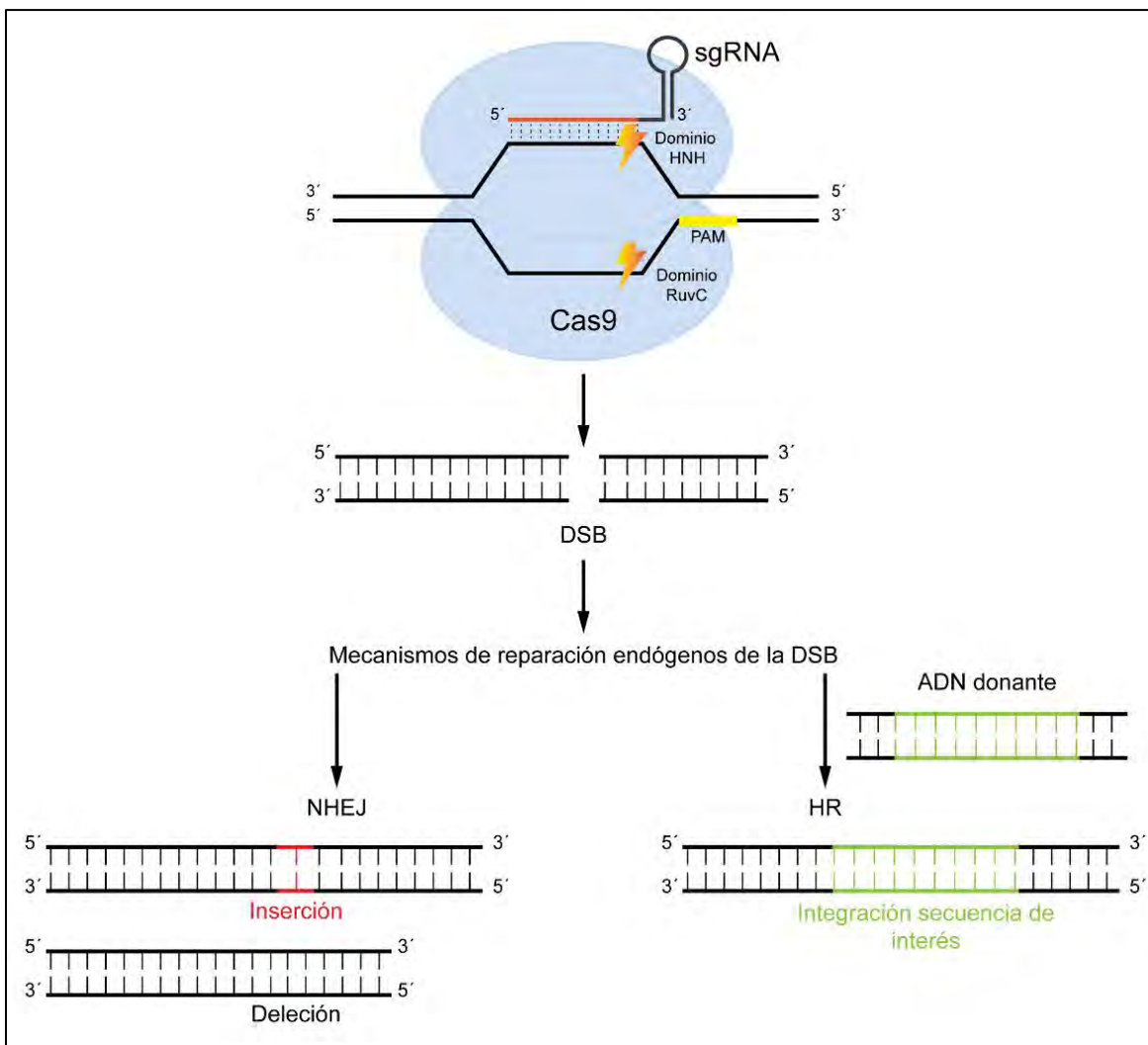


Fig. 3: Edición génica mediada por CRISPR/Cas9. La nucleasa Cas9 es guiada por el sgRNA hasta el sitio blanco, complementario a la secuencia del espaciador (línea anaranjada). El dominio HNH y el dominio RuvC producen el corte de la hebra blanco y no-blanco, respectivamente. La presencia de una secuencia PAM (-NGG) es necesaria para el correcto reconocimiento y función por parte de la nucleasa. El corte resultante en la doble hebra de ADN (DSB), es reparado por uno de dos mecanismos endógenos de la célula del huésped. En ausencia de un fragmento de ADN de secuencia homóloga, el mecanismo prevalente es la unión de extremos no homólogos (NHEJ) que puede conllevar a inserciones o deleciones en el sitio de unión. En presencia de un fragmento de ADN que contiene una secuencia de interés flanqueada por secuencias con homología al sitio circundante al corte (ADN donante), puede iniciarse el mecanismo de recombinación homóloga (HR), para producir la integración de la secuencia de interés, que puede corresponder al mismo organismo o a otro diferente, dando lugar a un reemplazo alélico o a un evento transgénico, respectivamente.

Aplicaciones de CRISPR/Cas9 en agricultura

Desde sus primeras aplicaciones en plantas en 2013²⁷, el sistema CRISPR/Cas9 ha acelerado la investigación básica en especies vegetales y ha provisto de una herramienta poderosa para ser aplicada al mejoramiento de muchas especies de cultivos de importancia económica, como arroz, trigo, maíz, soja, tomate y papa (para revisiones recientes consultar²⁸⁻³⁴). La combinación entre los avances en la secuenciación de genomas y el surgimiento de CRISPR/Cas9 como herramienta de edición génica, permite la creación de nuevos genotipos con características beneficiosas, haciendo foco en caracteres que tiendan a mejorar la calidad de los productos de cosecha y la sostenibilidad productiva y ambiental. Debido a que el mecanismo de NHEJ es la principal vía de reparación de DSB en células somáticas vegetales, el sistema CRISPR/Cas9 ha sido primordialmente utilizado para crear pequeñas inserciones o deleciones en puntos específicos del genoma, que permiten la eliminación de elementos genéticos que otorgan características indeseables³⁴. Sin embargo, también se ha utilizado para la introducción de modificaciones precisas que otorgan una ganancia de función a través del mecanismo de HR⁴. Las principales aplicaciones de CRISPR/Cas9 en mejoramiento se han enfocado en obtener aumentos de rendimiento, mayor calidad nutricional y/o industrial, y resistencia de los cultivos a estreses bióticos y abióticos. En esta sección, se brindan ejemplos concretos para demostrar el alcance de esta tecnología en el mejoramiento de algunas de las especies de los cultivos más importantes para la actividad agrícola mundial.

Incremento en el rendimiento

Uno de los principales desafíos en el mejoramiento de cultivos, es obtener incrementos y estabilidad en los rendimientos que permitan enfrentar la creciente demanda de alimentos y combustibles de origen vegetal³⁵. Rodríguez-Leal *et al.* (2017) utilizaron el sistema CRISPR/Cas9 para generar variantes de elementos regulatorios de genes que controlan el tamaño del fruto, la ramificación de las inflorescencias y la arquitectura de la planta, tres de los más importantes caracteres que afectan la productividad en tomate³⁶. Mediante la utilización de múltiples sgRNAs dirigidos a la región promotora del gen *CLV3* (que controla el número de compartimentos para las semillas del tomate y, por lo tanto, el tamaño del fruto), los autores lograron generar distintas variantes del promotor obteniendo plantas con un número mayor de órganos florales y de compartimentos de semillas en el fruto, lo que resultó en un aumento en el tamaño del mismo. En el mismo trabajo, los autores editaron las regiones promotoras de los genes *S* (controlan el desarrollo de inflorescencias promoviendo la maduración de los meristemas) y *SP* (codifica para un represor de la floración que mantiene el crecimiento vegetativo), obteniendo plantas editadas con aumento del número de ramificaciones en las inflorescencias (lo que incrementa el número de frutos por planta), y plantas editadas con alteraciones en la arquitectura del tallo y en el número de inflorescencias, respectivamente³⁶.

El arroz, una de las principales fuentes de alimento del mundo, ha sido uno de los cultivos en los que se ha aplicado ampliamente el mejoramiento mediante técnicas de edición génica, debido a que posee un genoma pequeño, alta eficiencia de transformación, y disponibilidad de datos genómicos³⁷. Utilizando el sistema CRISPR/Cas9, Zhou *et al.* (2019) editaron los genes *OsGS3*, *OsGW2* y *OsGn1a*, que regulan negativamente el tamaño, el ancho y peso, y el número de granos por espiga, respectivamente. Siguiendo una estrategia de múltiples genes blancos, los autores obtuvieron combinaciones de mutantes para los tres genes, en tres cultivares élites de arroz, logrando aumentos de rendimiento de hasta un 68% en el caso de las líneas editadas simultáneamente en los tres blancos³⁸.

Mejoramiento de calidad nutricional y/o industrial

La papa es el tercer cultivo más importante para el consumo humano y posee un rol fundamental en la seguridad alimentaria. Uno de los factores que afectan la calidad y su industrialización es el pardeamiento enzimático, iniciado cuando los tubérculos sufren daño mecánico durante los procesos de cosecha, transporte y almacenamiento. Mediante la edición del gen *StPPO2* (que codifica para una polifenol oxidasa responsable del pardeamiento enzimático en tubérculos) con el sistema CRISPR/Cas9, nuestro grupo³⁹ ha reportado recientemente la generación de una variedad de papa con reducción de hasta un 73% en el pardeamiento enzimático, lo que representa un beneficio tanto para la industria y los productores (disminución del desperdicio de productos), como para los consumidores (mejores cualidades organolépticas)³⁹. Por otro lado, la modificación del almidón de la papa, mediante la obtención de variedades con aumento del contenido de amilosa e incremento del largo de las cadenas de amilopectina, puede contribuir a su calidad nutricional, disminuyendo el índice glucémico post-consumo y los niveles de colesterol en sangre. Con el sistema CRISPR/Cas9 se obtuvieron variedades con estas propiedades mediante la edición de los genes *SBE1* y *SBE2* (que codifican para las enzimas involucradas en la síntesis de amilopectina), de forma individual o simultánea^{40,41}. El almidón resultante conformado por cadenas largas de amilopectina, posee además propiedades beneficiosas para su utilización como materia prima en la producción de bioplásticos, los cuales en un futuro podrían reemplazar a algunos de los plásticos basados en materiales de origen fósil que utilizamos hoy en día⁴¹.

El trigo es uno de los principales componentes de la dieta humana y el cereal más cultivado mundialmente, y una de las primeras especies en ser editadas mediante el sistema CRISPR/Cas9²³. El consumo de las proteínas del gluten del trigo está asociado a la enfermedad autoinmune celiaquía, en los individuos susceptibles genéticamente. Dentro de las proteínas que conforman el gluten, la familia de las α -gliadinas son particularmente estimulantes de esta enfermedad. Utilizando el sistema CRISPR/Cas9, Sánchez-León *et al.* (2018) lograron editar regiones conservadas de los genes de la familia

de α -gliadinas en variedades de trigo pan y trigo duro (candéal), obteniendo líneas editadas en hasta 35 genes en simultáneo, lo que llevó a una considerable reducción de las proteínas α -gliadinas (32-82%) y una reducción de la inmunoreactividad de hasta un 85%⁴².

Resistencia a estreses bióticos y abióticos

La obtención de cultivos con rendimientos elevados y estables en condiciones desfavorables, como el estrés hídrico o las altas temperaturas, es de especial interés en el mejoramiento considerando los efectos adversos del cambio climático. En la respuesta a estrés hídrico, la hormona vegetal etileno juega un rol fundamental. En maíz el gen *ARGOS8* es un regulador negativo de la respuesta a etileno, ya que puede interactuar físicamente con su receptor en la célula, modulando la percepción de la hormona por parte de la misma y por tanto la cascada de señales que llevan a la respuesta. Con el objetivo de aumentar la tolerancia a estrés hídrico maíz, Shi *et al.* (2017) aumentaron la expresión del gen *ARGOS8* en líneas puras, a partir de la edición de la región promotora del gen endógeno mediante el sistema CRISPR/Cas9. Utilizando una secuencia de ADN donante conteniendo el promotor del gen *GOS2* (gen con expresión ubicua y moderada en maíz) y su región 5' no-codificante, los autores lograron obtener líneas editadas con reemplazo del promotor del gen *ARGOS8* por la región promotora del *GOS2*, o bien líneas editadas con inserción de la secuencia promotora del gen *GOS2* río arriba de la secuencia codificante de *ARGOS8*⁴³. En ambos casos, las modificaciones resultaron en una sobreexpresión del gen *ARGOS8* en todos los tejidos de las plantas obtenidas, lo que determinó un aumento significativo del rendimiento de las plantas sometidas a déficit hídrico, sin penalidad de rendimiento en condiciones hídricas óptimas para el cultivo⁴³.

El uso de variedades de cultivos resistentes a enfermedades, puede asegurar rendimientos altos en condiciones de estrés biótico a la vez que conlleva a una disminución en el uso de químicos para el control de los patógenos que las ocasionan. En papa, el tizón tardío representa la enfermedad más importante para el cultivo a nivel mundial y es causada por el oomycete *Phytophthora infestans*, cuyo control depende del uso de fungicidas aplicados durante el crecimiento de la planta y, en especial, durante el desarrollo de los tubérculos. El uso de variedades de papa resistentes a la enfermedad, representa una alternativa ambientalmente sostenible. En la colonización por parte del patógeno, los llamados genes de susceptibilidad de la planta (genes *S*) tienen un rol fundamental en el avance de la infección. Utilizando el sistema CRISPR/Cas9, Kieu *et al.* (2021) editaron 7 genes *S* candidatos para obtener resistencia al tizón tardío. Los autores lograron obtener plantas editadas en los cuatro alelos de cada gen candidato, de las cuales aquellas editadas en los genes *StDND1*, *StCHL1* y *StDMR6-1* mostraron un incremento de la resistencia a la enfermedad, evidenciada en una menor superficie de las lesiones sufridas en las hojas de las plantas expuestas al oomycete. Adicionalmente, las plantas editadas en el gen *StDMR6-1* mostraron una re-

ducción del número total de hojas afectadas, y en ninguno de los tres casos se observaron efectos adversos en el crecimiento y morfología de las plantas obtenidas⁴⁴.

Nuevas tecnologías y perspectivas a futuro en agricultura

El sistema CRISPR/Cas9 ha probado poseer un gran potencial para el mejoramiento de los cultivos. A su vez, se han desarrollado nuevas tecnologías a partir de este sistema que permiten la introducción de otras modificaciones genómicas más allá de las generadas a través de los mecanismos de NHEJ y HR. Muchas características importantes en los cultivos están determinadas por mutaciones puntuales o por reemplazos de una única base dentro de un gen. La técnica de *base-editing* ha surgido como una aproximación novedosa, a partir de la fusión de una nucleasa Cas9 con uno o ambos de sus dominios catalíticamente inactivos (nCas9 o dCas9, respectivamente), fusionada a un dominio con actividad desaminasa. Dependiendo de la naturaleza de este último, el sistema es capaz de catalizar la conversión de una citosina a una timina (C-T) o de una adenina a una guanina (A-G) dentro de una secuencia genómica de forma sitio-dirigida⁴⁵. Más recientemente, la herramienta de *prime-editing* fue desarrollada a partir de la fusión de una nCas9 con una transcriptasa reversa, acoplada a un sgRNA modificado (pegRNA, del inglés *prime editing guide RNA*) que contiene tanto la secuencia necesaria para el reconocimiento del sitio blanco como una secuencia molde de ARN. Dicha secuencia es retrotranscripta a ADN por la transcriptasa reversa, para ser insertada dentro del sitio de reconocimiento y lograr la introducción de nueva información genética⁴⁶. A su vez, los estudios genómicos de nuevas especies de bacterias y arqueas han permitido identificar otras nucleasas que presentan requerimientos diferentes en cuanto a las secuencias PAM, los que aumenta el número de secuencias blanco que pueden editarse dentro de un genoma⁴⁷.

Uno de los principales desafíos en el uso de estas tecnologías en muchas especies de cultivos, lo constituye la introducción en la célula vegetal de los componentes que median la edición genética⁴⁸. Normalmente este paso involucra el uso de moléculas de ADN que codifican para la maquinaria de edición, las cuales son introducidas mediante metodologías como la transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* o la utilización de cañones génicos para el bombardeo de partículas⁴⁹. Alternativamente, el uso de protoplastos obtenidos a partir de la degradación de la pared celular vegetal, representa una aproximación ventajosa para la introducción de los componentes en forma de moléculas de ADN o en la forma de complejos ribonucleoproteicos (RNP) ensamblados *in vitro*, lo que evita la integración de ADN foráneo en el genoma de la planta⁵⁰⁻⁵². Todas estas aproximaciones dependen de la capacidad de regeneración de distintos explantes o células individuales, lo que involucra procedimientos de cultivo de tejidos cuyo éxito depende en gran medida de la especie y el genotipo en particular⁵³. Por lo tanto será crítico en el futuro contar con estrategias de introducción de los componentes de

los sistemas CRISPR, que sean aplicables a variedades élite de cultivos. Algunas aproximaciones tales como la expresión transitoria de reguladores del desarrollo para inducir la transformación de genotipos recalcitrantes, o la introducción de los componentes en tejidos meristemáticos, polen o inflorescencias, representan oportunidades para establecer procedimientos robustos que contribuyan a la aplicación de estas tecnologías a un número mayor de genotipos³³.

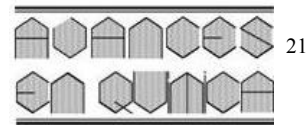
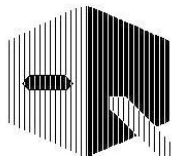
La llegada de esta extensa caja de herramientas a la producción agrícola y al consumo, dependerá en última instancia de los marcos regulatorios que los países establezcan para los organismos resultantes^{1,54,55}. Actualmente, existe una discusión global acerca de la aproximación regulatoria que debe utilizarse para los cultivos obtenidos por estas técnicas. La pregunta central abordada en esta discusión es si los productos generados mediante edición génica deben ser sujetos o no a los mismos marcos regulatorios de bioseguridad ya existentes para los Organismos Genéticamente Modificados (OGMs)⁵⁶. Dichos marcos se basan en los principios fundamentales de seguridad de alimentación (tanto humana como animal) y en evaluaciones de riesgo ambiental de los cultivos obtenidos mediante biotecnología⁵⁷, pudiendo distinguirse aquellos basados en el proceso, que se enfocan en las técnicas utilizadas para la obtención del nuevo cultivo, y aquellos basados en el producto, que centran el análisis de las características finales que posee el nuevo cultivo y si éstas representan un riesgo o no¹. Debido a que CRISPR/Cas9 y otras tecnologías relacionadas pueden utilizarse para la generación de productos que no difieren de aquellos obtenidos por métodos de mejoramiento convencionales o que aparecen espontáneamente en la naturaleza, aquellos países que orientan su regulación al producto final han establecido que los mismos no sean alcanzados por el marco regulatorio de los OGMs⁵⁸. Entre ellos, se destacan los casos de Estados Unidos, Argentina, Brasil y Canadá^{59,60}. Por el contrario, la Unión Europea, que posee una regulación basada en el proceso, ha propuesto que los organismos obtenidos mediante esta tecnología sean clasificados como OGM, en una decisión de la Corte Europea de Justicia emitida en julio de 2018⁶¹. La incertidumbre respecto de la regulación y las diferencias entre las posturas adoptadas por cada país pueden representar un impedimento en la aplicación de esta tecnología para el mejoramiento de cultivos cuyo destino sea la exportación. Sin embargo, la potencialidad de la edición génica en el desarrollo de cultivos con mayor valor nutricional e industrial y su posible impacto positivo en la sostenibilidad productiva y ambiental en un marco de cambio climático global hace necesario rever los marcos regulatorios que la restringen.

Referencias

- 1 D Zhang, A Hussain, H Manghwar, K Xie, S Xie, S Zhao *et al.* Genome editing with the CRISPR-Cas system: an art, ethics and global regulatory perspective. **Plant Biotechnol. J.**, **18**, 1651-1669 (2020).
- 2 H Puchta. The repair of double-strand breaks in plants: Mechanisms and consequences for genome evolution. **J. Exp. Bot.**, **56**, 1-14 (2005).
- 3 C Schmidt, M Pacher, H Puchta. DNA Break Repair in Plants and Its Application for Genome Engineering. En: *Transgenic Plants: Methods and Protocols*. Kumar S, Barone P, Smith M (Eds.). Springer New York: New York, NY, pp 237-266 (2019).
- 4 TK Huang, H Puchta. CRISPR/Cas-mediated gene targeting in plants: finally a turn for the better for homologous recombination. **Plant Cell Rep.**, **38**, 443-453 (2019).
- 5 S Arnould, C Delenda, S Grizot, C Desseaux, F Pâques, GH Silva *et al.* The I-CreI meganuclease and its engineered derivatives: applications from cell modification to gene therapy. **Protein Eng. Des. Sel.**, **24**, 27-31 (2011).
- 6 D Carroll. Genome Editing: Past, Present, and Future. **Yale J. Biol. Med.**, **90**, 653-659 (2017).
- 7 JA Doudna, E Charpentier. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. **Science**, **346** (6213), Article Number 1258096, 9 pages (2014).
- 8 F Jiang, JA Doudna. CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms. **Ann. Rev. Biophys.**, **46**, 505-529 (2017).
- 9 M Jinek, K Chylinski, I Fonfara, M Hauer, JA Doudna, E Charpentier. A Programmable Dual-RNA – Guided. **Science**, **337**, 816-822 (2012).
- 10 Y Ishino, H Shinagawa, K Makino, M Amemura, A Nakata. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. **J. Bacteriol.**, **169**, 5429-5433 (1987).
- 11 FJM Mojica, G Juez, F Rodriguez-Valera. Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites. **Mol. Microbiol.**, **9**, 613-621 (1993).
- 12 M Morange. What history tells us XXXVII. CRISPR-Cas: The discovery of an immune system in prokaryotes. **J. Biosci.**, **40**, 221-223 (2015).
- 13 R Jansen, JDA van Embden, W Gaastra, LM Schouls. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. **Mol. Microbiol.**, **43**, 1565-1575 (2002).
- 14 KS Makarova, L Aravind, NV Grishin, IB Rogozin, EV Koonin. A DNA repair system specific for thermophilic Archaea and bacteria predicted by genomic context analysis. **Nucleic Acids Res.**, **30**, 482-496 (2002).
- 15 FJM Mojica, C Díez-Villaseñor, J García-Martínez, E Soria. Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements. **J. Mol. Evol.**, **60**, 174-182 (2005).
- 16 C Pourscel, G Salvignol, G Vergnaud. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. **Microbiology**, **151**, 653-663 (2005).
- 17 A Bolotin, B Quinquis, A Sorokin, SD Ehrlich. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. **Microbiology**, **151**, 2551-2561 (2005).
- 18 R Barrangou, C Fremaux, H Deveau, M Richards, P Boyaval, S

- Moineau *et al.* CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. **Science**, **315**, 1709-1712 (2007).
- 19 SJJ Brouns, MM Jore, M Lundgren, ER Westra, RJH Slijkhuis, APL Snijders *et al.* Small CRISPR RNAs Guide Antiviral Defense in Prokaryotes. **Science**, **321**, 960-964 (2008).
- 20 R Sapranauskas, G Gasiunas, C Fremaux, R Barrangou, P Horvath, V Siksnys. The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. **Nucleic Acids Res.**, **39**, 9275-9282 (2011).
- 21 E Deltcheva, K Chylinski, CM Sharma, K Gonzales, Y Chao, ZA Pirzada *et al.* CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. **Nature**, **471**, 602-607 (2011).
- 22 L Cong, FA Ran, D Cox, S Lin, R Barretto, N Habib *et al.* Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. **Science**, **339**, 819-823 (2013).
- 23 Q Shan, Y Wang, J Li, Y Zhang, K Chen, Z Liang *et al.* Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. **Nat. Biotechnol.**, **31**, 686-688 (2013).
- 24 JF Li, JE Norville, J Aach, M McCormack, D Zhang, J Bush *et al.* Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. **Nat. Biotechnol.**, **31**, 688-691 (2013).
- 25 V Nekrasov, B Staskawicz, D Weigel, JDG Jones, S Kamoun. Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. **Nat. Biotechnol.**, **31**, 691-693 (2013).
- 26 S Shmakov, A Smargon, D Scott, D Cox, N Pyzocha, W Yan *et al.* Diversity and evolution of class 2 CRISPR-Cas systems. **Nat. Rev. Microbiol.**, **15**, 169-182 (2017).
- 27 K Belhaj, A Chaparro-Garcia, S Kamoun, V Nekrasov. Plant genome editing made easy: targeted mutagenesis in model and crop plants using the CRISPR/Cas system. **Plant Methods**, **9**, 39 (2013).
- 28 L Arora, A Narula. Gene Editing and Crop Improvement Using CRISPR-Cas9 System. **Front. Plant Sci.**, **8**, 1932 (2017).
- 29 K Chen, Y Wang, R Zhang, H Zhang, C Gao. CRISPR/Cas Genome Editing and Precision Plant Breeding in Agriculture. **Ann. Rev. Plant Biol.**, **70**, 667-697 (2019).
- 30 SS Nadakuduti, CR Buell, DF Voytas, CG Starker, DS Douches. Genome Editing for Crop Improvement – Applications in Clonally Propagated Polyploids With a Focus on Potato (*Solanum tuberosum* L.). **Front. Plant Sci.**, **9**, 1-11 (2018).
- 31 CL Soyars, BA Peterson, CA Burr, ZL Nimchuk. Cutting edge genetics: Crispr/cas9 editing of plant genomes. **Plant Cell Physiol.**, **59**, 1608-1620 (2018).
- 32 F Wolter, P Schindele, H Puchta. Plant breeding at the speed of light: the power of CRISPR/Cas to generate directed genetic diversity at multiple sites. **BMC Plant Biol.**, **19**, 176 (2019).
- 33 Y Zhang, M Pribil, M Palmgren, C Gao. A CRISPR way for accelerating improvement of food crops. **Nat. Food**, **1**, 200-205 (2020).
- 34 H Zhu, C Li, C Gao. Applications of CRISPR-Cas in agriculture and plant biotechnology. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, **21**, 661-677 (2020).
- 35 LT Hickey, A N. Hafeez, H Robinson, SA Jackson, SCM Leal-Bertioli, M Tester *et al.* Breeding crops to feed 10 billion. **Nat. Biotechnol.**, **37**, 744-754 (2019).
- 36 D Rodríguez-Leal, ZH Lemmon, J Man, ME Bartlett, ZB Lippman. Engineering Quantitative Trait Variation for Crop Improvement by Genome Editing. **Cell**, **171**, 470-480 (2017).
- 37 R Mishra, RK Joshi, K Zhao. Genome Editing in Rice: Recent Advances, Challenges, and Future Implications. **Front. Plant Sci.**, **9**, 1361 (2018).
- 38 J Zhou, X Xin, Y He, H Chen, Q Li, X Tang *et al.* Multiplex QTL editing of grain-related genes improves yield in elite rice varieties. **Plant Cell Rep.**, **38**, 475-485 (2019).
- 39 MN González, GA Massa, M Andersson, H Turesson, N Olsson, AS Fält *et al.* Reduced Enzymatic Browning in Potato Tubers by Specific Editing of a Polyphenol Oxidase Gene via Ribonucleo-protein Complexes Delivery of the CRISPR/Cas9 System. **Front. Plant Sci.**, **10**, 1-12 (2020).
- 40 A Tuncel, KR Corbin, J Ahn-Jarvis, S Harris, E Hawkins, MA Smedley *et al.* Cas9-mediated mutagenesis of potato starch-branching enzymes generates a range of tuber starch phenotypes. **Plant Biotechnol. J.**, **17**, 2259-2271 (2019).
- 41 X Zhao, S Jayarathna, H Turesson, AS Fält, G Nestor, MN González *et al.* Amylose starch with no detectable branching developed through DNA-free CRISPR-Cas9 mediated mutagenesis of two starch branching enzymes in potato. **Sci. Rep.**, **11**, 4311 (2021).
- 42 S Sánchez-León, J Gil-Humanes, CV Ozuna, MJ Giménez, C Sousa, DF Voytas *et al.* Low-gluten, nontransgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9. **Plant Biotechnol. J.**, **16**, 902-910 (2018).
- 43 J Shi, H Gao, H Wang, HR Lafitte, RL Archibald, M Yang *et al.* ARGOS8 variants generated by CRISPR-Cas9 improve maize grain yield under field drought stress conditions. **Plant Biotechnol. J.**, **15**, 207-216 (2017).
- 44 NP Kieu, M Lenman, ES Wang, BL Petersen, E Andreasson. Mutations introduced in susceptibility genes through CRISPR/Cas9 genome editing confer increased late blight resistance in potatoes. **Sci. Rep.**, **11**, 4487 (2021).
- 45 R Mishra, RK Joshi, Z Zhao. Base editing in crops: current advances, limitations and future implications. **Plant Biotechnol. J.**, **18**, 20-31 (2020).
- 46 TK Huang, H Puchta. Novel CRISPR/Cas applications in plants: from prime editing to chromosome engineering. **Transgenic Res.** (2021). doi:10.1007/s11248-021-00238-x.
- 47 DS Aliaga Goltsman, LM Alexander, AE Devoto, JB Albers, J Liu, CN Butterfield *et al.* Novel Type V-A CRISPR Effectors Are Active Nucleases with Expanded Targeting Capabilities. **Cris. J.**, **3**, 454-461 (2020).
- 48 MN González, GA Massa, M Andersson, CA Décima Oneto, H Turesson, L Storani *et al.* Comparative potato genome editing: *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation and protoplasts transfection delivery of CRISPR/Cas9 components

- directed to StPPO2 gene. **Plant Cell, Tissue Organ. Cult.** (2021). doi:10.1007/s11240-020-02008-9.
- 49 Y Ran, Z Liang, C Gao. Current and future editing reagent delivery systems for plant genome editing. **Sci. China Life Sci.**, **60**, 490-505 (2017).
- 50 JW Woo, J Kim, S Il Kwon, C Corvalán, SW Cho, H Kim *et al.* DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. **Nat. Biotechnol.**, **33**: 1162-1164 (2015).
- 51 M Andersson, H Turesson, N Olsson, AS Fält, P Ohlsson, MN Gonzalez *et al.* Genome editing in potato via CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein delivery. **Physiol. Plant**, **164**, 378-384 (2018).
- 52 CS Lin, CT Hsu, LH Yang, LY Lee, JY Fu, QW Cheng *et al.* Application of protoplast technology to CRISPR/Cas9 mutagenesis: from single-cell mutation detection to mutant plant regeneration. **Plant Biotechnol. J.**, **16**, 1295-1310 (2018).
- 53 SS Nadakuduti, F Enciso-Rodríguez. Advances in Genome Editing With CRISPR Systems and Transformation Technologies for Plant DNA Manipulation. **Front. Plant Sci.**, **11**, 2267 (2021).
- 54 Eckerstorfer MF, Engelhard M, Heissenberger A, Simon S, Teichmann H. Plants Developed by New Genetic Modification Techniques—Comparison of Existing Regulatory Frameworks in the EU and Non-EU Countries. **Front. Bioeng. Biotechnol.**, **7**, 26 (2019).
- 55 R Lassoued, DM Macall, SJ Smyth, PWB Phillips, H Hessel. How should we regulate products of new breeding techniques? Opinion of surveyed experts in plant biotechnology. **Biotechnol. Reports**, **26**, e00460 (2020).
- 56 T Ishii, M Araki. A future scenario of the global regulatory landscape regarding genome-edited crops. **GM Crops Food**, **8**, 44-56 (2017).
- 57 HD Jones. Challenging regulations: Managing risks in crop biotechnology. **Food Energy Secur.**, **4**, 87-91 (2015).
- 58 SE Feingold, V Bonnacarrère, A Nepomuceno, P Hinrichsen, L Cardozo Tellez, H Molinari *et al.* Edición génica: una oportunidad para la región. **Rev. Investig. Agrop.**, **44**, 424-427 (2018).
- 59 D Eriksson, D Kershen, A Nepomuceno, BJ Pogson, H Prieto, K Purnhagen *et al.* A comparison of the EU regulatory approach to directed mutagenesis with that of other jurisdictions, consequences for international trade and potential steps forward. **New Phytol.**, **222**, 1673-1684 (2019).
- 60 MA Lema. Regulatory aspects of gene editing in Argentina. **Transgenic Res.**, **28**, 147-150 (2019).
- 61 <https://curia.europa.eu/jcms/upload/docs/application/pdf/2018-07/cp180111en.pdf>



Preparación y propiedades ópticas de películas multicapas $ZrO_2/Ag/ZrO_2$ depositadas por evaporación de haz de electrones

Jesús A. Rodríguez^{*1}, B. Conquet¹, Ch. Power²

¹) Centro Nacional de Tecnologías Ópticas (CNTO), Centro de Investigaciones de Astronomía (CIDA)
Mérida 5101, Venezuela

²) Centro de Estudios en Semiconductores (CES), Departamento de Física, Facultad de Ciencias
Universidad de Los Andes, Mérida 5101, Venezuela

(*) jarr_20_15@hotmail.com

Recibido: 09/12/2020

Revisado: 25/03/2021

Aceptado: 14/04/2021

Resumen

En este trabajo se presenta la preparación de películas multicapas $ZrO_2/Ag/ZrO_2$ depositadas a temperatura ambiente sobre sustratos de vidrio comercial soda-lime por evaporación mediante haz de electrones, como candidatos para aplicaciones en espejos transparentes reflectantes de calor (THM). Las propiedades ópticas de transmitancia y reflectancia se investigaron en función de los espesores de las capas componentes de Ag y ZrO_2 , estos se variaron para lograr una alta transmitancia visible y una reflectancia máxima en el NIR en los sistemas dieléctrico/metal/dieléctrico (D/M/D). La película multicapa $ZrO_2(45nm)/Ag(22nm)/ZrO_2(45nm)$ optimizada presentó una alta transmitancia visible de 73% y alta reflectancia NIR > 92% con una figura de mérito factor-Z máxima de 0,56 y una longitud de onda de corte λ_c de 807 nm mostrando la mejor selectividad espectral como recubrimiento THM.

Palabras claves: espejo de calor transparente; divisor de haz; películas delgadas; transmitancia; evaporación por haz de electrones

Abstract

This work presents the preparation of multilayer $ZrO_2/Ag/ZrO_2$ films deposited at room temperature on commercial glass substrates soda-lime by electron beam evaporation, as candidates for applications in transparent heat reflective mirrors (THM). The optical properties of transmittance and reflectance were investigated based on the thickness of the Ag and ZrO_2 component layers, these were varied to achieve high visible transmittance and maximum reflectance at NIR in dielectric/metal/dielectric systems (D/M/D). The optimized $ZrO_2(45nm)/Ag(22nm)/ZrO_2(45nm)$ multilayer film had a high visible transmittance of 73% and a high NIR reflectance > 92% with a maximum factor-Z figure of 0,56 and a cutoff wavelength λ_c of 807 nm presenting the best spectral selectivity as coating THM.

Keywords: Transparent heat mirror; Beam splitter; Thin films; Transmittance; Electron beam evaporation

Introducción

Los recubrimientos dieléctricos de película delgada multicapa se han utilizado ampliamente para fabricar componentes ópticos como espejos de alta reflexión¹, filtros de paso de banda y divisores de haz². El óxido de Zirconio (zirconia, ZrO_2) es uno de los óxidos de metales de transición mejor estudiados en campos ópticos. Debido a las propiedades como el alto índice de refracción, el intervalo de la brecha de banda óptica (5,1-7,8 eV) y la transmitancia en la región visible. Este material se emplea en áreas de la óptica que incluyen espejos de alta reflectancia, filtros de interferencia de banda ancha y dispositivos electro-ópticos³⁻⁶. Por su parte, la plata (Ag) es uno de los metales adecuados que se manejan en aplicaciones optoelectrónica debido a su alta transmitancia en el visible en peli-

culas delgadas, índice de refracción bajo en la región visible del espectro solar $n_{Ag} = 0,05^7$ y también es una película conductora que exhibe una alta reflectancia en las regiones del infrarrojo cercano NIR e infrarrojo IR debido a su densidad de electrones, con la absorción más baja en la región visible del espectro solar⁸. La combinación de estas propiedades permite que estos materiales puedan utilizarse como recubrimientos en tecnologías de dispositivos de espejos transparentes reflectantes de calor (THM), que consisten en la construcción de tres capas de dieléctrico/metal/dieléctrico (D/M/D) sobre un sustrato de vidrio para recubrimientos espectralmente selectivos con diversos fines, incluida la eficiencia energética⁹⁻¹¹. Uno de los requisitos ópticos importantes para el THM es la alta transmitancia en la región visible¹². Las capas dieléctricas proporcionan varias ventajas, actúan como recubrimientos

antirreflectantes¹³ y protegen la película metálica intermedia de los efectos ambientales como la abrasión y corrosión¹⁴. Los THM son transparentes para la luz visible y reflejan la radiación solar infrarroja IR. Estos espejos se utilizan para obtener eficiencia energética cuando el sobrecalentamiento por un aporte solar es un problema. Las capas D/M/D sobre un sustrato de vidrio podrían usarse como un filtro que refleja la radiación IR y transmite la mayor parte del espectro visible¹⁵.

Recientemente, ha habido interés en la búsqueda de nuevas rutas de fabricación para la preparación de este tipo de sistemas multicapas D/M/D a través de diversos métodos de deposición¹⁶⁻¹⁸. Pero pocos reportes se han encontrado con el material dieléctrico ZrO_2 ¹⁹. Como parte de los estudios en curso sobre los THM, se presenta en este trabajo la fabricación y el estudio de las propiedades ópticas de las multicapas $ZrO_2/Ag/ZrO_2$ con diferentes espesores a través de la técnica de deposición por evaporación mediante haz de electrones.

Parte experimental

Las películas delgadas multicapa $ZrO_2/Ag/ZrO_2$ se depositaron en forma consecutiva sobre sustratos de vidrio comercial soda-lime mediante un sistema de evaporación por haz de electrones^{20,21} Ferrotec EVM-4 en el equipo de deposición de recubrimientos ORTUS-700 IZOVAC. Los blancos utilizados fueron el cerámico ZrO_2 (Umicore 99,99%) y Ag (Plasmaterials 99,995%) a temperatura ambiente bajo una presión base $1,3 \times 10^{-3}$ Pa. Antes de cargar los sustratos con dimensiones (40 mm x 3,5 mm) dentro de la cámara de deposición, todos fueron limpiados con acetona, etanol, y agua desionizada durante 15 min para cada agente limpiador en un baño ultrasónico, y finalmente secados en un flujo de N_2 . Los blancos granulares fueron pre- evaporados durante 30 min para remover los contaminantes de su superficie. Posteriormente, el ZrO_2 fue evaporado utilizando un voltaje de aceleración y una corriente de haz de electrones de 7 kV y 80 mA, respectivamente. Para la Ag los valores correspondientes fueron de 7 kV y 15 mA. Durante la deposición los sustratos de vidrio fueron rotados a una velocidad constante de 20 rpm. Las tres capas se depositaron sin romper el vacío en la cámara con una presión de trabajo de $2,6 \times 10^{-3}$ Pa y una velocidad de deposición de 3 nm s^{-1} . Los espesores de las capas del dieléctrico ZrO_2 se fijaron en un valor arbitrario entre (43-48 nm) cercano al espesor óptimo calculado de 43,60 nm con el software *OpenFilters* empleando el método de Needle²². Los espesores de las películas delgadas se controlaron con un monitor de cuarzo.

Las medidas ópticas de transmitancia (T) y reflectancia (R) con incidencia normal de las películas delgadas multicapa fueron realizadas en el rango de longitud de onda 250-2500 nm utilizando un espectrofotómetro Cary Series 5000 UV-VIS-NIR. El rendimiento de los sistemas multicapa se evaluó mediante la figura de mérito factor-Z previamente reportada²³. La morfología de la capa Ag se realizó me-

dante microscopía de fuerza atómica (AFM) con el equipo NaniteAFM en modo dinámico (*tapping*) con una frecuencia de 170 kHz.

Resultados

Transmitancia y reflectancia de las películas multicapa $ZrO_2/Ag/ZrO_2$

En la figura 1 se muestran los espectros de transmitancia de las películas multicapas $ZrO_2/Ag/ZrO_2$ depositadas sobre sustrato de vidrio comercial soda-lime. A partir de estos se identificaron los efectos del espesor de la capa ZrO_2 sobre las propiedades ópticas del recubrimiento dieléctrico/metal/dieléctrico. La transmitancia en la región visible de 400-800 nm aumentó en función del espesor, esto se debe a la propiedad antirreflectante de la película delgada de ZrO_2 ²⁴. Por su parte, cuando el espesor de la capa de Ag es más bajo, la transmitancia fue alta, pero la reflectancia en la región del NIR de 800-2500 nm fue muy débil de 55%. Esto demuestra que las películas multicapas con espesores de Ag menores siguen crecimiento Volmer-Weber (es decir morfología tipo isla)²⁵.

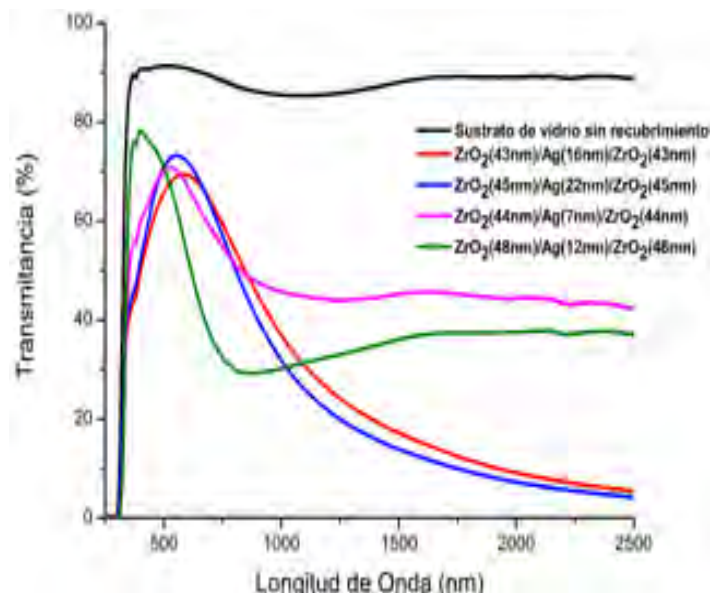
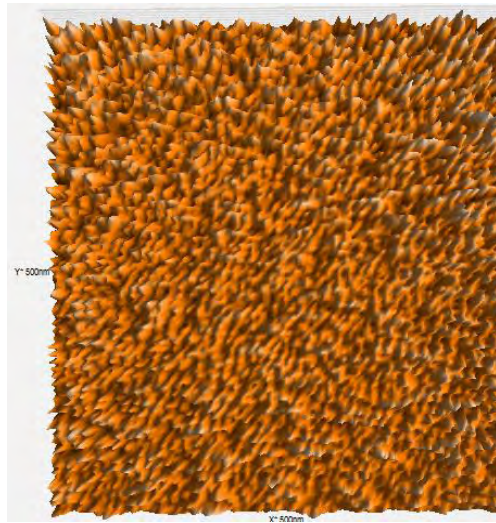
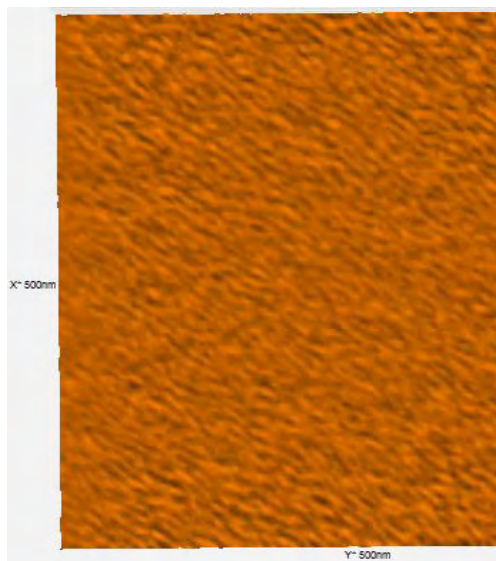


Fig. 1: Espectro de transmitancia de las películas multicapa $ZrO_2/Ag/ZrO_2$ a diferentes espesores de ZrO_2 y Ag.

La figura 2 muestra las imágenes AFM de la topografía de las películas de Ag depositadas con un espesor de 7 nm y 22 nm. Se observa que el aumento del espesor de la capa de Ag presenta como resultado una transición de la forma de la superficie de islas a una película continua. El crecimiento en isla no es adecuado según lo informado previamente para aplicaciones de THM^{16,26}. Se requiere una película de Ag continua para obtener una buena selectividad y estabilidad en el sistema multicapa dieléctrico/Ag/ dieléctrico D/M/D^{7,25}. Como consecuencia al aumentar el espesor de Ag entre 16-22 nm se mejora la reflectancia por encima del 90% como se observa en la figura 3.



(a)



(b)

Fig. 2: Imágenes AFM en modo tapping ($0,5 \times 0,5 \mu\text{m}^2$) de las películas de Ag depositadas en una capa de 45 nm de espesor de ZrO_2 para diferentes espesores de Ag: (a) 7 nm Ag, (b) 22 nm Ag.

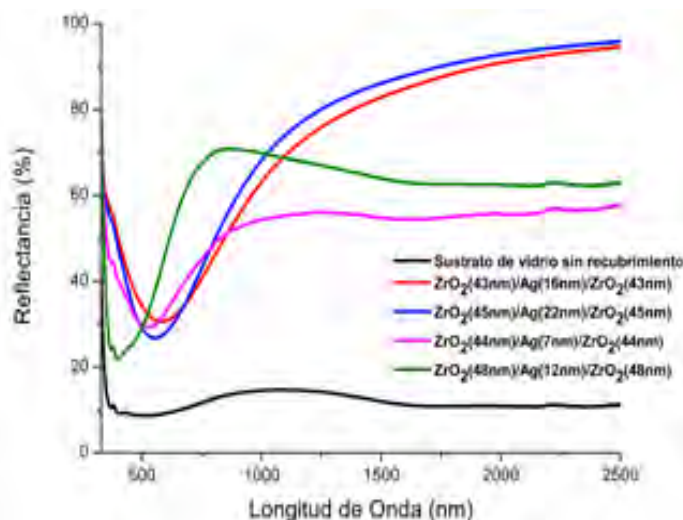


Fig. 3: Espectro de reflectancia de las películas multicapa $\text{ZrO}_2/\text{Ag}/\text{ZrO}_2$ a diferentes espesores de ZrO_2 y Ag.

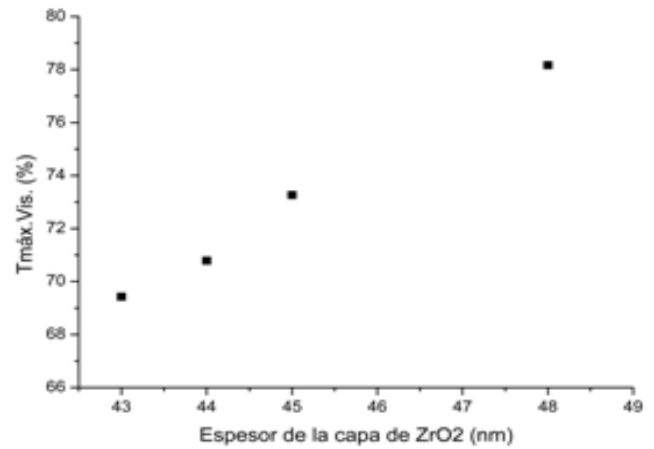


Fig. 4: Transmitancia máxima en el visible de las películas multicapa $\text{ZrO}_2/\text{Ag}/\text{ZrO}_2$ a diferentes espesores de ZrO_2 .

La figura 4 proporciona el gráfico de la variación de la transmitancia máxima en el visible con el aumento del espesor de la capa de ZrO_2 para cada sistema multicapa. A partir de estos estudios, se observó un aumento en la transmitancia máxima del visible desde un 69% hasta el 78% en función del espesor, evidenciando el efecto antirreflectante de la película delgada de ZrO_2 y lo informado previamente donde las capas del dieléctrico superior e inferior deben tener el mismo espesor para obtener la máxima transmitancia en un divisor espectral $D/M/D$ ^{7,16,27}.

La figura 5 muestra el cambio de la reflectancia a una longitud de onda de 2000 nm con una variación del espesor de la capa de Ag. La película de Ag es la principal responsable de la alta reflectancia en la región NIR debido a su alta densidad de electrones libres²⁵. Por lo tanto, cuando el grosor de Ag aumenta en el sistema de capas múltiples $D/M/D$ ($\text{ZrO}_2/\text{Ag}/\text{ZrO}_2$) de 7 a 22 nm, la reflectancia en el NIR aumentó sustancialmente de 44 a 93% a 2000 nm. Cabe señalar que los resultados (es decir, alta transmitancia en el visible y alta reflectancia NIR) obtenidos en el presente estudio están a la par con las películas multicapas de divisores de haz espectral informados en otros reportes^{19,28,29}.

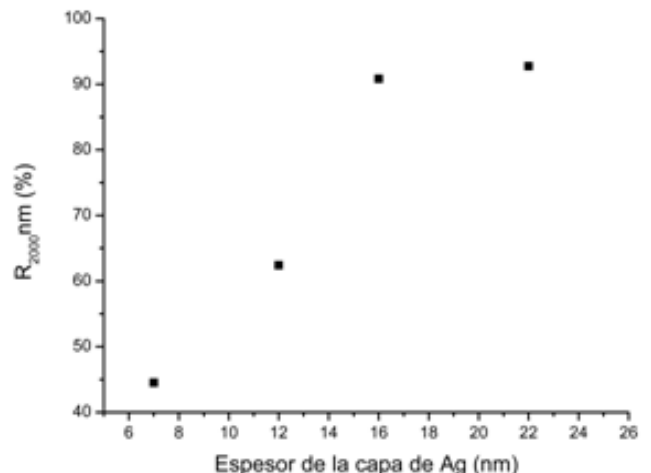


Fig. 5: Reflectancia a 2000 nm en función del espesor de Ag en las películas multicapa $\text{ZrO}_2/\text{Ag}/\text{ZrO}_2$.

Figura de mérito factor-Z de las películas multicapa $ZrO_2/Ag/ZrO_2$

El rendimiento de las películas multicapa $ZrO_2/Ag/ZrO_2$ como espejos transparentes reflectantes de calor (THM) se evaluaron mediante la figura de mérito factor-Z, un divisor de haz espectral ideal debería poseer el factor-Z más alto. Pero en la práctica, no es posible lograr una transmitancia visible integrada $T_{av}=1$ en la región visible y una reflectancia integrada en el NIR $R_{av}=1$ al mismo tiempo. En consecuencia, el factor-Z siempre será menor que 1. La figura 6 y 7 muestran la T_{av} y R_{av} de las multicapas en función del espesor de la capa de ZrO_2 y Ag, respectivamente. Se evidencia que a mayores espesores de la capa de Ag, R_{av} aumentó. Mientras tanto, T_{av} aumentó marginalmente con el incremento del espesor de la capa de ZrO_2 .

Hemos calculado el factor-Z para diferentes espesores de Ag y los datos se muestran en la figura 8. Cuando el espesor de Ag está por debajo del espesor crítico necesario para una película de Ag continua, es decir, por debajo de 15 nm^7 , el factor-Z era más bajo. Y al aumentar el espesor de la película de Ag, el factor-Z aumentó. El factor-Z máximo de 0,56 se logró cuando el grosor de Ag fue de 22 nm.

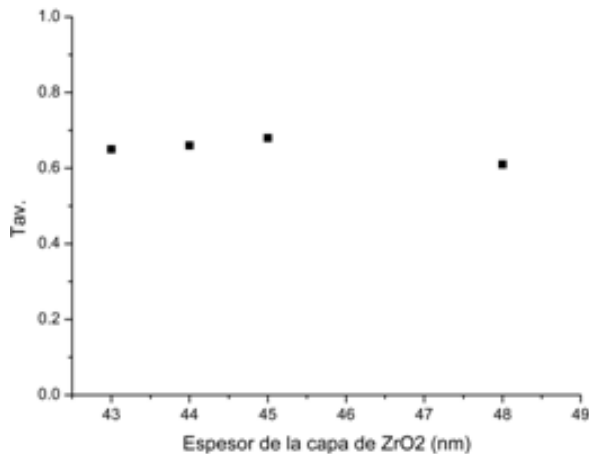


Fig. 6: Transmitancia visible integrada (T_{av}) en función del espesor de ZrO_2 en las películas multicapa $ZrO_2/Ag/ZrO_2$.

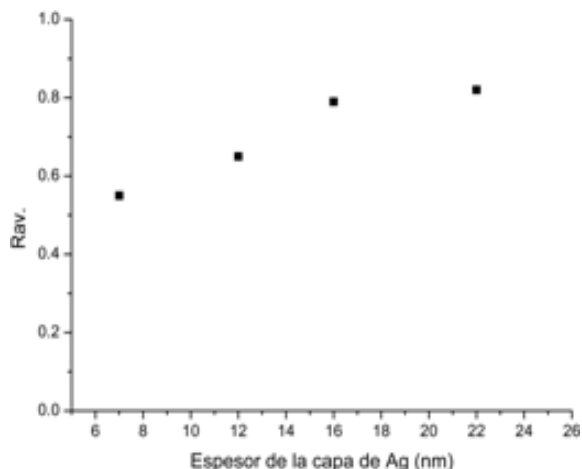


Fig. 7: Reflectancia integrada en el NIR (R_{av}) como función del espesor de Ag en las películas multicapa $ZrO_2/Ag/ZrO_2$.

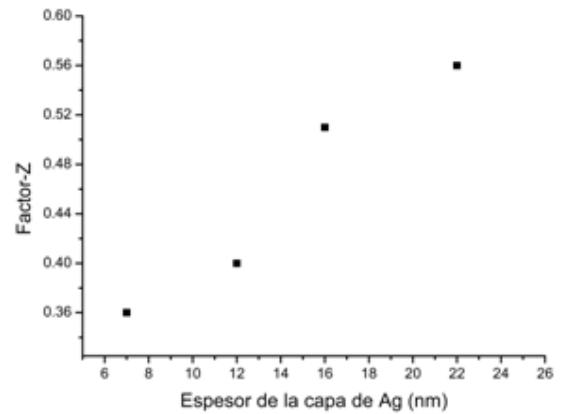


Fig. 8: Figura de mérito factor-Z a diferentes espesores de Ag en el sistema multicapa $ZrO_2/Ag/ZrO_2$.

Con ello se evidencia que la mejor selectividad espectral para el sistema multicapa de $ZrO_2/Ag/ZrO_2$ como requerimientos de recubrimientos en tecnologías de dispositivos de espejos transparente reflectantes de calor (THM), se puede lograr cuando el espesor de Ag es cercano a 22 nm. Este sistema con esas condiciones presentó una longitud de onda de corte λ_c de 807 nm, aproximado al rango adecuado para aumentar la eficiencia energética en aplicaciones de sistemas híbridos fotovoltaico/termoeléctrico (PV/TE) según lo calculado en el reporte anterior³⁰.

Conclusiones

Se desarrollaron las películas delgadas multicapa $ZrO_2/Ag/ZrO_2$. Los espesores de la capa metálica de Ag y el material dieléctrico ZrO_2 se variaron para lograr una alta transmitancia en el visible y una alta reflectancia NIR. Los resultados de la figura de mérito factor-Z demostraron que los espesores de las capas de Ag e ZrO_2 optimizados fueron de 22 y 45 nm, respectivamente. El recubrimiento multicapa (D/M/D) optimizado presentó una alta transmitancia en el visible de 73% y alta reflectancia NIR de 93%, con características prometedoras para la implementación a gran escala en aplicaciones de espejos transparentes reflectantes de calor (THM).

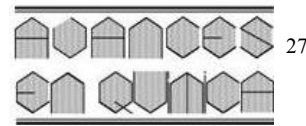
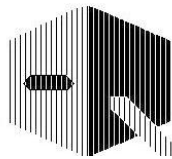
Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado gracias al Centro de investigaciones de Astronomía (CIDA) en el departamento del Centro Nacional de Tecnologías Ópticas (CNTO)

Referencias

1. J González-Hernández, BS Chao, SR Ovshinsky, DD Allred. The Structure of W/C ($0.15 < \gamma < 0.8$) multilayers Annealed in argon or air. **Journal of X-Ray Science and Technology**, **6(1)**, 1-31 (1996).
2. D Bhattacharyya, NK Sahoo, S Thakur, NC Das. Spectroscopic ellipsometry of multilayer dielectric coatings. **Vacuum**, **60(4)**, 419-424 (2001).
3. WH Lowdermilk, D Milam, F Rainer. Optical coatings for laser

- fusion applications. **Thin Solid Films**, **73(1)**, 155-166 (1980).
4. HJ Qi, LH Huang, ZS Tang, CF Cheng, JD Shao, ZX Fan. Roughness evolution of ZrO₂ thin films grown by reactive ion beam sputtering. **Thin Solid Films**, **444(1)**, 146-152 (2003).
 5. S Shao, Z Fan, J Shao, H He. Evolutions of residual stress and microstructure in ZrO₂ thin films deposited at different temperatures and rates. **Thin Solid Films**, **445(1)**, 59-62 (2003).
 6. A Hojabri. Structural and optical characterization of ZrO₂ thin films grown on silicon and quartz substrates. **Journal of Theoretical and Applied Physics**, **10(3)**, 219-224 (2016).
 7. C Lee, S Chen, C Jaing. Optical monitoring of silver-based transparent heat mirrors. **Applied Optics**, **35(28)**, 5698-5703 (1996).
 8. CC Fan, J Bachner. Transparent heat mirrors for solar-energy applications. **Applied Optics**, **15(4)**, 1012-1017 (1976).
 9. MF Al-Kuhaili, AH Al-Aswad, SM Durrani, IA Bakhtiari. Energy-saving transparent heat mirrors based on tungsten oxide-gold WO₃/Au/WO₃ multilayer structures. **Solar Energy**, **86(11)**, 3183-3189 (2012).
 10. GK Dalapati, SM Panah, ST Chua, M Sharma, TI Wong, HR Tan, *et al.* Color tunable low cost transparent heat reflector using copper and titanium oxide for energy saving application. **Scientific Reports**, **6(1)**, 1-14 (2016).
 11. CG Granqvist. Electrochromics for smart windows: Oxide-based thin films and devices. **Thin Solid Films**, **564(15)**, 1-38 (2014).
 12. MM Hasan, AB Malek, AS Haseeb, HH Masjuki. Investigations on TiO₂ and Ag based single and multilayer films for window glazings. **Journal of Engineering and Applied Sciences**, **5(9)**, 22-28 (2010).
 13. H Kostlin, G. Frank. Optimization of transparent heat mirrors based on a thin silver film between antireflection films. **Thin Solid Films**, **89(3)**, 287-293 (1982).
 14. CM Lampert. Heat mirror coatings for energy conserving windows. **Solar Energy Materials**, **6(1)**, 1-41 (1981).
 15. AM Al-Shukri. Thin film coated energy-efficient glass windows for warm climates. **Desalination**, **209(1)**, 290-297 (2007).
 16. MF Al-Kuhaili, AH Al-Aswad, SM Durrani, IA Bakhtiari. Transparent heat mirrors based on tungsten oxide-silver multilayer structures. **Solar Energy**, **83(9)**, 1571-1577 (2009).
 17. HJ Kim, KW Seo, YH Kim, J Choi, H Kim. Direct laser patterning of transparent ITO-Ag-ITO multilayer anodes for organic solar cells. **Applied Surface Science**, **328(5)**, 215-221 (2015).
 18. M Alam, M Rahman, M Basher, M Vasiliev, K Alameh. Optical and chromaticity properties of metal-dielectric composite-based multilayer thin-film structures prepared by rf magnetron sputtering. **Coatings**, **10(3)**, 251-254 (2020).
 19. D Dimova, K Lovchinov, M Petrov, D Karashanova, O Angelov. Structural, optical and electrical properties of multilayer stacks ZnO:Al/Ag/ZnO:Al and ZrO₂/Ag/ZrO₂. **Energy Procedia**, **60(17)**, 143-147 (2014).
 20. J Domaradzki, D Kaczmarek, M Mazur, D Wojcieszak, J Halarewicz, S Glodek, *et al.* Investigations of optical and surface properties of Ag single thin film coating as semitransparent heat reflective mirror. **Materials Science-Poland**, **34(4)**, 747-753 (2016).
 21. S Wu, H Zhang, G Tian, Z Xia, J Shao, Z Fan. Y₂O₃ stabilized ZrO₂ thin films deposited by electron beam evaporation: Structural, morphological characterization and laser induced damage threshold. **Applied Surface Science**, **253(3)**, 1561-1565 (2006).
 22. S Larouche, L Martinu. OpenFilters: open-source software for the design, optimization, and synthesis of optical filters. **Applied optics**, **47(13)**, C219-C230 (2008).
 23. SM Durrani, EE Khawaja, AM Al-Shukri, MF Al-Kuhaili. Dielectric/Ag/dielectric coated energy-efficient glass windows for warm climates. **Energy and Buildings**, **36(9)**, 891-898 (2004).
 24. WJ Shin, WH Huang, M Tao. Low-cost spray-deposited ZrO₂ for antireflection in Si solar cells. **Materials Chemistry and Physics**, **230(10)**, 37-43 (2019).
 25. Z Wang, X Cai, Q Chen, L Li. Optical properties of metal-dielectric multilayers in the near UV region. **Vacuum**, **80(5)**, 438-443 (2006).
 26. H Lee, J Na, Y Moon, T Seong, S Kim. Design of near-unity transmittance dielectric/Ag/ITO electrodes for GaN-based light-emitting diodes. **Current Applied Physics**, **15(7)**, 833-838 (2015).
 27. K Hong, K Kim, S Kim, I Lee, H Cho, S Yoo, *et al.* Optical properties of WO₃/Ag/WO₃ multilayer as transparent cathode in top-emitting organic light emitting diodes. **The Journal of Physical Chemistry C**, **115(8)**, 3453-3459 (2011).
 28. K Lin, R Lin, W Hsiao, Y Kang, C Chou, Y Wang. Effects of the structural properties of metal oxide/Ag/metal oxide multilayer transparent electrodes on their optoelectronic performances. **Journal of Materials Science: Materials in Electronics**, **28(16)**, 12363-12371 (2017).
 29. H Nezhad, H Haratizadeh, M Kari. Influence of Ag mid-layer in the optical and thermal properties of ZnO/Ag/ZnO thin films on the glass used in buildings as insulating glass unit (IGU). **Ceramics International**, **45(8)**, 9950-9954 (2019).
 30. X Ju, Z Wang, G Flamant, P Li, W Zhao. Numerical analysis and optimization of a spectrum splitting concentration photovoltaic-thermoelectric hybrid system. **Solar Energy**, **86(6)**, 1941-1954 (2012).



Síntesis y caracterización estructural de un derivado del ácido α -hidroxicarboxílico

Lusbely M. Belandria, Belkis Ramírez, Marilia Guillén, Asiloé J. Mora, Gerzon E. Delgado*

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

(*) gerzon@ula.ve

Recibido: 16/02/2021

Revisado: 03/03/2021

Aceptado: 10/03/2021

Resumen

Se presenta la síntesis y análisis estructural de un derivado de cesio del ácido bencílico. Este complejo se preparó en medio acuoso y se caracterizó mediante técnicas de difracción de rayos-X en muestras policristalinas y cristal único. El complejo cristaliza en el sistema ortorrómbico con grupo espacial *Pbca* y un empaquetamiento cristalino que se rige por interacciones de enlace de hidrógeno del tipo O-H...O. Alrededor del átomo central de cesio se forma una esfera de coordinación de 7 átomos de oxígeno provenientes de 4 moléculas del bencilato y dos moléculas de agua. La eficiencia de empaquetamiento es del 76,6%.

Palabras claves: ácidos α -hidroxicarboxílicos; complejo de metal alcalino; difracción de rayos-X; estructura cristalina

Abstract

The synthesis and structural characterization of one benzilic acid cesium derivative is present. This complex was prepared in aqueous media and characterized by mean of powder and single-crystal X-ray diffraction. The complex crystallize in an orthorhombic cell with space group *Pbca*, with a packing governed by hydrogen bond interactions of the type O-H...O. Around the cesium central atom is formed a coordination sphere of 7 oxygen atoms from 4 benzilate molecules and 2 water molecules. The efficiency of packing is 76.6%.

Keywords: α -hidroxicarboxylic acid; Alkaline metal complex; X-ray diffraction; Crystal structure

Introducción

Los ácidos α -hidroxicarboxílicos son compuestos orgánicos con dos grupos funcionales: un grupo carboxilato y un grupo hidroxilo en posición α respecto al carboxilato. Se pueden diferenciar dos tipos de ácidos: los mono α -hidroxicarboxílicos que presentan solo grupos hidroxilos en la cadena alifática, y los poli α -hidroxicarboxílicos que tienen múltiples grupos hidroxilo y carboxilato^{1,2}. En la figura 1 se muestran algunos de los ácidos más conocidos. En conjunto, estos grupos funcionales, permiten la coordinación de iones metálicos en una gran variedad de arreglos, así como la posibilidad para la formación de arreglos supramoleculares a través de interacciones intermoleculares².

Desde el punto de vista biológico, cabe señalar que algunos de estos ácidos se encuentran en la naturaleza como fitoquímicos en mohos, algas y plantas superiores, y como importantes agentes bioquímicos en animales. En particular, desempeñan funciones importantes en el ciclo de Krebs, en el catabolismo de los hidratos de carbono, en la síntesis de aminoácidos y en el metabolismo del vanadio y molibdeno^{2,3}. Además de su relevancia bioquímica, algunos derivados de estos ácidos se emplean habitualmente como componentes de una amplia

variedad de formulaciones farmacéuticas, principalmente como agentes bacteriostáticos y bactericidas en aplicaciones para el tracto renal y la vesícula biliar, en oftalmología y en medicamentos espasmolíticos y antirreumáticos⁴.

Las reacciones de los ácidos α -hidroxicarboxílicos y sus sales correspondientes con iones metálicos han sido objeto de numerosos estudios, como consecuencia no solo de su importancia en sistemas biológicos, pero también de su naturaleza polifuncional como ligandos y de las aplicaciones analíticas, industriales y médicas que presentan los complejos metálicos con estos ligandos^{2,5}. Es por ello, que este tipo de complejos

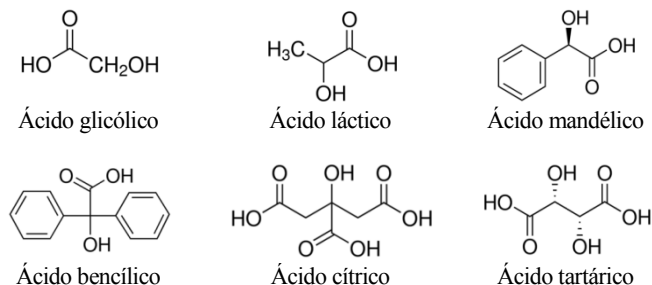


Fig. 1: Algunos ácidos mono α -hidroxicarboxílicos y poli α -hidroxicarboxílicos.

constituyen una clase de gran importancia y versatilidad en el campo de la química inorgánica y bioinorgánica, como consecuencia de la diversidad de modos de coordinación que pueden adoptar los grupos carboxilato^{1,6}.

Como parte de nuestro interés en el estudio estructural de aminoácidos y carboxilatos metálicos de interés biológico⁷⁻¹², en este trabajo se reporta la síntesis y caracterización estructural de un nuevo derivado metálico de ácido α -hidroxicarboxílico, el bencilato de cesio hidratado, utilizando difracción de rayos-X.

Una búsqueda en la base de datos de Cambridge (CSD, versión 5.42, Nov. 2020)^{13,14}, de derivados de metales alcalinos con ácidos α -hidroxicarboxílico, indica que solo aparecen reportadas las estructuras de un derivado de cesio, el tartrato de cesio¹⁵ y dos derivados del ácido bencilico, los complejos de potasio y litio estudiados en nuestro laboratorio^{7,8}.

Parte experimental

Síntesis

El complejo de cesio se preparó mezclando, en relación molar 1:1, ácido bencilico (Aldrich, 9%) y carbonato de cesio Cs_2CO_3 (Aldrich, %) en agua destilada (ver figura 2). Ambos compuestos se disolvieron por separado y se mezclaron con agitación continua durante 2 horas a temperatura ambiente. La solución obtenida se dejó evaporar lentamente por un mes hasta la aparición de cristales incoloros en forma de agujas de aproximadamente 0,5 mm.

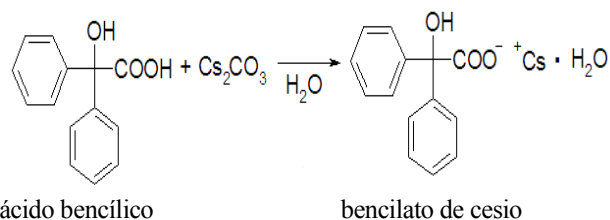


Fig 2: Esquema de síntesis del complejo de de cesio a partir del ácido bencilico.

Difracción de rayos-X

Los datos de difracción de rayos-X en muestra policristalina del ácido bencilico y el bencilato de cesio se registraron en un difractómetro Philips PW1050/25 utilizando radiación de $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$). Los datos se colectaron en un rango de $5\text{-}65^\circ$ en 2θ con pasos de $0,02^\circ$ y un tiempo de 10 segundos por paso. Se utilizó silicio como estándar externo.

Los datos de difracción de rayos-X de cristal único se midieron en un difractómetro Rigaku Pilatus 200K equipado con radiación de $\text{MoK}\alpha$ ($\lambda = 0,71073 \text{ \AA}$). Los datos se corrigieron por efectos de absorción y polarización.

Resultados

Difracción de rayos-X en muestras policristalinas

La figura 3 muestra los patrones de difracción del ácido bencilico y el bencilato de cesio. El ácido bencilico cristaliza en una celda ortorrómbica con grupo espacial $Pna2_1$ ($N^\circ 33$) con un volumen de celda unidad de $2383,5 \text{ \AA}^3$ ¹⁶. La diferencia entre ambos difratogramas evidencia la presencia de un nuevo material como producto de la síntesis. Una búsqueda en la base de datos de polvo del ICDD¹⁷ permite identificar el ácido bencilico (PDF-00-008-0513) sin embargo no hay reporte sobre el complejo de cesio.

En el patrón de difracción del complejo no se observan restos del ácido bencilico (PDF-00-008-0513) así como tampoco del carbonato de cesio (PDF-00-035-0962), lo cual indica la presencia de una sola fase. El indexado del patrón se realizó utilizando el programa Dicvol04¹⁸. El complejo cristaliza en una celda ortorrómbica con parámetros $a = 7,420(1) \text{ (\AA)}$, $b = 13,989(1) \text{ (\AA)}$, $c = 26,001(2) \text{ (\AA)}$ con un volumen de celda unidad de $270,4 \text{ \AA}^3$.

La celda obtenida se refinó sin modelo estructural por el método de Le Bail¹⁹ utilizando el programa Fullprof²⁰. La figura 4 muestra el resultado del refinamiento observándose un buen ajuste entre el patrón observado y calculado. Los parámetros de celda concuerdan muy bien con los encontrados con difracción de monocristal, lo cual es un indicativo de la homogeneidad de la muestra del complejo obtenido.

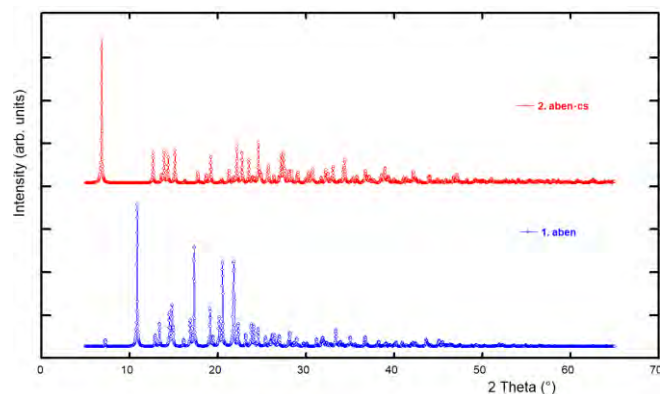


Fig. 3: Patrones de difracción en muestra policristalina medidos para el ácido bencilico (azul) y el bencilato de cesio (rojo).

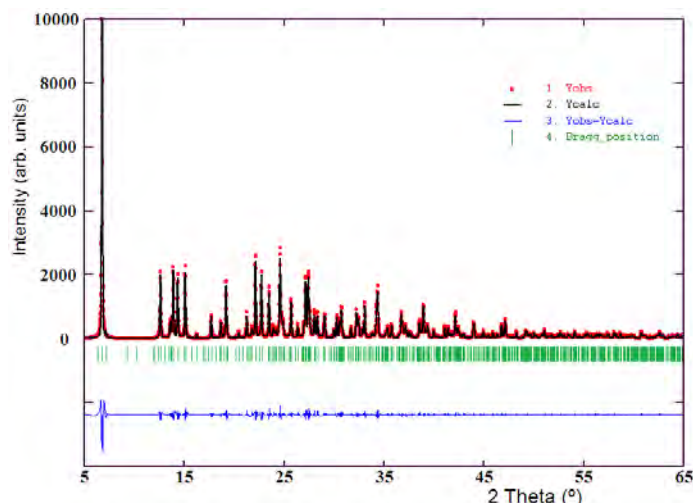


Fig. 4: Gráfica del ajuste Le Bail de la celda ortorrómbica encontrada para el bencilato de cesio.

Difracción de rayos-X en monocristales

La estructura cristalina se determinó por métodos directos utilizando el programa SIR2014²¹ y se refinó mediante cálculos de mínimos cuadrados de matriz completa mediante el programa SHELXL²². Todos los átomos se colocaron en posiciones calculadas y tratados usando un modelo rígido con distancias C-H 0,96-0,98 Å, N-H 0,86 Å y O-H 0,82 Å, con $U_{iso}(H) = 1,2 U_{eq}(C, N, O)$. Los datos cristalográficos reportados aquí, se depositaron en la base de datos Cambridge Crystallographic Data Centre¹⁴ (www.ccdc.cam.ac.uk).

El complejo metálico bencilato de cesio cristaliza en el sistema ortorrómbico con grupo espacial *Pbca* (N°31). En la tabla 1 se resumen los datos cristalográficos y figuras de mérito del refinamiento estructural. En la figura 5 se puede observar la unidad asimétrica del complejo, formada por una molécula del anión bencilato, una molécula de cesio como catión y una molécula de agua de cristalización. El carácter carboxilato del grupo ácido se corrobora por las distancias de enlace similares, C1--O2 1,238(5) Å y C1--O3 1,244(5) Å, dentro de la desviación estándar. Las distancias y ángulos de enlace se corresponden con el valor promedio de estructuras similares encontradas en la base de datos (CSD, version 5.42, Nov. 2020)¹⁴.

El ión Cs^+ forma una esfera de coordinación interactuando con siete átomos de O. En este caso 3 moléculas del ión bencilato se unen a través de un único átomo de oxígeno, mientras una molécula se coordina de forma bidentada. La esfera de coordinación se completa con dos moléculas de agua. La figura 6 muestra la esfera de coordinación alrededor del átomo central de cesio.

El empaquetamiento cristalino del complejo se soporta en 4 enlaces de hidrógeno el tipo O--H...O, lo cuales se pue

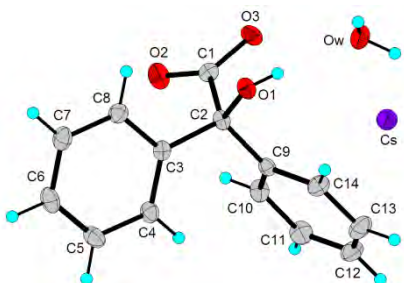


Fig. 5. Unidad asimétrica del bencilato de cesio. Las elipsoides se dibujaron con una probabilidad del 25%. Los átomos de hidrógeno se muestran como esferas con radio arbitrario.

Tabla 1. Datos cristalográficos del complejo hidratado de cesio del ácido bencilico.

Formula Química	$C_{14}H_{13}O_4Cs$	Grupo espacial	<i>Pbca</i> (N°61)
Peso formula (uma)	378,15	a (Å)	7,4232(5)
Sistema cristalino	Ortorrómbico	b (Å)	13,998(1)
Pcalc (g/cm ³)	1,860	c (Å)	25,998(2)
Refl, únicas (Rint)	2485 (0,044)	V (Å ³)	2701,4(3)
R(F ²) [I > 2σ(I)]	0,0339	Z	8
wR(F ²) [I > 2σ(I)]	0,0952	Radiación (Å)	MoK _α λ=0,71073

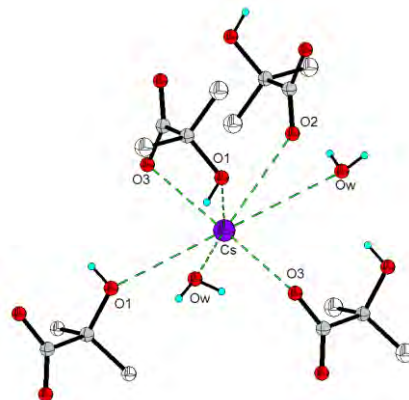


Fig. 6. Esfera de coordinación alrededor del átomo central de cesio. Los anillos bencénicos se omitieron para facilitar la vista.

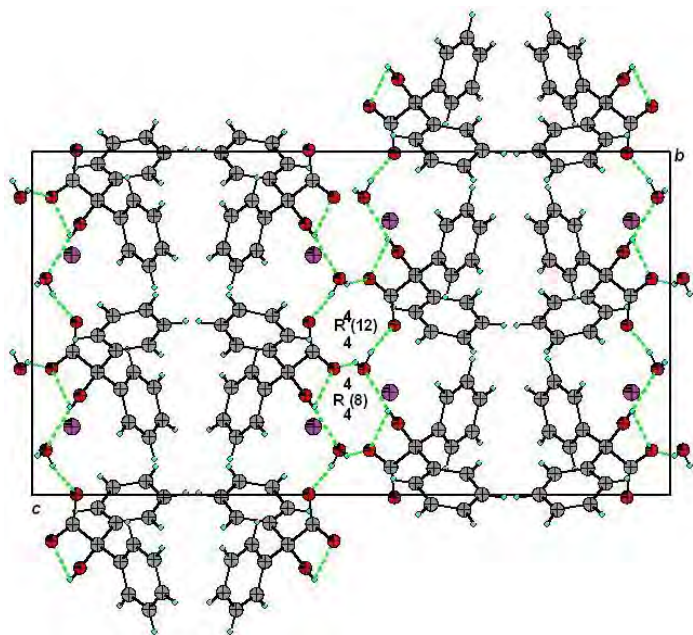


Fig. 7. Empaquetamiento cristalino del complejo, en el plano *bc*, mostrando los anillos formados producto de las interacciones intermoleculares.

den apreciar en la figura 7. La interacción O1--H1...O3 corresponde a un enlace intramolecular en el carboxilato. Por su parte, la molécula de agua (Ow) interacciona con tres moléculas del ión carboxilato a través de los enlaces O1--H1...Ow, Ow--H4a...O3 y Ow--H4b...O2. La unión de estas interacciones de enlace de hidrógeno produce anillos de 8 y 12 miembros que pueden ser descritos por los grafos $R_4^4(8)$ y $R_4^4(12)$, respectivamente²³.

Conclusiones

El complejo bencilato de cesio hidratado, sintetizado mediante una reacción de ácido bencílico y carbonato de cesio, cristaliza en una celda ortorrómbica con grupo espacial *Pbca* (N°31). El empaquetamiento cristalino corresponde con interacciones de enlaces de hidrógeno del tipo O-H...O. Estas interacciones producen un enrejado bidimensional en el plano *bc* producto de la unión de moléculas de agua con los grupos bencilato, formando anillos descritos por los grafos $R^4_4(8)$ y $R^4_4(12)$.

Referencias

1. RC Mehrotra, R Bohra, Metal Carboxylates, Academic Press, Londres (1983).
2. E Bermejo, R Carballo, A Castiñeiras, A Lago. Coordination of α -hydroxycarboxylic acids with first-row transition ions. **Coord. Chem. Rev.**, **257**, 2639-2651 (2013).
3. M Biagioli, L Strinna-Erre, G Micera, A Panzanelli, M Zema. Molecular structure, characterization and reactivity of dioxo complexes formed by vanadium (V) with α -hydroxycarboxylate ligands, **Inorg. Chim. Acta** **310**, 1-9 (2000).
4. M Schmidt, A Schier, H Schmidbaur. Magnesium bis D(-)-mandelate dihydrate and other alkaline earth, alkali, and zinc salts of mandelic acid, **Z. Naturforsch.**, **53b**, 1098-1102 (1998).
5. R Zhang, W Xia, H Wang, Z Zhou. Metal-organic frameworks constructed from monomeric, dimeric and trimeric phenanthroline citrate zinc building units, **Inorg. Chem. Commun.**, **12**, 583-587. (2009).
6. M McCann, JF Cronin, M Devereux, G Ferguson. Copper (II) complexes of heptanedioic acid and octanedioic acid: X-ray crystal structures, **Polyhedron**, **14**, 2379-2387 (1995).
7. AJ Mora, AN Fitch, B Ramírez, GE Delgado, M Brunelli, J Wright. Structure of lithium benzilate hemihydrate solved by simulated annealing and difference Fourier synthesis from powder data, **Acta Cryst.**, **B59**, 378-383 (2003).
8. LS Rojas, B Ramírez, AJ Mora, GE Delgado, G. Díaz de Delgado. Redetermination of potassium benzylate, **Acta Cryst.**, **E59**, m647-m651 (2003).
9. LM Belandria, GE Delgado, AJ Mora, LE Seijas, T González. Redetermination of 1-carboxycyclohexan-1-aminium acid chloride, **Acta Cryst.**, **E65**, o245 (2009).
10. LM Belandria, AJ Mora, GE Delgado, A Briceño. 4-carboxypiperidinium 1-carboxycyclobutane-1-carboxylate, **Acta Cryst.**, **C68**, o88-o91 (2012).
11. LM Belandria, AJ Mora, T González, GE Delgado. Hydrogen bond patterns in 3-carboxypiperidinium semi-oxalate monohydrate, **Av. Quím.**, **8**, 3-7 (2013).
12. M Guillén, JW Ramírez, AJ Mora, S Koteich, M Villarroel, JE Contreras, GE Delgado. Caracterización estructural de los ácidos orto, meta y para-metilhipúricos, **Av. Quím.**, **10**, 119-128 (2015).
13. CR Groom. FH Allen. The Cambridge structural database in retrospect and prospect. **Angew. Chem. Int. Ed.**, **53**, 662-671 (2014).
14. Cambridge Structural Database. (CSD), Cambridge Crystallographic Data Centre. Version 5.398, Agosto (2018).
15. T Gelbrich, TL Threlfall, MB Hursthouse. Interplay between hydrogen bonding and metal coordination in alkali metal tartrates and hydrogen tartrates, **CrystEngComm**, **16**, 6159-6169 (2014).
16. Y Qiu, K Wang, Y Liu, H Deng, F Sun, Y Cai. Synthesis, characterization and 1D helical chain crystal structure of $[Cu(DBA)_2(1,10\text{-phen})]_n$ and $[Cd(DBA)_2(1,10\text{-phen})_2]$ (DBA = benzilic acid). **Inorg.Chim.Acta**, **360**, 1819 (2007).
17. International Centre for Diffraction Data. PDF-ICDD-Powder Diffraction File (Set 1-71). Newtown Square: International Centre for Diffraction Data (2019).
18. A Boulouf, D Löuer. Powder pattern indexing with the dichotomy method. **J. Appl. Cryst.**, **37**, 724-731 (2004).
19. A Le Bail. Whole powder pattern decomposition methods and applications: A retrospection. **Powder Diffr.**, **20**, 316-326 (2005).
20. J Rodriguez-Carvajal, Fullprof, versión 6.2, LLB, CEA-CNRS, France (2018).
21. MC Burla, R Caliendo, B Carrozzini, GL Cascarano, C Cuocci, C Giacovazzo, M Mallamo, A Mazzone, G Polidori. Crystal structure determination and refinement via SIR2014. **J. Appl. Cryst.**, **48**, 306-309 (2015).
22. GM Sheldrick. Crystal structure refinement with SHELXL. **Acta Cryst.**, **C71**, 3-8 (2015).
23. MC Etter. Encoding and decoding hydrogen-bond patterns of organic-compounds. **Acc. Chem. Res.**, **23**, 120-126 (1990).