

CARRERA DEL INVESTIGADOR CIENTÍFICO Y TECNOLÓGICO

Informe Científico¹

PERIODO ²: 2014

Legajo N°: 359702

1. DATOS PERSONALES

APELLIDO: Almassio

NOMBRES: Marcela Fabiana

Dirección Particular:

Localidad: Bahía Blanca CP: 8000

Dirección electrónica: almassio@criba.edu.ar

2. TEMA DE INVESTIGACION

“Plastificación y encapsulamiento de pigmentos naturales en películas edibles de zeína para la industria alimentaria y caracterización fotofísica de nanoagregados y películas fluorescentes”.

3. DATOS RELATIVOS A INGRESO Y PROMOCIONES EN LA CARRERA

INGRESO: Categoría: Asistente Fecha: 01/07/10

ACTUAL: Categoría: Asistente desde fecha: 01/07/10

4. INSTITUCION DONDE DESARROLLA LA TAREA

Universidad y/o Centro: Universidad Nacional del Sur

Facultad:

Departamento: Química

Cátedra:

Otros:

Dirección: Calle: Avda. Alem N°: 1253

Localidad: Bahía Blanca CP: 8000 Tel: 0291-4595101. Int 3542

Cargo que ocupa: Asistente de Docencia dedicación exclusiva

5. DIRECTOR DE TRABAJOS. (En el caso que corresponda)

Apellido y Nombres: Dr. Raúl O. Garay

Dirección Particular:

Localidad: Bahía Blanca CP: 8000

Dirección electrónica: rgaray@criba.edu.ar

.....
Firma del Director (si corresponde)

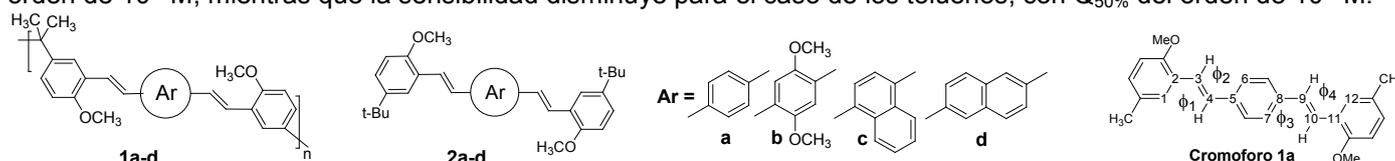
.....
Firma del Investigador

¹ Art. 11; Inc. “e” ; Ley 9688 (Carrera del Investigador Científico y Tecnológico).

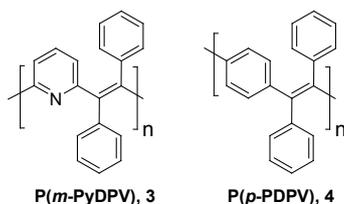
² El informe deberá referenciar a años calendarios completos. Ej.: en el año 2008 deberá informar sobre la actividad del período 1°-01-2006 al 31-12-2007, para las presentaciones bianuales.

6. EXPOSICION SINTETICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO.

a) Realicé el estudio completo de las propiedades de absorción y emisión en solución (distintos solventes) y en películas delgadas (50-200 nm, grosor medido mediante un interferómetro UV-vis. que opera en modo reflectancia) de polímeros **1a-d** con unidades diestirililileno unidas por medio de grupos isopropilideno y sus correspondientes compuestos modelo **2a-d**, que sintetice previamente; incluyendo mediciones de anisotropía y efecto de flanco rojo para evaluar el estado de agregación en fase condensada de los cromóforos en la matriz amorfa. Para la caracterización estructural y determinación de pureza se utilizó una combinación de técnicas de tlc, FTIR y espectroscopía de ^1H RMN y ^{13}C RMN (Bruker ARX300). Complementé el estudio de sus propiedades ópticas con la caracterización de sus propiedades térmicas mediante MLP y DSC. Realicé asimismo un estudio teórico de la absorción de los cromóforos. El modelamiento de las geometrías de los diestirilililenos se realizó a nivel post-Hartree-Fock, SCS-MP2/def2-TZVP(-f)/COSMO(CHCl_3). La simulación de los espectros de absorción se realizó mediante la teoría Time Dependent DFT usando COSMO para simular el solvente, la convergencia de los máximos de absorción se alcanzó con el grupo de base triple zeta def2-TZVP(-f) empleando el funcional híbrido PBE0, se empleo así el nivel teórico TD-DFT/PBE0/def2-TZVP(-f)/COSMO(CHCl_3). Se analizó el espacio conformacional (ver Cromóforo **1a**; ángulos diedros ϕ_1 , ϕ_2 , ϕ_3 , ϕ_4) de manera sistemática para obtener las geometrías de diversos rotámeros y calcular posteriormente sus máximos de absorción, que resultaron ser muy parecidos para cada cromóforo, y que se corresponden estrechamente con los valores experimentales obtenidos en solución y en película. El análisis del comportamiento óptico similar en solución y en las películas amorfas de los polímeros indica que la microestructura contorsionada de los polímeros es efectiva para disminuir las interacciones intercromofóricas, interacciones que se encuentran presentes en algunos de los compuestos modelos. Se evaluó la variación de su emisión frente a apagadores nitrados derivados de fenol y tolueno en medio acuoso. Para realizar el estudio del apagado de la fluorescencia ensayé diferentes concentraciones a fin de encontrar las condiciones óptimas de espesor de las películas para la medición, que resulto ser de 100 nm. Los estudios de apagado de la fluorescencia mostraron que estos polímeros poseen alta sensibilidad a los compuestos fenólicos nitrados con valores de $Q_{50\%}$ del orden de 10^{-5} M, mientras que la sensibilidad disminuye para el caso de los toluenos, con $Q_{50\%}$ del orden de 10^{-4} M.



b) Realicé estudios de fluorescencia para detectar emisión inducida por la agregación (AIE) en $P(m\text{-PyDPV})$, **3**, un polímero con capacidad de formación de puente H sintetizado con anterioridad, y en $P(p\text{-PDPV})$, **4**, que sintetice para evaluar el efecto de las interacciones específicas y geometría sobre la capacidad de formación de agregados y el efecto AIE, ya que **4** no forma puente H y tiene una estructura más lineal. Se utilizaron como solventes CHCl_3 , THF y $\text{THF}:\text{H}_2\text{O}$ 1:1 variando la concentración desde 10^{-7} a 10^{-3} M. En CHCl_3 la tendencia de ambos polímeros a formar agregados es baja. En THF, para **3** y **4** no se observa la formación de agregados a concentraciones en el orden de 10^{-7} M, siendo predominante la formación de agregados a concentraciones del orden de 10^{-4} M, sin embargo, el aumento de la concentración elimina casi totalmente la emisión, o sea que estos son agregados convencionales. En el caso de $\text{THF}:\text{H}_2\text{O}$ se observa la formación de agregados en



ambos polímeros, predominantemente a concentraciones del orden de 10^{-4} M, acompañada de un aumento notable en la intensidad de la emisión, aumento que para **4** es 10 veces superior que para **3**, esto indicaría que este solvente favorece la aparición del fenómeno AIE y que la presencia del heteroátomo influye negativamente sobre estas propiedades.

c) Fabriqué películas de zeína utilizando etanol acuoso al 85% como solvente, con el agregado de 10% y 20% w/w de glicerol. Los plastificantes de la zeína se clasifican en siete grupos diferentes. Dentro de esta clasificación, el glicerol es un plastificante secundario, siendo más efectivo en mezclas de sistemas plastificantes. Por ello se decidió utilizar como segundo plastificante el ácido gálico (2 y 4 mg/cm^2 de película). Los sustratos utilizados fueron placas de acrílico y vidrio silanizado que permiten despegar las películas. Además varié el polialcohol, utilizando 20% eritritol o 20% sorbitol. Los films son muy sensibles a las variaciones de temperatura y humedad ambientales, por lo tanto fabriqué una cámara con humedad y temperatura controlada. Para obtener films uniformes y con menos imperfecciones, se debió calentar la solución a aprox. 60°C y agitar suavemente no más de 20 min. La películas se despegaron del soporte luego de mantenerlos bajo una atmósfera con $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ para estandarizar la humedad de la película al momento de realizar las determinaciones reológicas. De los tres polialcoholes, el eritritol es el que cuesta disolver en el medio elegido. Con los primeros ensayos se observó que usando glicerol se obtenían los films más elásticos. La zeína utilizada en estos experimentos es zeína comercial decolorada mediante repetidas extracciones con tolueno hasta que el extracto es incoloro seguido de tratamiento estático con tamices moleculares.

7. TRABAJOS DE INVESTIGACION REALIZADOS O PUBLICADOS EN ESTE PERIODO.

7.1 PUBLICACIONES.

“Diphenylanthrylene and diphenylfluorene-based segmented conjugated polymer films as fluorescent chemosensors for nitroaromatics in aqueous solution”

Pablo G. Del Rosso Maria J. Romagnoli, Marcela F. Almassio, Cesar A. Barbero y Raúl O. Garay. *Sensors and Actuators B*, **2014**, 203, 612–620. ISSN 0925-4005.

A new regularly segmented conjugated polymer with diphenylanthryl chromophores bearing oxyethylene side chains was synthesized. The amorphous polymer was solution-processable. The formation of aggregated species in solid phase was hindered by the bent microstructure while fluorescence depolarization measurements showed high exciton mobilities among the short chromophores. The fluorescence quenching of films of PA towards nitroaromatics in aqueous solution was evaluated and compared with the behavior of PF; a diphenylfluorenylene-based segmented CP bearing non-polar aliphatic side chains. Films of both polymers exhibit remarkable sensing abilities in the micromolar range thus showing that hydrated films have porosity at the molecular level. The fluorene-based PF had higher overall quenching responses to NACs than the anthryl-based PA while nitrophenols were more effective than nitrotoluenes in quenching the fluorescence of both PA and PF. Such differences are rationalized in terms of polymer-analyte interactions. The binding strengths between analytes and sensing materials were evaluated by their Hansen solubility parameters. We concluded that strong analyte cohesive interactions with the polymer could drag analyte diffusion and impair polymer sensing ability and should be avoided in the design of responsive polymers to be used in the present sensing configuration.

7.2 TRABAJOS EN PRENSA Y/O ACEPTADOS PARA SU PUBLICACIÓN.

7.3 TRABAJOS ENVIADOS Y AUN NO ACEPTADOS PARA SU PUBLICACION.

“Synthesis, optical and chemosensing properties of amorphous segmented conjugated polymers containing distyrylarene moieties”, enviado a *Polymer*, 2015.

Marcela F. Almassio, Maria J. Romagnoli, Ana B. Schvval, Pablo G. Del Rosso and Raúl O. Garay.

New segmented conjugated polymers based on distyrylarene chromophores tethered along the polymer main chain by their meta positions to isopropylidene spacers to break the conjugation and their model compounds were synthesized via Wittig condensation. GPC, NMR, FTIR, DSC and POM techniques showed that they have high molecular weight, amorphous morphologies with high Tg and good solubilities. The optical properties of these materials were investigated by UV-vis absorption and fluorescence spectroscopies. Fluorescence anisotropy indicated that all these disordered chromophoric assemblies have high bulk exciton mobilities. In dilute solution, all polymers and model compounds showed blue emission and narrow spectra. No aggregate formation was detected by red-edge excitation experiments in the film state indicating that their contorted chain conformations hinder interactions between the distyrylarene chromophores and also precludes excimer formation. Indeed, the optical response was very similar in solution and condensed state for most of the polymers and model compounds studied here. Molecular modeling of the geometries at the SCS-MP2 level was performed for rotamers of the isolated distyrylarene units while their absorption spectra was modeled by TD-DFT. The calculated absorption maxima of different rotamers of a given chromophore were in a narrow range of ≤ 10 nm. Therefore, conformational diversity in the condensed phase does not affect significantly the optical properties. Finally, the fluorescence quenching of thin solid films (~100 nm) by nitroaromatics in methanol, methanol:water (1:1) and water solutions was evaluated. Polymers exhibit remarkable sensing abilities in a reversible manner at the micromolar range thus showing that hydrated films have porosity at the molecular level.

7.4 TRABAJOS TERMINADOS Y AUN NO ENVIADOS PARA SU PUBLICACION.

7.5 COMUNICACIONES.

7.6 INFORMES Y MEMORIAS TECNICAS.

8. TRABAJOS DE DESARROLLO DE TECNOLOGÍAS.

8.1 DESARROLLOS TECNOLÓGICOS.

8.2 PATENTES O EQUIVALENTES.

8.3 PROYECTOS POTENCIALMENTE TRASNFERIBLES, NO CONCLUIDOS Y QUE ESTAN EN DESARROLLO.

8.4 OTRAS ACTIVIDADES TECNOLÓGICAS CUYOS RESULTADOS NO SEAN PUBLICABLES

8.5.

9. SERVICIOS TECNOLÓGICOS.

10. PUBLICACIONES Y DESARROLLOS EN:

10.1 DOCENCIA

10.2 DIVULGACIÓN

11. DIRECCION DE BECARIOS Y/O INVESTIGADORES. *Indicar nombres de los dirigidos, Instituciones de dependencia, temas de investigación y períodos.*

12. DIRECCION DE TESIS.

13. PARTICIPACION EN REUNIONES CIENTIFICAS.

1. "Capacidad quimiosensora de películas de poli(*p*-terfenilenoperfluoroisopropilideno) en la detección de nitrocompuestos en solventes hidroxilicos". Ana B. Schvval, Pablo G. Del Rosso, María J. Romagnoli, Marcela F. Almassio y Raúl O. Garay. XXX Congreso Argentino de Química, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina, 22 al 24 de octubre de 2014. 03-Química Orgánica-099.
2. "Películas de polímeros conjugados segmentados con grupos diestirilarileno. Apagado de su fluorescencia por compuestos nitrados en solución acuosa". María J. Romagnoli, Marcela F. Almassio, Ana B. Schvval, Pablo G. Del Rosso, y Raúl O. Garay. XXX Congreso Argentino de Química, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina, 22 al 24 de octubre de 2014. 03-Química Orgánica-101.

14. CURSOS DE PERFECCIONAMIENTO, VIAJES DE ESTUDIO, ETC.

15. SUBSIDIOS RECIBIDOS EN EL PERIODO.

Subsidio Institucional para Investigadores CIC. Comisión de Investigaciones de la provincia de Bs. As. Monto: \$7000. Resolución: 833/14.

16. OTRAS FUENTES DE FINANCIAMIENTO.

17. DISTINCIONES O PREMIOS OBTENIDOS EN EL PERIODO.

18. ACTUACION EN ORGANISMOS DE PLANEAMIENTO, PROMOCION O EJECUCION CIENTIFICA Y TECNOLÓGICA..

19. TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO.

Asistente de docencia (Jefe de trabajos prácticos) de las materias “Química Orgánica Fundamental” de la carrera de Licenciatura en Ciencias Biológicas y “Química Orgánica C” de la carrera de Licenciatura en Química, todas de la Universidad Nacional del Sur durante el segundo cuatrimestre de 2014. Porcentaje dedicado a la docencia: 30%

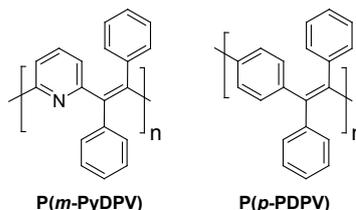
20. OTROS ELEMENTOS DE JUICIO NO CONTEMPLADOS EN LOS TITULOS ANTERIORES.

21. TITULO Y PLAN DE TRABAJO A REALIZAR EN EL PROXIMO PERIODO.

“Caracterización fotofísica de películas fluorescentes y nanoagregados en solución. Plastificación y encapsulamiento de pigmentos naturales en películas de zeína”.

Caracterización fotofísica de películas fluorescentes y nanoagregados en solución.

Los nanoagregados de sistemas fluorescentes están cumpliendo un rol cada vez más importante en el desarrollo de quimiosensores,¹ ya sea para contaminantes orgánicos o inorgánicos o en compuestos de origen biológico.^{2,3} La migración intercadena de estados excitados o de emisión inducida por agregación⁴ son los factores más importantes que lleva a respuestas de variación de la fluorescencia extremadamente grandes en polímeros o polielectrolitos comparadas con las mostradas por compuestos de bajo peso molecular.



Se continuará con la evaluación fotofísica de dos polímeros conjugados con unidades vinileno tetrasustituídos ya sintetizados y caracterizados estructuralmente, poli(meta-piridilendifenilvinileno) y poli(para-fenilendifenilvinileno), que presentaron el fenómeno de emisión inducida por la agregación (AIE) en soluciones de THF:H₂O. Se utilizarán soluciones a distintos pH para determinar si alguno de estos dos fenómenos de amplificación es operativo en los nanoagregados formados en distintos solventes, se estudiarán también agregados formados en fase condensada en películas.

Se estudiará su respuesta frente a soluciones acuosas de mercurio, un contaminante que se encuentra en la ría de la ciudad de Bahía Blanca⁵ y frente a soluciones acuosas de nitroderivados, que son conocidos agentes polucionantes en ambientes poblacionales e industriales.

El efecto AIE transcurre mediante un número de posibles pasos mecanísticos que pueden incluir planarización conformacional, formación de agregados-J, TICT, y restricción de la rotación intramolecular (RIR). En un estudio teórico-experimental, Tang y colaboradores han encontrado que RIR es la causa principal en vinileno tetrasustituídos mediante anillos aromáticos. Los anillos fenilénicos pueden sufrir rotaciones intramoleculares dinámicas con respecto a la olefina. En solución, tales rotaciones son activas, las cuales sirven como canal de relajación para que el estado excitado decaiga. Considerando que, en el estado agregado, esta rotación está restringida debido a las limitaciones físicas en el empaquetamiento molecular, bloquea el camino no radiativo y activa el decaimiento radiativo. En este contexto, se realizará un estudio teórico computacional mediante modelamiento molecular para identificar la extensión de los cromóforos involucrados en la emisión en solución diluida y la capacidad relativa de las unidades estructurales de ambos polímeros para relajarse rotacionalmente.

Asimismo seguiré colaborando en la caracterización óptica, fotofísica y por modelado computacional de polímeros conjugados segmentados para ser estudiados como quimiosensores de nitrocompuestos.

Plastificación y encapsulamiento de pigmentos naturales en películas de zeína

Los films a base de biopolímeros han mostrado un potencial como sustitutos de los plásticos usados en embalajes a base de petróleo para reducir el impacto ambiental⁶. Los films a base de proteínas son atractivos debido a sus muy buenas propiedades de barrera a los gases⁷. Las aplicaciones de films a base de proteínas están limitadas por la alta permeabilidad al vapor de agua debido a su naturaleza hidrofílica^{8,9} y también por la adición de agentes plastificantes que es necesaria para obtener films elásticos. En particular, la zeína ha recibido considerable atención como biomaterial de revestimiento y films¹⁰. Sin embargo, poca cantidad de recubrimientos edibles y films son usados en aplicaciones comerciales debido a limitaciones en sus propiedades de tensión mecánica y de barrera al vapor de agua y oxígeno comparados con los embalajes sintéticos. Aunque existen estudios para mejorar las propiedades tecnológicas tales como flexibilidad mecánica y propiedades de barrera al agua o al oxígeno^{11,12}.

Las propiedades de formación de películas de la zeína se originan en fuerzas intermoleculares fuertes, polares y de puente de hidrógeno, que hacen al film quebradizo para la mayoría de las aplicaciones. Los plastificadores que actúan modificando la estructura supramolecular de la zeína necesitan tener grupos funcionales polares para competir con las interacciones zeína-zeína y así lograr una plastificación efectiva. Asimismo también se requiere un delicado balance entre grupos polares y no polares de los plastificantes¹³ para una eficiente plastificación, ya que la zeína posee aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos. Polioles saturados y ácidos grasos han sido usados para mejorar las propiedades de films de zeína ya sea puros o en combinaciones diversas^{14, 15, 16}. Aparentemente, la combinación de más de un plastificante podría ser la mejor manera para mejorar las propiedades de las películas. Así, el ácido oleico (baja polaridad e hidrofóbico) y el glicerol (alta polaridad e hidrofílico) afectan las propiedades mecánicas de los films plastificados de zeína de manera distinta. Por lo tanto uno de los objetivos de este trabajo es investigar el efecto de concentraciones diferentes de etanol:agua (solvente) y plastificante primario/glicerol (plastificante secundario) sobre las propiedades estructurales y funcionales de los film-plastificantes 1°/2°.

Nuestros estudios indicaron que, aunque los azúcares son plastificantes edibles para biopolímeros, el uso de eritritol y sorbitol como plastificantes secundarios en lugar del glicerol disminuye las propiedades viscoelásticas y mecánicas de los films de zeína y hemos observado que la mejor combinación es glicerol/ácido gálico. Queda entonces todavía analizar el efecto de la variación estructural de plastificantes primarios hidrofóbicos (ácidos orgánicos) con una y dos cabezas hidrofílicas de cadena larga y corta para sintonizar su hidrofobicidad.

La transparencia/opacidad de los films juega un rol importante cuando los films se intentan usar para cubrir productos sensibles a la luz, en tales casos un film opaco es recomendado¹⁷. Debido a que el color amarillo de los carotenoides interferiría con los colorantes naturales (antocianinas) obtenidos en nuestro laboratorio y que se desean aditivar durante la obtención de los films, es conveniente usar zeína decolorada en lugar de la zeína comercial amarilla. Para ello emplearemos un método de decoloración que desarrollamos mediante extracción con tolueno y tratamiento posterior con tamices moleculares. Asimismo, la formación de films es altamente dependiente de variables ambientales, por ello se harán en cámara con temperatura y humedad controlada que construimos, en sustratos que presentan baja interacciones superficiales (vidrio silanizado) lo que facilita su recuperación.

En conclusión, se seguirán los estudios comenzados sobre films de zeína. Se continuará evaluando la variación de plastificante primario/secundario sobre las propiedades estructurales y mecánicas en primer lugar y luego sobre las propiedades funcionales de los film así obtenidos. Usaremos en nuestro estudio plastificantes primarios hidrofóbicos con una y dos cabezas, azúcares con más de un grupo hidroxilo y evaluaremos sus efectos sobre las propiedades viscoelásticas, térmicas y mecánicas de los films de zeína. La incorporación de colorantes se realizará cuando se obtengan films con buenas propiedades mecánicas.

Recursos disponibles. El Instituto de Química del Sur (INQUISUR) cuenta con instrumental para realizar parte de la caracterización estructural, mientras que equipos adicionales se encuentran en el Laboratorio de Instrumental de uso Compartido del Dpto. de Química (LIUC) y en el CCT-Bahía Blanca. El grupo de Materiales Orgánicos cuenta con dos laboratorios en el INQUISUR equipados con el instrumental básico necesario para realizar la síntesis (bomba de vacío, rotavapor, agitadores magnéticos con

calentamiento, estufas de secado, etc). Se tiene acceso directo al siguiente instrumental que se encuentra en el INQUISUR: cromatógrafo por permeación de geles Waters, espectrofotómetro FTIR Nicolet, HPLC Perkin Elmer Tridet, espectrometro RMN Multinuclear Bruker Avance III. El LIUC cuenta con el siguiente instrumental: UV-vis, GC-MS Hewlett Packard, GC Shimadtsu, espectrómetro de fluorescencia, Filmetrics F20UV y un DSC TA Q10. Los equipos de termogravimetría, rayos X, reometría, microscopía óptica polarizada, ultracentrifugación, espectrómetro de fluorescencia con polarizadores para realizar medidas de anisotropía de la fluorescencia, el empleado en técnicas de dispersión de luz y el TEM se encuentran el CCT-Bahía Blanca. En este período el grupo adquirió una computadora con capacidad para realizar cálculos a nivel post-HF y DFT (12 cores, 48G RAM, etc.) y luego de una evaluación comparativa, se eligió el programa ORCA entre los que son sin costo para uso académico.

¹ M.R. Islam, Z. Lu, X. Li, A.K. Sarker, L. Hu, P. Choi, X. Li, N. Hakobyan, M.J. Serpe, *Analytica Chimica Acta* 789 (2013) 17-32.

² Y. Liu, K. Ogawa, K.S. Schanze, *J. Photochem. Photobiol. C: Photochem. Rev.* 10 (2009) 173–190.

³ S.W. Thomas, G.D. Joly, T.M. Swager, *Chem. Rev.* 107 (2007) 1339-1386.

⁴ W. Dong; T. Fei; A. Palma-Cando, U. Scherf, *Polym. Chem.* 2014. DOI: 10.1039/c4py00251b.

⁵ Programa Integral de Monitoreo, Polo Petroquímico y Área Portuaria del Distrito de Bahía Blanca.
http://www.bahiablanca.gov.ar/cte/doc/Adenda-PIM-Estuario_informes%202009-y-2010_v9.pdf.

⁶ *Journal of Biotechnology*, 102, 191-198.

⁷ *Journal of Food Engineering*, 64, 301-305

⁸ *Journal of the American Oil Chemists Society*, 71, 307-312.

⁹ *Journal of Food Engineering*, 90, 548-558.

¹⁰ *Cereal Chemistry*, 79, 1–18.

¹¹ *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2002, 79 (4), 345–349.

¹² *Cereal Chem.* 1997, 74 (6), 771–775.

¹³ *Cereal Chem.* 2002, 79 (1), 1–18.

¹⁴ *Cereal Chem.* 1998, 75 (2), 194–199.

¹⁵ *Food Sci. Technol. Res.* 2001, 7 (3), 191–194.

¹⁶ *J. Appl. Polym. Sci.* 2010, 118 (2), 910–919.

¹⁷ *Materials Chemistry and Physics* 142 (2013) 580-585.