



# **UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

---

***Trabajo de Tesis Doctoral***

***Desarrollo de sensores fosforescentes en estado líquido a temperatura ambiente. Aplicación al análisis de cumarinas.***

---

***Lic. Maria Emilia Pacheco***

***Directora: Dra. Cecilia Castells***

***Co-directora: Dra. Liliana Bruzzone***

***Año 2017***

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Métodos Analíticos (LIDMA), Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, bajo la dirección de la Dra. Cecilia Castells y la co-dirección de la Dra. Liliana Bruzzone.

El mismo se presenta a consideración de las autoridades de dicha Facultad a fin de acceder al grado académico de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas.

*Dedicada a*



*(Martina)*

## **Objetivos**

El plan de investigación propuesto tiene como objetivo general “evaluar la utilización de métodos fotoluminiscentes en el desarrollo de sensores fosforescentes como potencial herramienta para la detección de cumarinas en muestras de interés toxicológico y/o farmacéutico y su posible acoplamiento a técnicas separativas”.

Los objetivos específicos que han dirigido el desarrollo de este trabajo de investigación se mencionan a continuación:

a. Explorar las características espectrales de ciertas cumarinas y la influencia del entorno en el desarrollo de la fosforescencia:

a.1 *Fosforescencia a temperatura ambiente estabilizada por micelas (MS-RTP)*

a.2 *Fosforescencia a temperatura ambiente inducida por ciclodextrinas (CD-RTP)*

a.3 *Fosforescencia a temperatura ambiente en medios no protegidos (NP-RTP)*

b. Examinar el empleo de sistemas nanoestructurados fosforescentes y su interacción con las cumarinas.

c. Estudiar la inmovilización de nanopartículas en un soporte sólido que constituya la fase sensora.

d. Desarrollar fases sensoras basadas en matrices poliméricas capaces de inducir la fosforescencia.

e. Establecer el método de detección más adecuado que permita acoplar la detección fosforescimétrica a una técnica separativa.

f. Aplicar el/los método/s desarrollado/s al análisis de muestras reales.

La presente tesis se estructura en cinco capítulos, comenzando con una introducción general del tema en estudio y luego introducciones específicas en cada uno de los mismos a fin de ampliar las bases que fundamentaron cada objetivo.

## Índice general

---

### Capítulo I: Introducción

1. Sensores ópticos fosforescentes a temperatura ambiente	4
2. Fosforescencia a temperatura ambiente en estado líquido (RTPL)	6
3. Cumarinas	14

### Capítulo II: Fosforescencia a temperatura ambiente en estado líquido en medios protegidos

1. Introducción	21
1.1. Estructura y propiedades de las ciclodextrinas	21
1.2. Formación de complejos de inclusión	23
1.3. Fosforescencia a temperatura ambiente inducida por ciclodextrinas	24
1.3.1. RTP inducida por ciclodextrinas en presencia de oxígeno disuelto (nd-CD-RTP)	24
1.3.1.1. Mecanismos de interacción	25
1.3.1.1.1. Agentes reguladores del espacio	25
1.3.1.1.2. Complejos núcleo-cáscara	26
1.3.1.1.3. Efecto de protección	26
1.3.1.2. Aspectos del tercer y cuarto componente en nd-CD-RTP	27
1.3.1.2.1. Haluros de alcanos y alcoholes	27
1.3.1.2.2. Alcanos sin átomo pesado	28
1.3.1.2.3. Alcoholes	28
1.3.1.2.4. Aminas	28
1.3.1.2.5. Surfactantes	28
1.3.1.3. CD-RTP sustituida con halógenos	28
2. Metodología	30
2.1. Reactivos y disoluciones	30
2.1.1. Determinación de warfarina	30
2.2. Instrumentación analítica	30
3. Resultados y discusión	32
3.1. Estudio de la fosforescencia a temperatura ambiente del complejo de inclusión 1-bromonaftaleno/ $\beta$ -ciclodextrina	32
3.2. Estudio del quenching de fosforescencia a temperatura ambiente del complejo de inclusión 1-bromonaftaleno/ $\beta$ -ciclodextrina/ciclohexano por cumarinas	38
3.2.1. Determinación del mecanismo de quenching	42
3.2.2. Determinación de warfarina en formulaciones farmacéuticas mediante	

quenching de fosforescencia del complejo 1-bromonaftaleno/ $\beta$ -ciclodextrina/ ciclohexano	47
4. Conclusiones	50
4.1. Estudio de la fosforescencia a temperatura ambiente del complejo de inclusión 1-bromonaftaleno/ $\beta$ -ciclodextrina	50
4.2. Estudio del quenching de fosforescencia a temperatura ambiente del complejo de inclusión 1-bromonaftaleno/ $\beta$ -ciclodextrina/ciclohexano por cumarinas	50
4.3. Aspectos relevantes	50
4.4. Posibilidad de desarrollar un optosensor	51

### **Capítulo III: Quantum dots fosforescentes**

<b>Parte I</b>	53
1. Introducción	54
1.1. Quantum dots de ZnS dopados con Mn	57
1.1.1. Mecanismo fotoluminiscente	57
1.2. Aplicaciones analíticas de los QDs fotoluminiscentes	59
2. Metodología	61
2.1. Reactivos y disoluciones	61
2.2. Instrumentación analítica	61
2.3. Síntesis de Mn:ZnS QDs	62
2.4. Consideraciones analíticas para las medidas de fosforescencia	63
2.5. Procedimiento analítico para la determinación de warfarina	63
3. Resultados y discusión	64
3.1. Quantum dots de ZnS dopados con Mn recubiertos con L-cisteína: síntesis y caracterización	64
3.1.1. Absorción	64
3.1.2. Excitación/emisión fotoluminiscente	65
3.1.3. Rendimiento cuántico de fotoluminiscencia	67
3.1.4. Tamaño cristalino	68
3.2. Quantum dots de ZnS dopados con Mn recubiertos con L-cisteína: Interacción con cumarinas	70
3.2.1. Determinación del mecanismo de quenching	74
3.2.2. Determinación de warfarina mediante quenching de fosforescencia de quantum dots de ZnS dopados con Mn	75
3.2.2.1. Selectividad	77
4. Conclusiones	79
4.1 Posibilidad de desarrollar un optosensor	79

<b>Parte II</b>	80
1. Introducción	81
2. Metodología	83
2.1. Seroalbúmina bovina desnaturalizada	83
2.2. Mn:ZnS QDs recubiertos con dBSA	83
2.3. Mn:ZnS QDs recubiertos con BSA	83
3. Resultados y discusión	84
3.1. Mn:ZnS QDs recubiertos con L-cys, BSA y dBSA	84
3.1.1. Espectros de emisión fotoluminiscente	84
3.1.2. Interacción con cumarinas	85
4. Conclusiones	89
<b>Capítulo IV: Inmovilización de quantum dots: desarrollo de fases sensoras</b>	
1. Introducción	91
1.1. Síntesis de polímeros de impresión molecular	92
1.1.1. Proceso de impresión molecular	93
1.1.3. Consideraciones generales	94
1.1.4. Proceso de impresión molecular a seguir	95
2. Metodología	97
2.1. Reactivos y disoluciones	97
2.1.1. Síntesis de los MIPs	97
2.1.2. Lavado de los polímeros	97
2.1.3. Medidas en flujo	97
2.2. Instrumentación analítica	97
2.2.1. Sistema de inyección en flujo	98
2.2.1.1. Celda de flujo	99
2.3. Síntesis de los MIPs	99
2.3.1. Síntesis inicial	99
2.3.1.1. Lavado en celda de flujo	99
2.3.2. Segunda síntesis	100
2.3.2.1. Lavado en celda de flujo	100
2.3.2.2. Lavado en Soxhlet	100
3. Resultados y discusión	101
3.1. Mn:ZnS QDs impresos	101
3.1.1. Análisis espectroscópico y fotoluminiscente del complejo de pre-polimerización	101
3.1.2. QDs impresos: síntesis inicial	103

3.1.2.1. Lavado del MIP en celda de flujo	103
3.1.2.2. Lavado del NIP en celda de flujo	105
3.1.3. QDs impresos: segunda síntesis	107
3.1.3.1. Lavado del NIP en celda de flujo	107
3.1.3.2. Lavado del MIP en celda de flujo	109
3.2. Desarrollo de un optosensor para el reconocimiento selectivo de warfarina	127
3.2.1. MIP/NIP primera síntesis	127
3.2.2. MIP/NIP segunda síntesis	130
3.2.2.1. Prueba luego de los lavados en celda de flujo	130
3.2.2.2. Prueba luego de los lavados en Soxhlet	135
4. Conclusiones	139
<b>Capítulo V: Conclusiones</b>	140
<b>Referencias</b>	143
<b>Anexo I: Tratamiento estadístico</b>	
1. Curva de calibración	151
1.1. Regresión lineal con replicados	151
1.1.1. Ensayo de correlación	152
1.1.2. Ensayo de falta de ajuste	152
1.2. Predicción de la concentración de una muestra incógnita	152
1.3. Ensayo de comparación de pendientes	152
2. Exactitud y precisión del método analítico	154
2.1. Exactitud	154
2.2. Precisión	154
3. Cifras de mérito del método analítico	155
3.1. Sensibilidad de calibración	155
3.2. Sensibilidad analítica	155
3.3. Límite de detección	155
3.4. Límite de cuantificación	156
3.5. Intervalo dinámico	156
3.6. Intervalo lineal	156
<b>Anexo II: Solvatocromismo de la warfarina</b>	157
<b>Agradecimientos</b>	160



## Índice de figuras

---

<b>Figura 1.</b> Diagrama de un sensor	4
<b>Figura 2.</b> Diagrama de Jablonski	6
<b>Figura 3.</b> Metodologías RTPL	9
<b>Figura 4.</b> Estructura de las benzopironas	14
<b>Figura 5.</b> Estructura molecular de las cumarinas en estudio	17
<b>Figura 6.</b> Espectros de absorción de disoluciones acuosas de warfarina (war) -20 % v/v metanol-, cumarina (cou), dicumarol (dic) y umbeliferona (umb)	18
<b>Figura 7.</b> Dimensiones de las $\alpha$ , $\beta$ y $\gamma$ CDs	21
<b>Figura 8.</b> Diagrama esquemático de las unidades de glucopiranosas en una CD	22
<b>Figura 9.</b> Esquema funcional de la CD	23
<b>Figura 10.</b> Complejos de inclusión ternario (a) y cuaternario (b). S: regulador espacial, L: fosforóforo	26
<b>Figura 11.</b> Complejos núcleo-cáscara: (a) $\alpha$ -CD <sub>2</sub> /L; (b) $\beta$ -CD <sub>2</sub> /L/S <sub>2</sub> ; (c) $\beta$ -CD <sub>2</sub> /L <sub>2</sub> S: regulador espacial o tercer componente; L: fosforóforo	26
<b>Figura 12.</b> Efecto de protección por un alcohol	27
<b>Figura 13.</b> Consideraciones experimentales en medidas de fosforescencia	31
<b>Figura 14.</b> Resumen gráfico: Estudio de la fosforescencia a temperatura ambiente del complejo de inclusión 1-bromonaftaleno/ $\beta$ -ciclodextrina	32
<b>Figura 15.</b> Espectros de excitación y emisión RTPL del complejo de inclusión 1-BrN/ $\beta$ -CD	33
<b>Figura 16.</b> Espectro de absorción de 1-BrN en 20 % v/v metanol	33
<b>Figura 17.</b> RTP del complejo de inclusión 1-BrN/ $\beta$ -CD/tercer componente a concentraciones variables del tercer componente utilizando GI90	34
<b>Figura 18.</b> RTP del complejo de inclusión 1-BrN/ $\beta$ -CD/tercer componente a concentraciones variables del tercer componente utilizando GIF	35
<b>Figura 19.</b> RTP del complejo de inclusión 1-BrN/ $\beta$ -CD/CH a concentraciones variables de $\beta$ -CD utilizando GI90 y GIF	36
<b>Figura 20.</b> RTP del complejo de inclusión 1-BrN/ $\beta$ -CD/CH a concentraciones variables de metanol utilizando GI90 y GIF	36
<b>Figura 21.</b> Espectros de excitación y emisión del complejo de inclusión 1-BrN/ $\beta$ -CD/CH en presencia de metanol	37
<b>Figura 22.</b> Resumen gráfico: Estudio del quenching de fosforescencia a temperatura ambiente del complejo de inclusión 1-bromonaftaleno/ $\beta$ -ciclodextrina/ciclohexano por cumarinas	38
<b>Figura 23.</b> Representación gráfica de la ecuación de Stern-Volmer a concentraciones	

variables de warfarina, utilizando GI90 y GIF	39
<b>Figura 24.</b> Representación gráfica de la ecuación de Stern-Volmer a concentraciones variables de cumarina, utilizando GI90 y GIF	39
<b>Figura 25.</b> Representación gráfica de la ecuación de Stern-Volmer a concentraciones variables de dicumarol, utilizando GI90 y GIF	40
<b>Figura 26.</b> Representación gráfica de la ecuación de Stern-Volmer a concentraciones variables de umbeliferona, utilizando GI90 y GIF	40
<b>Figura 27.</b> Mecanismos de quenching. L: luminóforo, Q: quencher	43
<b>Figura 28.</b> Representación gráfica de la ecuación de Stern-Volmer a concentraciones variables de warfarina (■), cumarina (▲), dicumarol (▼) y umbeliferona (►), utilizando GIF	44
<b>Figura 29.</b> Representación gráfica de Benesi-Hildebrand para el sistema 1-BrN/β-CD/CH	45
<b>Figura 30.</b> Representación gráfica de los residuos de la regresión	48
<b>Figura 31.</b> Diagrama de los niveles de energía en función del número de átomos unidos	54
<b>Figura 32.</b> Diagrama de los niveles de energía de un QD	55
<b>Figura 33.</b> Propiedades optoelectrónicas de los QDs en función al tamaño	56
<b>Figura 34.</b> Esquema de las transiciones involucradas en la emisión fotoluminiscente de los QDs	59
<b>Figura 35.</b> Síntesis de los quantum dots de ZnS dopados con Mn (Mn:ZnS QDs)	62
<b>Figura 36.</b> Resumen gráfico: Quantum dots de ZnS dopados con Mn recubiertos con L-cisteína, síntesis y caracterización	64
<b>Figura 37.</b> Espectros de absorción de ZnS y Mn:ZnS QDs	65
<b>Figura 38.</b> Espectros de emisión fotoluminiscente de ZnS y Mn:ZnS QDs	66
<b>Figura 39.</b> Espectros de excitación y emisión fosforescente de Mn:ZnS QDs	66
<b>Figura 40.</b> Espectros de emisión fotoluminiscente de rodamina B (RB) y Mn:ZnS QDs (QDs)	68
<b>Figura 41.</b> Difractograma para Mn:ZnS QDs	69
<b>Figura 42.</b> Resumen gráfico: Quantum dots de ZnS dopados con Mn recubiertos con L-cisteína. Interacción con cumarinas	70
<b>Figura 43.</b> Optimización de Mn:ZnS QDs	71
<b>Figura 44.</b> Optimización de metanol	71
<b>Figura 45.</b> Representación gráfica de la ecuación de Stern-Volmer a concentraciones variables de warfarina (■), cumarina (●), dicumarol (▲) y umbeliferona (▼)	73
<b>Figura 46.</b> Representación gráfica de la ecuación de Stern-Volmer en términos de los tiempos de vida a concentraciones variables de warfarina (■), cumarina (●), dicumarol	

(▲) y umbeliferona (▼)	74
<b>Figura 47.</b> Posible formación de imina entre el grupo amino de L-cys en el QD y el grupo carbonilo de las cumarinas	75
<b>Figura 48.</b> Representación gráfica de los residuos de la regresión	76
<b>Figura 49.</b> Estructura molecular de la warfarina y las interferencias estudiadas: L-triptofano (L-Trp), L-cisteína (L-cys), triptamina (Trypt), β-naftol (β-naph), fenantreno (Phen), antraceno (Anthr) y naftaleno (Naph)	78
<b>Figura 50.</b> Intensidad de RTP de los QDs más warfarina en presencia (I) y ausencia (I <sub>0</sub> ) de interferencias	78
<b>Figura 51.</b> Estructura molecular de las seroalbúminas humana y bovina donde se muestran los residuos de triptofano	82
<b>Figura 52.</b> Resumen gráfico: Mn:ZnS QDs recubiertos con L-cys, BSA y dBSA	84
<b>Figura 53.</b> Espectros de emisión de Mn:ZnS QDs recubiertos con L-cys, BSA y dBSA	85
<b>Figura 54.</b> Representación gráfica de la ecuación de Stern-Volmer	86
<b>Figura 55.</b> Representación gráfica de la ecuación de Stern-Volmer en términos de los tiempos de vida a concentraciones variables de warfarina	87
<b>Figura 56.</b> Esquema de la síntesis de los MIPs	93
<b>Figura 57.</b> Esquema del dispositivo de medida en flujo	98
<b>Figura 58.</b> Resumen gráfico: Mn:ZnS QDs impresos	101
<b>Figura 59.</b> Titulación espectrofotométrica de warfarina con MAA en cloroformo	102
<b>Figura 60.</b> Titulación fluorescimétrica de warfarina con MAA	103
<b>Figura 61.</b> Diagrama: lavado del MIP con metanol (MIP 1)	104
<b>Figura 62.</b> Espectros de absorción de las fracciones recolectadas (MIP 1)	104
<b>Figura 63.</b> Espectros de fosforescencia antes y después del lavado con metanol (MIP 1)	105
<b>Figura 64.</b> Diagrama: lavado del NIP con metanol (NIP 1)	106
<b>Figura 65.</b> Espectros de absorción de las fracciones recolectadas (NIP 1)	106
<b>Figura 66.</b> Espectros de fosforescencia antes y después del lavado con metanol (NIP 1)	107
<b>Figura 67.</b> Diagrama: lavado del NIP con metanol (NIP 2)	108
<b>Figura 68.</b> Espectros de absorción de las fracciones recolectadas (NIP 2)	108
<b>Figura 69.</b> Espectros de fosforescencia antes y después del lavado con metanol (NIP 2)	109
<b>Figura 70.</b> Diagrama: lavado del MIP con metanol (MIP 2)	110
<b>Figura 71.</b> Espectros de absorción de las fracciones recolectadas (MIP 2)	110
<b>Figura 72.</b> Espectros de fosforescencia antes y después del lavado con metanol	

(MIP 2)	111
<b>Figura 73.</b> Espectros de fluorescencia después del lavado con metanol excitando a tres longitudes de onda (MIP 2)	111
<b>Figura 74.</b> Diagrama: lavados sucesivos del MIP (MIP 2)	112
<b>Figura 75.</b> Espectros de fosforescencia después de los sucesivos lavados (MIP 2)	113
<b>Figura 76.</b> Espectros de fluorescencia después de los sucesivos lavados excitando a dos longitudes de onda (MIP 2)	113
<b>Figura 77.</b> Espectros de absorción de las fracciones recolectadas. Lavado con ACN (MIP 2)	114
<b>Figura 78.</b> Espectros de absorción de las fracciones recolectadas. Lavado con ACN/buffer 50:50 v/v (MIP 2)	114
<b>Figura 79.</b> Espectros de absorción de las fracciones recolectadas. Lavado con buffer (MIP 2)	115
<b>Figura 80.</b> Espectros de fluorescencia de las fracciones recolectadas (MIP 2)	115
<b>Figura 81.</b> Espectros de fluorescencia de las fracciones recolectadas (MIP 2)	116
<b>Figura 82.</b> Espectros de fluorescencia de las fracciones recolectadas (MIP 2)	116
<b>Figura 83.</b> Diagrama: lavado del MIP con ACN/buffer 15:85 v/v (MIP 2)	117
<b>Figura 84.</b> Espectros de fosforescencia antes y después del lavado con ACN/buffer 15:85 v/v (MIP 2)	118
<b>Figura 85.</b> Espectros de fluorescencia antes y después del lavado con ACN/buffer 15:85 v/v excitando a tres longitudes de onda (MIP 2)	118
<b>Figura 86.</b> Espectros de fluorescencia de las fracciones recolectadas (MIP 2)	119
<b>Figura 87.</b> Espectros de excitación y emisión de fluorescencia de la warfarina en ACN/buffer 15:85 v/v	120
<b>Figura 88.</b> Espectro de absorción de la mezcla metanol/acético 90:10 v/v	121
<b>Figura 89.</b> Espectros de absorción del primer lavado con metanol/acético 90:10 v/v	121
<b>Figura 90.</b> Espectros de absorción del segundo lavado con metanol/acético 90:10 v/v	122
<b>Figura 91.</b> Espectros de absorción del lavado con metanol	122
<b>Figura 92.</b> Espectros de fosforescencia luego del lavado con metanol/acético 90:10 v/v y metanol (MIP 2)	123
<b>Figura 93.</b> Espectros de fluorescencia luego de los lavados con metanol/acético 90:10 v/v y metanol, excitando a dos longitudes de onda (MIP 2)	123
<b>Figura 94.</b> Espectros de absorción del lavado con ACN/buffer y el correspondiente espectro de absorción de la mezcla ACN/buffer	124
<b>Figura 95.</b> Espectros de absorción del lavado con metanol y el correspondiente espectro de absorción del metanol	125
<b>Figura 96.</b> Espectros de fosforescencia luego del lavado con ACN/buffer y metanol,	

excitando a dos longitudes de onda (MIP 2)	125
<b>Figura 97.</b> Espectros de fluorescencia luego del lavado con ACN/buffer y metanol, excitando a dos longitudes de onda (MIP 2)	126
<b>Figura 98.</b> Resumen gráfico: Desarrollo de un optosensor para el reconocimiento selectivo de warfarina	127
<b>Figura 99.</b> Inyección de disoluciones de warfarina en metanol (MIP 1)	128
<b>Figura 100.</b> Inyección de disoluciones de warfarina en metanol (NIP 1)	128
<b>Figura 101.</b> Inyección de disoluciones de cumarina en metanol (NIP 1)	129
<b>Figura 102.</b> Inyección de disoluciones de dicumarol en metanol (NIP 1)	129
<b>Figura 103.</b> Inyección de disoluciones de umbeliferona en metanol (NIP 1)	130
<b>Figura 104.</b> Inyección de disoluciones de warfarina en metanol (MIP 2)	131
<b>Figura 105.</b> Inyección de disoluciones de cumarina en metanol (MIP 2)	131
<b>Figura 106.</b> Inyección de disoluciones de dicumarol en metanol (MIP 2)	132
<b>Figura 107.</b> Inyección de disoluciones de umbeliferona en metanol (MIP 2)	132
<b>Figura 108.</b> Inyección de disoluciones de warfarina en metanol (NIP 2)	133
<b>Figura 109.</b> Inyección de disoluciones de cumarina en metanol (NIP 2)	133
<b>Figura 110.</b> Inyección de disoluciones de dicumarol en metanol (NIP 2)	134
<b>Figura 111.</b> Inyección de disoluciones de umbeliferona en metanol (NIP 2)	134
<b>Figura 112.</b> Inyección de una disolución de warfarina en ACN/buffer 15:85 v/v (MIP 2)	135
<b>Figura 113.</b> Inyección de disoluciones de warfarina en metanol (MIP 2)	136
<b>Figura 114.</b> Inyección de disoluciones de cumarina en metanol (MIP 2)	136
<b>Figura 115.</b> Inyección de disoluciones de dicumarol en metanol (MIP 2)	137
<b>Figura 116.</b> Inyección de disoluciones de umbeliferona en metanol (MIP 2)	137
<b>Figura 117.</b> Inyección de disoluciones de warfarina en ACN/buffer 15:85 v/v (MIP 2)	138

## Índice de tablas

---

<b>Tabla 1.</b> Procesos fotofísicos representados en el diagrama de Jablonski	7
<b>Tabla 2.</b> Metodologías RTPL	10
<b>Tabla 3.</b> Clasificación de las cumarinas en sus cuatro grupos principales	16
<b>Tabla 4.</b> Propiedades físicas de las CDs	22
<b>Tabla 5.</b> Coeficientes de extinción molar de las cumarinas en estudio a 281 nm	41
<b>Tabla 6.</b> Constantes de Stern-Volmer para las cumarinas en estudio	41
<b>Tabla 7.</b> ANAVA	47
<b>Tabla 8.</b> Exactitud y precisión del método a tres niveles de concentración	48
<b>Tabla 9.</b> Cifras de mérito para la determinación de warfarina	49
<b>Tabla 10.</b> Coeficientes de extinción molar	72
<b>Tabla 11.</b> Constantes de Stern-Volmer	73
<b>Tabla 12.</b> ANAVA	75
<b>Tabla 13.</b> Exactitud y precisión del método a tres niveles de concentración	76
<b>Tabla 14.</b> Cifras de mérito para la metodología analítica propuesta	77
<b>Tabla 15.</b> Constantes de Stern-Volmer	86
<b>Tabla 16.</b> Test de comparación de pendientes	88

*Introducción*

La fotoluminiscencia molecular ha sido, desde hace ya varias décadas, una herramienta sensible y versátil en la Química Analítica. El hecho de no sólo poder detectar la fotoluminiscencia intrínseca de las moléculas sino también cambios en la misma debido a la presencia de moléculas extrañas, nos ha brindado un gran abanico de posibilidades a la hora de desarrollar nuevos métodos analíticos.

La creciente demanda de técnicas analíticas sensibles, selectivas, rápidas (incluso a tiempo real) y sencillas ha impulsado el desarrollo exponencial de metodologías fotoluminiscentes por sobre las espectrofotométricas, tradicionalmente utilizadas en el área de métodos ópticos de análisis. La absorción de energía radiante por parte de la molécula y una posterior emisión de energía electromagnética desde un estado electrónico excitado a uno fundamental es la base de los fenómenos fotoluminiscentes. En función de la transición electrónica implicada, pueden distinguirse dos procesos radiativos: la fluorescencia (desde un estado singlete excitado a uno singlete fundamental) y la fosforescencia (desde un estado triplete excitado a uno singlete fundamental). A pesar que la fluorescencia ha sido ampliamente utilizada como técnica analítica, la fosforescencia presenta ciertas ventajas que hacen de ella una metodología en constante auge y desarrollo. Así, la selectividad es una característica inherente a la fosforimetría ya que la emisión aparece en regiones del espectro electromagnético menos pobladas y son pocas las moléculas que emiten fosforescencia en comparación con la fluorescencia. Además, dado que las transiciones triplete-singlete son prohibidas, el tiempo de vida del estado triplete es relativamente largo haciendo posible la discriminación temporal de la emisión, incrementando la selectividad de la técnica. Estas excepcionales características analíticas, sumado al bajo costo de la instrumentación requerida, hacen de la fosforescencia una técnica especialmente atractiva [1].

En el pasado, la fosforescencia era estudiada en sistemas rígidos, inicialmente en aquellos a la temperatura del nitrógeno líquido [2, 3] y posteriormente en analitos adsorbidos sobre soportes sólidos [3-5], debido a la necesidad de suprimir la difusión de “quencheadores” del estado de triplete, en especial del oxígeno molecular disuelto, y de restringir los movimientos internos de la molécula fosforescente. El interés por obtener señales fosforescentes en disolución a temperatura ambiente, sobre todo en disolución acuosa, impulsó la investigación tendiente al desarrollo de metodologías fosforescentes aplicables a un amplio grupo de compuestos en disolución para su posible adaptación como metodología de detección en sistemas dinámicos [6]. La fosforescencia a temperatura ambiente en el estado líquido (RTPL) incluye las siguientes técnicas: la fosforescencia a temperatura ambiente estabilizada por micelas (MS-RTP), la fosforescencia a temperatura ambiente inducida por ciclodextrinas (CD-RTP) y la fosforescencia a temperatura ambiente en medios no protegidos (NP-RTP) [7].

La sensibilidad del estado electrónico triplete excitado a factores externos requiere, generalmente, una protección efectiva hacia el oxígeno disuelto y un bloqueo o disminución de los procesos de decaimiento no radiativos. Esta limitación práctica, por la cual en sus comienzos la fosforescencia era sólo detectable en medios rígidos, crea a su vez nuevas posibilidades a la hora de desarrollar un



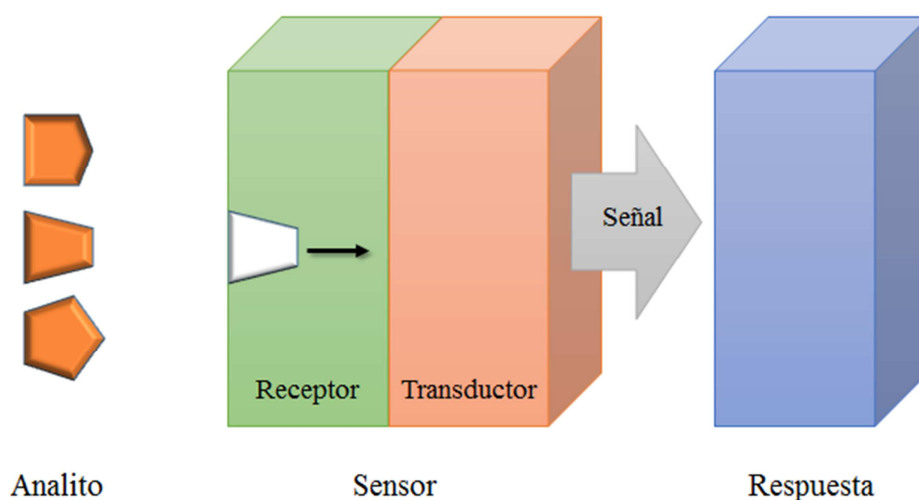
método de detección. Es así como el campo de aplicación de la RTPL se amplía al extenderse más allá del grupo de compuestos que fosforescen naturalmente: cualquier compuesto o parámetro del solvente que sea capaz de modificar la señal fosforescente, positiva o negativamente, puede ser detectado. Este hecho ha creado un creciente interés en el desarrollo de sensores fosforescentes a temperatura ambiente como herramienta analítica.

Durante los últimos años, se ha impulsado el desarrollo de sensores (bio)químicos fosforescentes a temperatura ambiente. La miniaturización de las fases sensoras es posible gracias a la elevada sensibilidad de la fosforescencia, permitiendo su adaptación a fibras ópticas y, de esta manera, el análisis a grandes distancias o en ambientes peligrosos. Sin embargo, a pesar de las notables ventajas que presentan, son pocos los sensores ópticos fosforescentes a temperatura ambiente desarrollados hasta la fecha, hecho derivado fundamentalmente del reducido número de moléculas que poseen RTP [1].

El presente trabajo de tesis doctoral persigue la siguiente meta: desarrollar sensores ópticos fosforescentes a temperatura ambiente en estado líquido, su posible adaptación como fases sensoras y la aplicación al análisis de cumarinas, especialmente warfarina, dada su relevancia en el control toxicológico. A continuación, se discutirán y se presentarán las bases teóricas de los tres temas pilares de este trabajo de tesis doctoral: sensores ópticos fosforescentes a temperatura ambiente, fosforescencia a temperatura ambiente en estado líquido y cumarinas.

### 1. Sensores ópticos fosforescentes a temperatura ambiente

De acuerdo con las definiciones de la IUPAC [8], un sensor químico es un dispositivo que transforma información química en una señal analítica útil. La información química puede originarse a partir de una reacción química del analito o de una propiedad física del sistema en estudio. Un sensor químico contiene dos unidades básicas funcionales: un receptor y un transductor (Figura 1). Algunos sensores pueden incluir un separador el cual es, por ejemplo, una membrana.



**Figura 1.** Diagrama de un sensor

En el receptor, la información química es transformada en una forma de energía que puede ser medida por el transductor. Su funcionamiento puede basarse en principios físicos, químicos o bioquímicos. El transductor es un dispositivo capaz de transformar la energía que contiene la información química de la muestra en una señal analítica. Definido así, el transductor no muestra selectividad. Los sensores son diseñados normalmente para operar bajo condiciones bien definidas y para analitos específicos en determinados tipos de muestras. Por lo tanto, no es siempre necesario que un sensor responda específicamente a un dado analito. Bajo condiciones operativas controladas, la señal del analito debe ser independiente de otros componentes de la muestra, permitiendo la determinación del mismo sin mayores pretratamientos. De no ser posible, pueden utilizarse sensores inespecíficos pero satisfactorios en serie para análisis multicomponente utilizando métodos de calibración multivariada que permitan un procesamiento de la señal (arreglos de sensores).

Los sensores químicos pueden clasificarse según el principio operacional del transductor [8]. Dentro de dicha clasificación, los sensores ópticos son aquellos dispositivos que transforman los cambios relacionados con fenómenos ópticos resultantes de la interacción del analito con el receptor. Este

grupo puede subdividirse de acuerdo a la propiedad óptica que sufre el cambio (absorbancia, reflectancia, fotoluminiscencia, etc.) como consecuencia de una variación en la concentración de la especie que se pretende determinar.

Es importante tener en cuenta, a la hora de desarrollar una fase sensora basada en medidas de RTP, una serie de parámetros que van a determinar las propiedades analíticas del sensor: sensibilidad, selectividad y tiempo de respuesta. Indudablemente, el elemento más crítico es la “fase activa” al analito, la cual deberá reconocer a la especie de interés. Como veremos más adelante, el desarrollo de la RTP requiere de ciertas consideraciones sin las cuales no podríamos obtener una señal analíticamente útil. A lo largo del presente trabajo evaluaremos dos escenarios:

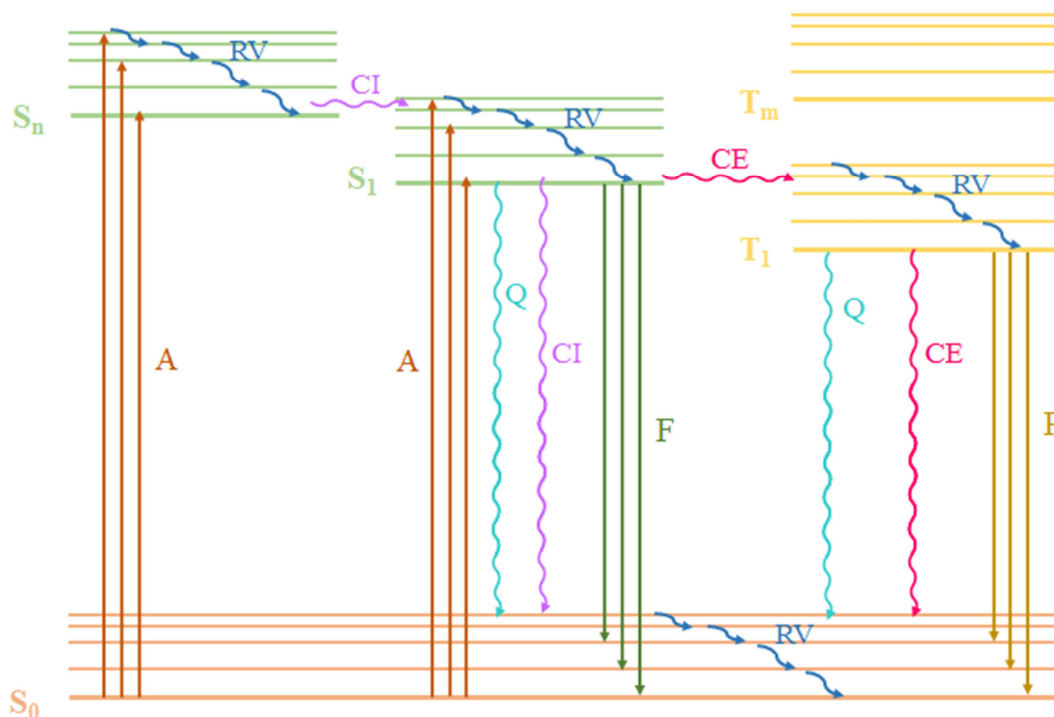
(i) sensores ópticos fosforescentes a temperatura ambiente en estado líquido, donde se optimizarán las condiciones del sistema que permita obtener RTP en disolución;

(ii) optosensores, donde se intentará inmovilizar el sistema optimizado en (i) sobre matrices sólidas a fin de utilizar dicha fase sensora, ahora empaquetada dentro de una celda de flujo, en sistemas de análisis por inyección en flujo (FIA) con detección fotoluminiscente.

## 2. Fosforescencia a temperatura ambiente en estado líquido (RTPL)

La fosforescencia de las moléculas orgánicas puede definirse como la transición radiativa originada comúnmente desde el menor estado excitado triplete,  $T_1$ , al estado singlete fundamental,  $S_0$ . Contrario a la fluorescencia, comúnmente observada desde el singlete  $S_1$  al singlete  $S_0$ , la fosforescencia es un proceso prohibido por espín por lo que sus rendimientos cuánticos son usualmente menores. Aun así, puede observarse bajo ciertas condiciones específicas en las cuales los estados puros singlete y triplete se mezclan para producir estados con carácter mixto en la multiplicidad de espín (acoplamiento espín-órbita interno o externo).

Los procesos fotofísicos que pueden ocurrir luego del proceso inicial de la absorción de la energía radiante que lleva a una molécula (o sistema) a un estado cualquiera singlete excitado vibracionalmente (vibrónico), se representan en la Figura 2. Las ecuaciones cinéticas y las constantes de velocidad que regulan estos procesos fotofísicos se detallan en la Tabla 1.



**Figura 2.** Diagrama de Jablonski

Brevemente, a fin de obtener fosforescencia, el fosforóforo es excitado con energía radiante de la longitud de onda adecuada. Luego de la excitación, rápidamente tiene lugar la relajación vibracional (RV) y la conversión interna (CI). Así, la fluorescencia (F) será emitida generalmente desde el nivel vibracional más bajo del menor estado electrónico singlete excitado,  $S_1$ . Muchas moléculas orgánicas también experimentan CI o quenching (Q) y posterior RV al estado fundamental  $S_0$ . Una fracción de

las moléculas excitadas experimentará el cruce entre sistemas (CE) hacia algún nivel vibracional del estado electrónico triplete excitado,  $T_1$ , con la consiguiente RV y emisión fosforescente (P) hacia  $S_0$  o bien desactivación por procesos de decaimiento no radiativo: CE y Q.

Proceso fotofísico	Denominación	Ecuación cinética	Constante de velocidad	Orden del proceso (s)
<b>Absorción</b>	A	$S_0 + hv \rightarrow S_1^*$		$10^{-15}$
<b>Relajación vibracional</b>	RV	$S_1^* \rightarrow S_1 + \text{calor}$		$10^{-13} - 10^{-11}$
<b>Fluorescencia</b>	F	$S_1 \rightarrow S_0^* + hv_f$	$k_f$	$10^{-9} - 10^{-8}$
<b>Conversión interna</b>	CI	$S_1 \rightarrow S_0^*$	$k_{nf}$	$10^{-9} - 10^{-8}$
<b>Quenching</b>	Q	$S_1 + Q \rightarrow S_0^* + Q$	$k_{q,f}[Q]$	$10^{-10} - 10^{-2}$
<b>Cruce entre sistemas</b>	CE	$S_1 \rightarrow T_1^*$	$k_t$	$10^{-9} - 10^{-8}$
<b>Relajación vibracional</b>	RV	$T_1^* \rightarrow T_1$		$10^{-13} - 10^{-11}$
<b>Fosforescencia</b>	P	$T_1 \rightarrow S_0^* + hv_p$	$k_p$	$10^{-4} - 10$
<b>Cruce entre sistemas</b>	CE	$T_1 \rightarrow S_0^*$	$k_{np}$	$10^{-4} - 10$
<b>Quenching</b>	Q	$T_1 + Q \rightarrow S_0^* + Q$	$k_{q,p}[Q]$	$10^{-10} - 10^{-2}$
<b>Relajación vibracional</b>	RV	$S_0^* \rightarrow S_0 + \text{calor}$		$10^{-13} - 10^{-11}$

**Tabla 1.** Procesos fotofísicos representados en el diagrama de Jablonski

El asterisco representa a los estados vibrónicos

El rendimiento cuántico de fosforescencia ( $\varphi_p$ ) en presencia de una molécula extraña (quencher) puede definirse como:

$$\varphi_p = \varphi_t \theta_p = \frac{k_t}{k_t + k_f + k_{nf} + \sum k_{q,f}[Q]} \frac{k_p}{k_p + k_{np} + \sum k_{q,p}[Q]} \quad (1)$$

$$\theta_p = \frac{k_p}{k_p + k_{np} + \sum k_{q,p}[Q]} \quad (2)$$

donde  $\phi_t$  es el rendimiento cuántico del cruce entre sistemas,  $\theta_p$  es la eficiencia cuántica de fosforescencia,  $k_t$  es la constante de velocidad del cruce entre sistemas,  $k_f$  y  $k_p$  son las constantes de velocidad de fluorescencia y fosforescencia, respectivamente,  $k_{nf}$  y  $k_{np}$  son las constantes de velocidad de los procesos de decaimiento no radiativos de fluorescencia y fosforescencia, respectivamente,  $\sum k_{q,f}[Q]$  y  $\sum k_{q,p}[Q]$  son la suma de todas las constantes de velocidad de quenching (unimoleculares) efectivos de fluorescencia y fosforescencia, respectivamente [6, 9-11].

De la ecuación (1) puede deducirse que el rendimiento cuántico de fosforescencia puede incrementarse de dos formas: aumentando  $k_t$  por acoplamiento espín-órbita interno o externo (efecto del átomo pesado), el cual mezcla los estados puros singlete y triplete para producir estados con carácter mixto en multiplicidad de espín, o bien reduciendo las constantes de velocidad de decaimiento no radiativo. En estado vítreo, a baja temperatura, los procesos no radiativos pueden inhibirse ampliamente obteniendo alta sensibilidad y espectros de estructura fina bien definidos. Sin embargo, se ve limitado al requerirse instrumentos y solventes adecuados para obtener condiciones criogénicas. Es por ello que la fosforescencia a temperatura ambiente (RTP) ha sido siempre una opción muy interesante en Química Analítica. Se han utilizado varias metodologías con el fin de minimizar los procesos no radiativos y de quenching de modo de aumentar los rendimientos cuánticos de fosforescencia, por ejemplo, RTP en sustrato sólido (SS-RTP) -inmovilización de los fosforóforos en un soporte sólido o matriz- o RTP en estado líquido (RTPL), tal como RTP estabilizada por micelas (MS-RTP), RTP inducida por ciclodextrinas (CD-RTP) -protección del fosforóforo del quenching en presencia de un medio organizado en ambos casos (P-RTP)- y RTP en medios no protegidos (NP-RTP), usualmente también denominada RTP inducida por átomos pesados (HAI-RTP).

En términos generales, para lograr obtener RTPL, las siguientes condiciones son necesarias, no siendo indispensable cumplir las tres en simultáneo:

- (i) presencia de un átomo pesado, externo o intramolecular, a fin de aumentar la velocidad de cruce entre sistemas y así incrementar la población del estado triplete;
- (ii) presencia de un medio organizado a fin de proteger el estado triplete del quenching por oxígeno u otros quenchers;
- (iii) remoción completa del oxígeno disuelto.

La Figura 3 muestra un esquema de las principales metodologías que se han desarrollado a fin de obtener señales de RTPL analíticamente útiles.



**Figura 3.** Metodologías RTPL

La RTP en medios organizados, o en medios protegidos (P-RTP), se basa en la presencia de un microentorno, micelar (MS-RTP) –concentración del surfactante superior a la concentración micelar crítica- o de ciclodextrinas (CD-RTP), que le otorgue rigidez y protección al estado triplete excitado del fosforóforo, disminuyendo así los procesos de decaimiento no radiativos. La adición de átomos pesados externos a las disoluciones favorece la eficiencia del cruce entre sistemas, aumentando el rendimiento cuántico de fosforescencia y, por tanto, su intensidad.

Los medios organizados no previenen el queching del fosforóforo por el oxígeno disuelto, aun a pesar de la reducción en  $k_q$  gracias a un aumento en la viscosidad del microentorno que rodea al fosforóforo. Por lo tanto, en MS-RTP y CD-RTP, una desoxigenación eficiente es sumamente importante a fin de obtener RTPL. El uso de nitrógeno para la desoxigenación no es adecuado en sistemas micelares dada la continua formación de espuma durante la purga. Uno de los métodos más eficientes para solventar este inconveniente fue el desarrollado por M. E. Díaz García y A. Sanz-Medel en el año 1986 [12], el cual consiste en la adición de sulfito de sodio para la eliminación del oxígeno disuelto por medio de la reacción redox entre ambos. Este método ha sido ampliamente utilizado para los sistemas MS-RTP, d-CD-RTP y HAI-RTP.

Es posible obtener RTP en presencia de ciclodextrinas aun sin desoxigenar el sistema. La metodología nd-CD-RTP se basa en la formación de complejos de inclusión ternarios ciclodextrina/fosforóforo/tercer componente en los cuales la protección del estado triplete excitado es mayor y, por lo tanto, el oxígeno disuelto no es capaz de producir quenching de la fosforescencia. El átomo pesado puede pertenecer a cualquiera de los tres componentes, teniendo así varias combinaciones posibles.

La RTP sin medios organizados se basa en la utilización de sulfito de sodio como agente desoxigenante y relativamente elevadas concentraciones de átomo pesado a fin de favorecer el acoplamiento espín-órbita. El grupo de investigación de la Universidad de Tsing Hua la ha denominado RTP en medios no protegidos (NP-RTP) [13] mientras que el de la Universidad de Granada, RTP inducida por átomo pesado (HAI-RTP) [14]. La distinción se basa en que la NP-RTP puede incluir también a la RTP sensibilizada (no desarrollada en el presente trabajo). La elevada concentración de átomo pesado minimiza la distancia átomo pesado/fosforóforo, favoreciendo el cruce entre sistemas y disminuyendo los procesos de decaimiento no radiativo por acción de quenchers, especialmente del oxígeno disuelto.

La Tabla 2 resume las características de las metodologías RTPL consideradas.

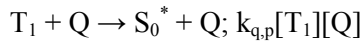
Metodología	Medio organizado	Átomo pesado	Desoxigenación
<b>MS-RTP</b>	Micelas o microemulsiones	Si ( $TI^+$ , I generalmente – compuestos inorgánicos-)	Si (generalmente $Na_2SO_3$ )
<b>d-CD-RTP</b>	Ciclodextrinas	Si ( $TI^+$ , I generalmente – compuestos inorgánicos-)	Si (generalmente $Na_2SO_3$ )
<b>nd-CD-RTP</b>	Ciclodextrinas	Si (generalmente $Br^-$ , perteneciente a la ciclodextrina, fosforóforo o tercer componente – compuestos orgánicos-)	No
<b>NP-RTP (HAI-RTP)</b>	No	Si (generalmente I <sup>-</sup> o $Br^-$ en elevada concentración – compuestos inorgánicos-)	Si ( $Na_2SO_3$ )

**Tabla 2.** Metodologías RTPL



### 2.1. Quenching de la fosforescencia

Cuando en el sistema existe una molécula extraña, el proceso que puede ocurrir se representa mediante (Tabla 1):



Este proceso está regulado por la constante  $k_{q,p}$  que puede ser calculada mediante la ley de Stern-Volmer.

Si se considera a  $\varphi_p^0$  como el rendimiento cuántico de fosforescencia en ausencia de la sustancia extraña, la ecuación (1) se reduce a:

$$\varphi_p^0 = \varphi_t \frac{k_p}{k_p + k_{np}} \quad (3)$$

Combinando las ecuaciones (1) y (3), se obtiene:

$$\frac{\varphi_p^0}{\varphi_p} = 1 + \frac{k_{q,p}[Q]}{k_p + k_{np}} = 1 + K_{SV}[Q] \quad (4)$$

siendo  $K_{SV}$  la constante de Stern-Volmer la cual, cuando se conoce el tiempo de decaimiento de la fosforescencia ( $\tau_p$ ), permite calcular el valor de la constante  $k_{q,p}$ :

$$K_{SV} = k_{q,p}\tau_p \quad (5)$$

Si se quiere determinar la eficiencia de la emisión de fotones, se debe medir la pérdida de población del estado excitado en función del tiempo y la cantidad de fotones absorbidos por la sustancia irradiada. La relación entre el número de fotones emitidos al número de fotones absorbidos define el rendimiento de la emisión ( $\varphi$ ). Así, el rendimiento cuántico de fotoluminiscencia ( $pl$ ) estará dado por:

$$\varphi_{pl} = \frac{I_{pl}}{I_a} \quad (6)$$

donde  $I_{pl}$  es la energía radiante de fotoluminiscencia emitida e  $I_a$  es la energía radiante absorbida. Esta última se expresa como el número de fotones absorbidos por segundo y está relacionada con la ley de Beer según

$$I_a = I_0(1 - 10^{-\epsilon bc}) \quad (7)$$

donde  $I_0$  es la energía del haz incidente,  $\varepsilon$  el coeficiente de extinción molar de la sustancia,  $c$  la concentración molar y  $b$  la longitud del camino óptico.

Combinando las ecuaciones (6) y (7) se obtiene:

$$I_{pl} = \varphi_{pl} I_0 (1 - 10^{-\varepsilon bc}) \quad (8)$$

El término exponencial de la ecuación (8) puede desarrollarse como una serie de Maclaurin:

$$I_{pl} = \varphi_{pl} I_0 \left[ 2,303 \varepsilon bc - \frac{(2,303 \varepsilon bc)^2}{2!} + \frac{(2,303 \varepsilon bc)^3}{3!} - \dots \right] \quad (9)$$

Siempre que el término  $2,303 \varepsilon bc$  sea menor a 0,05, se puede realizar la siguiente simplificación con un error relativo máximo del 2,5%:

$$I_{pl} = \varphi_{pl} I_0 2,303 \varepsilon bc \quad (10)$$

Es importante remarcar que las intensidades de fotoluminiscencia son proporcionales a la concentración de las especies emisoras sólo en un intervalo limitado de absorbancias. En espectrofluorómetros que utilizan una geometría óptica a  $90^\circ$  (la celda es iluminada en el centro y la observación es a  $90^\circ$ ), la intensidad de la energía de excitación en el centro de la celda puede disminuir debido a la absorción de la muestra. Este efecto puede reducir la intensidad de la excitación en el punto de observación o disminuir la fotoluminiscencia observada por absorción de la misma. La importancia relativa de cada proceso depende del valor de absorbancia de la muestra a las longitudes de onda de excitación y emisión. Si la muestra posee una absorción significativa a las longitudes de excitación ( $A_{exc}$ ) y emisión ( $A_{em}$ ), las intensidades de excitación y emisión serán atenuadas en  $10^{-0,5A_{exc}}$  y  $10^{-0,5A_{em}}$ , respectivamente [2, 15]. Estos efectos definen el denominado *efecto de filtro interno (EFI)*. Cuando la absorbancia de la disolución es menor a 0,3 [16], la siguiente ecuación puede aplicarse a fin de corregir por los EFI:

$$I_{corr} = I_{obs} \text{antilog} \left( \frac{A_{exc} + A_{em}}{2} \right) \quad (11)$$

donde  $I_{corr}$  e  $I_{obs}$  son las intensidades de fotoluminiscencia corregidas y observadas, respectivamente, en celdas de 1,0 cm de camino óptico.  $A_{exc}$  y  $A_{em}$  son las absorbancias a las longitudes de onda de excitación y emisión, respectivamente, medidas en celdas de 1,0 cm de camino óptico.

La intensidad aparente de fotoluminiscencia y la distribución espectral pueden depender de la absorbancia de la muestra y la geometría precisa de iluminación de la misma. La iluminación frontal, en la cual la superficie iluminada está orientada  $30^\circ$  respecto al haz incidente, posee dos ventajas:

- es menor la energía radiante reflejada que ingresa al monocromador de emisión,
- la energía radiante incidente es distribuida sobre una mayor área superficial, disminuyendo la sensibilidad de la medida hacia el lugar preciso donde se sitúa la celda dentro de su soporte.

Una desventaja de esta orientación es una disminución de la sensibilidad debido a que una fracción mayor de la energía radiante incidente es reflejada fuera de la superficie de la celda [15].

Para el caso de la fosforescencia,  $\varphi_{pi} = \varphi_t \theta_p$ , resultando:

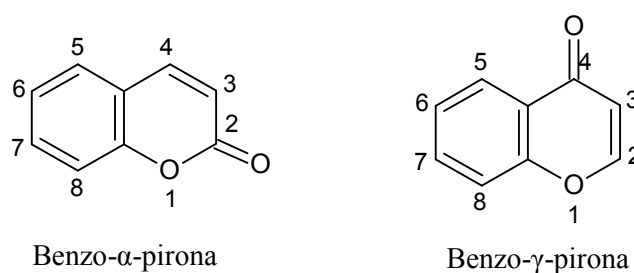
$$I_p = \varphi_t \theta_p I_o 2,303 \varepsilon bc \quad (12)$$

Dado que generalmente la especie fosforescente no absorbe a las longitudes de onda de emisión, la ecuación (11) se simplifica y, en la mayoría de los casos, no corrige completamente los EFI (utilizando geometría de iluminación a 90°). La geometría óptica de iluminación frontal es una buena alternativa para evitar posibles EFI; en este caso, la ecuación (11) no es aplicable.

### 3. Cumarinas

*“Colorless, crystalline and natural”,  
a simple description for a group of  
compounds with multiple therapeutic effects,  
found throughout the plant kingdom<sup>†</sup>.*

Las cumarinas fueron aisladas por primera vez en el año 1820. Su nombre se deriva de *Coumarouna odorata Aube*, haba tonka, semilla del árbol *Dipteryx odorata* de la familia *Fabaceae*, del cual se aisló por primera vez el miembro más simple de esta clase, la cumarina. Se clasifican como miembros de la familia de las benzopironas, las cuales se subdividen en benzo- $\alpha$ -pironas, grupo al cual pertenecen las cumarinas, y benzo- $\gamma$ -pironas donde los flavonoides son sus principales miembros (Figura 4).



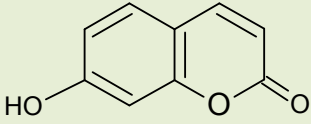
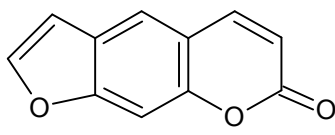
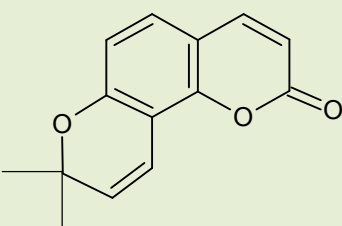
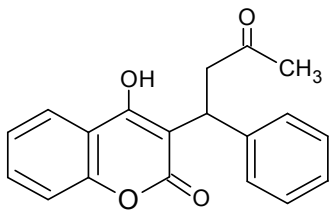
**Figura 4.** Estructura de las benzopironas

La clasificación de las cumarinas puede realizarse en cuatro subtipos: cumarinas simples, furanocumarinas, piranocumarinas y cumarinas sustituidas en el anillo de pirona. Las cumarinas simples son los derivados hidroxilados, alcoxilados y alquilados en el anillo benzénico de la cumarina. Las furanocumarinas, lineales o angulares, consisten en un anillo furánico de cinco miembros unido al núcleo de la cumarina con sustituyentes en una o ambas posiciones libres del anillo benzénico. Las piranocumarinas son análogas a las furanocumarinas pero contienen un anillo de seis miembros. Los sustituyentes en el anillo de pirona de la cumarina generalmente se encuentran en los carbonos 3 ó 4. La Tabla 3 resume la clasificación de las cumarinas, algunos ejemplos y aplicaciones de las mismas.

<sup>†</sup> “Sin color, cristalinas y naturales”, una simple descripción de un grupo de compuestos que se encuentra distribuido a lo largo del reino vegetal con múltiples efectos terapéuticos [17].

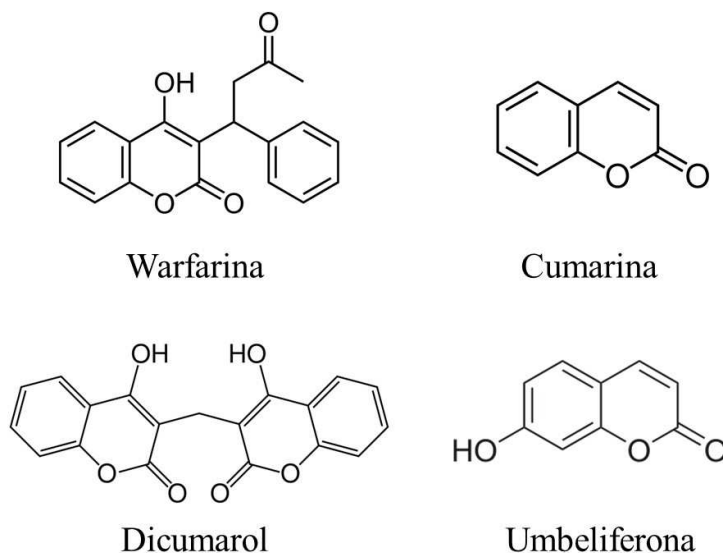
Las cumarinas se encuentran ampliamente distribuidas en el reino vegetal y en cantidades notables en ciertas especies. La mayoría de las cumarinas se hallan en plantas vasculares y, aunque se distribuyen a lo largo de la planta, los mayores niveles ocurren en los frutos, seguido por las raíces, tallos y hojas. A pesar que la mayor parte de las cumarinas naturales se han aislado de plantas, algunos miembros importantes de la familia, como la novobiocina y la cumermicina, se han podido aislar de microorganismos. Uno de los factores principales que ha motivado el interés por esta familia de compuestos es su variada actividad biológica. Las cumarinas exhiben gran actividad farmacocinética debido a su rápida absorción y metabolismo en el organismo; su actividad fisiológica, bacteriostática y antitumoral las ha convertido en potenciales compuestos para variadas aplicaciones terapéuticas. Se han reportado aplicaciones clínicas en el tratamiento de diversas enfermedades, como ser infecciones crónicas, inflamación, edema y cáncer, y su potencial rol en la prevención y esparcimiento de la enfermedad, efectos antioxidantes y antitumorales. Las aplicaciones bioquímicas, farmacológicas y terapéuticas de las cumarinas simples se relacionan con sus patrones de sustitución, siendo además ampliamente utilizadas como aditivos en la industria alimenticia y cosmética. Dentro de las actividades biológicas que se les han atribuido a las cumarinas simples y sus análogos se destacan las antimicrobianas, antivirales, anticancerígenas, de inhibición enzimática, antiinflamatorias, antioxidantes, anticoagulantes y aquellas relacionadas con las actividades del sistema nervioso central.

Por muchos años, las cumarinas y compuestos relacionados han demostrado tener un potencial terapéutico significativo; provienen de una amplia variedad de fuentes naturales y nuevos derivados de cumarinas están siendo descubiertos y/o sintetizados. Las cumarinas poseen múltiples actividades biológicas, incluyendo prevención de enfermedades, modulación del crecimiento celular y propiedades antioxidantes. Se sabe que estos compuestos tienen efectos antitumorales y pueden causar cambios significativos en la regulación de la respuesta inmune, crecimiento celular y diferenciación. La Tabla 3 reúne algunas de las aplicaciones terapéuticas de las cumarinas, especialmente como fuentes potenciales de drogas anticáncer [17-22].

Clasificación	Características	Ejemplos	Aplicaciones terapéuticas
<b>Cumarinas simples</b>	Sustituyentes hidroxilo, alcoxi o alquilo en el anillo bencénico.	 <p>7-hidroxicumarina</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Edema</li> <li>• Infecciones crónicas (ej. brucelosis crónica)</li> <li>• Cáncer (melanoma maligno, riñón, próstata, leucemia) y efectos secundarios causados por radioterapia</li> </ul>
<b>Furanocumarinas</b>	Anillo furano de cinco miembros unido al anillo de benceno. Lineales o angulares.	 <p>Psoraleno</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fotoquimioterapia (psoralenos) para desórdenes en la piel (psoriasis, vitiligo, micosis)</li> <li>• Cáncer de cuello de útero</li> </ul>
<b>Piranocumarinas</b>	Anillo pirano de seis miembros unido al anillo de benceno. Lineales o angulares.	 <p>Seselina</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reversión del mecanismo molecular de resistencia multidroga de células cancerosas</li> </ul>
<b>Cumarinas sustituidas en el anillo pirona</b>	Sustituyentes en las posiciones 3-C y 4-C, generalmente, del anillo pirona.	 <p>Warfarina</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anticoagulantes</li> <li>• Cáncer de pulmón</li> <li>• Inhibición de metástasis</li> <li>• Cáncer de mama</li> </ul>

**Tabla 3.** Clasificación de las cumarinas en sus cuatro grupos principales

En el presente trabajo de tesis doctoral se han seleccionado cuatro cumarinas para su estudio: warfarina, cumarina, dicumarol y umbeliferona (Figura 5).



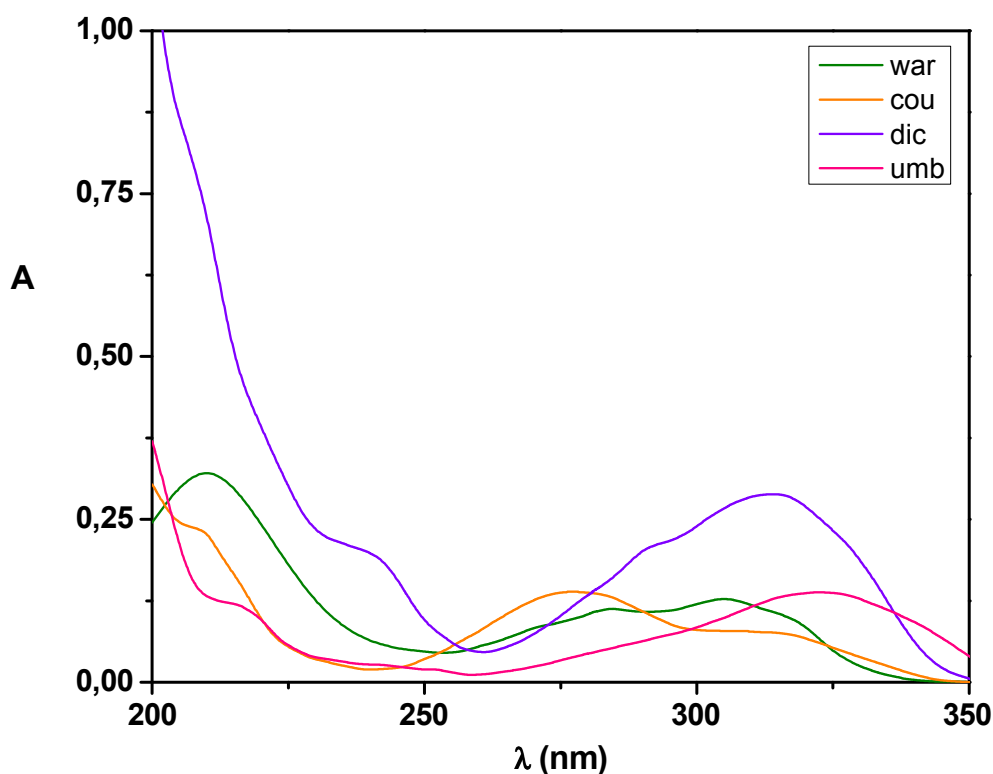
**Figura 5.** Estructura molecular de las cumarinas en estudio

La **warfarina**, (RS)-4-hidroxi-3-(3-oxo-1-fenilbutil)-2H-cromen-2-ona, es una 4-hidroxicumarina utilizada como anticoagulante y, debido a la muerte por desangrado causada por una disminución en los factores anticoagulantes, es también utilizada como rodenticida. La **cumarina**, 2H-cromen-2-ona, se emplea como aromatizante y aditivo en la industria alimenticia y en perfumería, como molécula precursora en la industria farmacéutica y se encuentra naturalmente en varios alimentos. El **dicumarol**, 3,3'-metilenbis (4-hidroxi-2H-cromen-2-ona), posteriormente reemplazado por la warfarina, es un anticoagulante de origen natural derivado de la cumarina por el efecto de especies del reino fungi. La **umbeliferona**, 7-hidroxicromen-2-ona, es una 7-hidroxicumarina con propiedades antioxidantes y es utilizada en protectores solares.

Se han reportado en la literatura varias metodologías analíticas para la determinación de cumarinas, mayormente cromatográficas [23-56] y en menor medida electroquímicas [57-61], de electroforesis capilar [62-64], espectrofotométricas [65] y fotoluminiscentes [33, 52, 66-76]. Generalmente, estas metodologías analíticas consumen bastante tiempo, requieren equipamiento sofisticado y, consecuentemente, no son aplicables en forma rutinaria en un laboratorio de control de calidad. Teniendo en cuenta que la tendencia general es hacia metodologías analíticas que aseguren bajos límites de detección, existe una necesidad creciente hacia el desarrollo de métodos rápidos, simples, sensibles y selectivos para la determinación cuantitativa de cumarinas en muestras de origen

farmacéutico y toxicológico. El presente trabajo de tesis doctoral persigue dicha meta: desarrollar sensores fotoluminiscentes que nos garanticen buenas cifras de mérito y sean aplicables en tareas de rutina.

La Figura 6 muestra los espectros de absorción de disoluciones acuosas  $1,00 \times 10^{-5}$  M de las cumarinas en estudio.



**Figura 6.** Espectros de absorción de disoluciones acuosas de warfarina (war) -20 % v/v metanol-, cumarina (cou), dicumarol (dic) y umbeliferona (umb). [cumarinas] =  $1,00 \times 10^{-5}$  M

Los estudios preliminares del presente trabajo de tesis doctoral se basaron en la obtención de una señal fosforescente directa por parte de las cumarinas en presencia de:

- (i) átomo pesado (KI) + agente desoxigenante ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ): NP-RTP (HAI-RTP)
- (ii) tensoactivo aniónico (SDS: dodecilsulfato de sodio) + átomo pesado ( $\text{TlNO}_3$ ) + agente desoxigenante ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ): MS-RTP
- (iii)  $\beta$ -ciclodextrina + átomo pesado (KI, KBr, 1-bromobutano) + agente desoxigenante ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ): d-CD-RTP



Dado que no se encontraron señales fosforescentes por parte de las cumarinas bajo las condiciones estudiadas, se propuso continuar con la posibilidad de hallar un sistema RTPL que sea sensible a la presencia de cumarinas (detección indirecta). Los capítulos siguientes desarrollan dicha temática.

*Fosforescencia a temperatura ambiente  
en estado líquido en medios protegidos*

## 1. Introducción

La utilización de los denominados *medios organizados* se ha convertido en una valiosa herramienta analítica, particularmente en el desarrollo de la RTPL, siendo potencialmente atractiva como método de detección en metodologías dinámicas. Dentro de los mismos, podemos considerar los sistemas micelares y los basados en la formación de complejos de inclusión con, principalmente, ciclodextrinas. En este último caso, existe una relación “anfitrión-invitado” (host-guest) entre la ciclodextrina (CD) y el compuesto en estudio. Bajo condiciones específicas, las disoluciones acuosas de CD producen un aumento en la señal de fotoluminiscencia de los luminóforos.

### 1.1. Estructura y propiedades de las ciclodextrinas

Las ciclodextrinas (CDs), también denominadas dextrinas Schardinger, cicloamilosas o cicloglucanos, son una serie de oligosacáridos cíclicos, no reductores, producidos por la acción de la amilasa del *Bacillus macerans* sobre el almidón y compuestos relacionados. A pesar que las CDs fueron descubiertas por Villiers en 1891, la primera descripción detallada de su preparación y aislamiento fue realizada por Schardinger en 1904, de ahí uno de sus nombres [77].

Las CDs están constituidas por uniones  $\alpha$  [1 $\rightarrow$ 4] de unidades de D(+)-glucopiranosas. A fin de denotar el número de unidades de glucosa que las conforman, se les asigna una letra griega:  $\alpha$  para seis,  $\beta$  para siete,  $\gamma$  para ocho, y así sucesivamente.

El tratamiento del almidón con amilasa del *Bacillus macerans* (ciclodextrinasa) da como resultado un producto que contiene  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  CDs junto con pequeñas cantidades de CDs mayores. Una forma sencilla de separar las  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  CDs, las tres CDs analíticamente más útiles, es por precipitación selectiva con compuestos orgánicos apropiados o mediante cromatografía de adsorción [77].

La Figura 7 muestra, de forma esquemática, las dimensiones de las tres CDs más utilizadas. La Tabla 4 resume algunas de sus características más importantes [78].

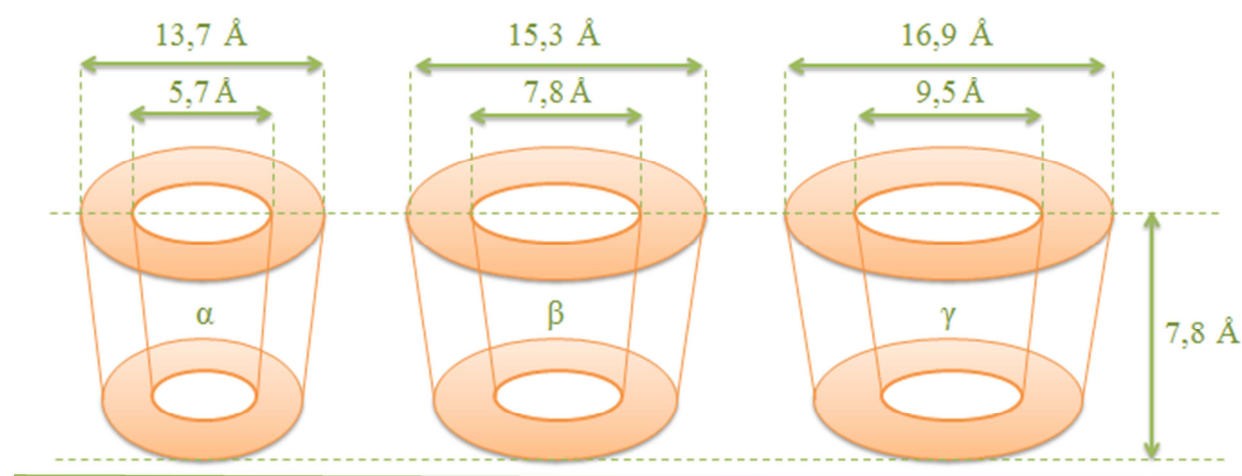
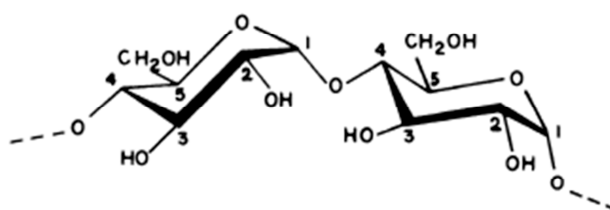


Figura 7. Dimensiones de las  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  CDs

	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$
<b>Número de unidades de glucosa</b>	6	7	8
<b>Peso molecular</b>	972	1135	1297
<b>Solubilidad en agua (g/100 mL a T amb)</b>	14,5	1,85	23,2
<b>Diámetro de la cavidad (Å)</b>	5,7	7,8	9,5
<b>Volumen de la cavidad (Å<sup>3</sup>)</b>	174	262	472
<b>pK (25 °C)</b>	12,33	12,20	12,08

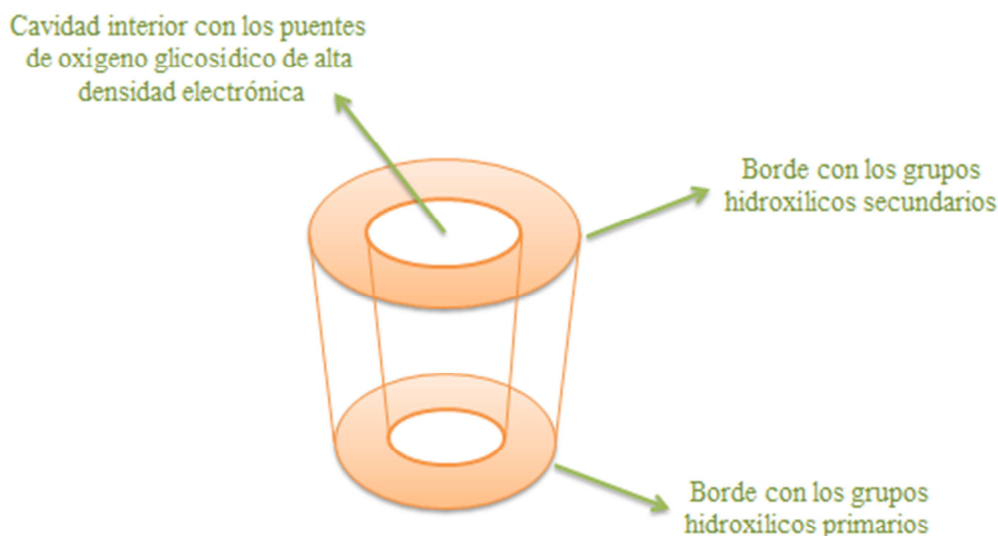
**Tabla 4.** Propiedades físicas de las CDs

Las CDs tienen forma toroidal debido a la conformación C1 (silla) de las unidades de glucosa (Figura 8). Estas estructuras requieren arreglos espaciales de los grupos funcionales, resultando en una variedad de características interesantes de las CDs. Los grupos hidroxílicos secundarios (en los átomos de carbono C-2 y C-3 de las unidades de glucosa) se localizan en uno de los lados del toroide, mientras que los grupos hidroxílicos primarios en el lado opuesto. El interior del toroide consiste solamente en un anillo de grupos C-H, un anillo de oxígenos glicosídicos y otro anillo de grupos C-H. Por tanto, el interior del toroide de las CDs es relativamente apolar comparado con el agua. Así, tenemos dos regiones de diferente polaridad, una exterior hidrofílica y una interior hidrofóbica, que permiten la interacción con diversos analitos. Las cavidades de las CDs poseen forma de “V”, leve, con el lado de los hidroxilos secundarios más abierto que el lado de los hidroxilos primarios. Los grupos hidroxílicos primarios pueden rotar y, por tanto, bloquear parcialmente la cavidad, contrario a los secundarios que se encuentran en cadenas relativamente rígidas [77]. La Figura 9 muestra un esquema funcional de las CDs.



**Figura 8.** Diagrama esquemático de las unidades de glucopiranososa en una CD

Se ilustra la unión glicosídica  $\alpha$  [1→4] y la numeración de los átomos de carbono empleada para describir los anillos



**Figura 9.** Esquema funcional de la CD

### 1.2. Formación de complejos de inclusión

Una de las características más importantes de las CDs es la formación de complejos de inclusión con varios compuestos (invitados) que son incluidos en el interior hidrofóbico de la CD (anfitrión). En disolución acuosa, varias moléculas de agua pueden residir en la cavidad de la CD (seis en la  $\alpha$ , once en la  $\beta$  y diecisiete en la  $\gamma$ ). Los puentes de hidrógeno formados entre el agua incluida y los puentes de oxígeno glicosídico, distorsionan los puentes de hidrógeno intramoleculares normales de la CD, aumentando la tensión (deformación) del anillo y, por tanto, la energía del sistema. La sustitución de las moléculas de agua altamente energéticas por un compuesto hidrofóbico (analito) está favorecida al disminuir la tensión del anillo por restitución de la configuración normal de puentes de hidrógeno intramoleculares. Aun cuando el proceso de inclusión involucre interacciones débiles, la disminución de la energía del sistema hace que siga siendo favorable y se encuentren valores de constantes de estabilidad entre 100 y 5000  $M^{-1}$  para una variedad de moléculas orgánicas. El grado de complejación en la CD y la molécula que se incluye depende de la compatibilidad del tamaño de la cavidad de la CD y el tamaño y la forma del compuesto incluido, mientras que la orientación de la molécula incluida dentro de la CD está relacionada con su hidrofobicidad y geometría, pudiendo no incluirse por completo o con diferente estequiometría [79].

Desde el punto de vista analítico, una de las propiedades más interesantes de las CDs es la intensificación de las señales fotoluminiscentes de diferentes luminóforos, lo cual las hace particularmente útiles en el desarrollo y optimización de métodos de determinación mediante fotoluminiscencia molecular. En comparación con otros medios organizados, como las micelas, las CDs presentan varias propiedades deseables desde el punto de vista analítico [79]:

- (i) no es necesaria una concentración crítica para incluir moléculas en su interior,
- (ii) son estables en un amplio intervalo de pH,
- (iii) son fotorresistentes,
- (iv) presentan muy poca o ninguna absorción en la región UV,
- (v) no son tóxicas,
- (vi) no producen espuma cuando se desoxigena mediante el paso de un gas.

La intensificación de los procesos fotoluminiscentes se debe a que las moléculas que se introducen en la cavidad interna de las CDs se aíslan del ambiente que las rodea y sus estados excitados se encuentran más protegidos de los procesos de atenuación (quenching) y de decaimiento no radiativo que ocurren en disolución. La inclusión causa restricción en la movilidad molecular y/o alteraciones en la polaridad local [79].

### 1.3. Fosforescencia a temperatura ambiente inducida por ciclodextrinas

Tal como se mencionó en el capítulo anterior, la observación de RTPL en presencia de CDs necesita cumplir dos condiciones principales:

- (i) la presencia de un átomo pesado, externo o interno al fosforóforo, a fin de aumentar la constante de velocidad del cruce entre sistemas ( $k_t$ ),
- (ii) la reducción de los procesos de quenching del estado triplete debido a la presencia de oxígeno disuelto (desoxigenación eficiente).

Podemos distinguir dos metodologías CD-RTP:

- (i) con desoxigenación (d-CD-RTP), donde el sistema estaría compuesto por CD + fosforóforo (con o sin átomo pesado) + sal con átomo pesado (favorecedor cruce entre sistema) + sulfito de sodio (agente desoxigenante),
- (ii) sin desoxigenar (nd-CD-RTP), donde el sistema, un complejo de inclusión ternario (o cuaternario), estaría compuesto por CD + fosforóforo (con o sin átomo pesado) + compuesto(s) orgánico(s) (con o sin átomo pesado).

El presente capítulo se enfoca específicamente en la metodología nd-CD-RTP, evaluando los efectos del tercer y cuarto componente en la señal de RTPL.

#### 1.3.1. RTP inducida por ciclodextrinas en presencia de oxígeno disuelto (nd-CD-RTP)

La RTP en medios sin desoxigenar (nd-CD-RTP) ha sido desarrollada a fin de superar los inconvenientes que presentaban las medidas de RTPL considerando, especialmente, la necesidad de remover el oxígeno disuelto. En muchos casos, los reactivos utilizados para lograr RTPL poseen bajo punto de ebullición por lo que la desoxigenación por burbujeo de nitrógeno gaseoso puede provocar su evaporación aumentando la incertidumbre analítica. Comparada con la CD-RTP convencional (d-CD-RTP), la nd-CD-RTP posee ciertas ventajas:

(i) es más conveniente y comparable con las medidas de fluorescencia en lo que respecta a la preparación de las disoluciones,

(ii) puede aplicarse en sistemas donde los procesos de desoxigenación afectan la detección, como ser sensores de pH y temperatura en agua o algunas muestras biológicas,

(iii) el uso de un tercer o cuarto componente introduce un factor adicional de selectividad o reconocimiento a fines analíticos.

#### 1.3.1.1. Mecanismos de interacción

La nd-CD-RTP puede obtenerse principalmente por la interacción del complejo de inclusión ciclodextrina/fosforóforo (CD/P-IC) con un tercer componente o con un tercer y cuarto componente. Se define al tercer y cuarto componente como una sustancia que puede interactuar con el CD/P-IC y afectar marcadamente las propiedades fotofísicas, termodinámicas y cinéticas del complejo. Los posibles mecanismos de interacción del tercer o cuarto componente con el CD/P-IC, tal como lo establece Peng y colaboradores [80] en su trabajo de revisión, se describen a continuación.

##### 1.3.1.1.1. Agentes reguladores del espacio

La inhibición del decaimiento no radiativo del estado triplete del fosforóforo puede explicarse teniendo en cuenta dos factores:

(i) el tercer, o el tercer y cuarto, componente junto con el fosforóforo entran espontáneamente a la cavidad de la CD restringiendo espacialmente la movilidad del fosforóforo en la cavidad;

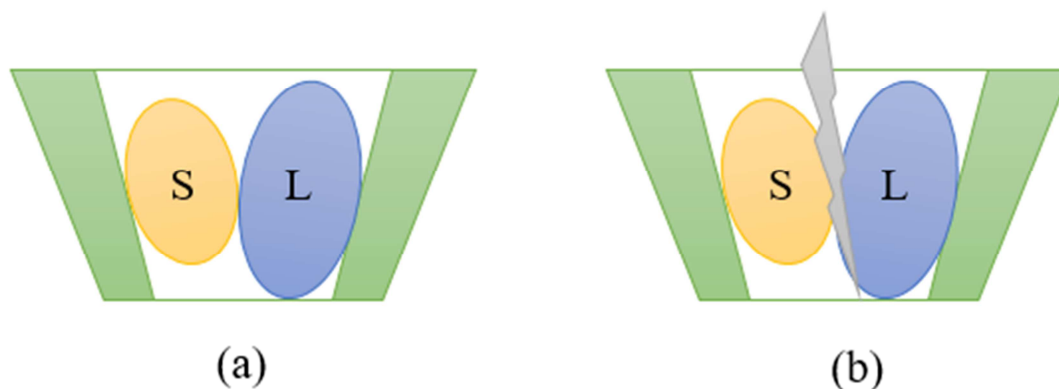
(ii) no hay espacio suficiente para alojar a la molécula de oxígeno, lo cual restringe el contacto del fosforóforo en estado triplete excitado con la molécula de oxígeno en estado triplete fundamental.

El volumen y el grado en que se introduce el tercer y/o el cuarto componente en el espacio vacío de la cavidad influyen de manera significativa en la RTP. Los equilibrios de los complejos de inclusión pueden representarse de la siguiente forma:



donde L es el fosforóforo, T el tercer componente, F el cuarto componente.

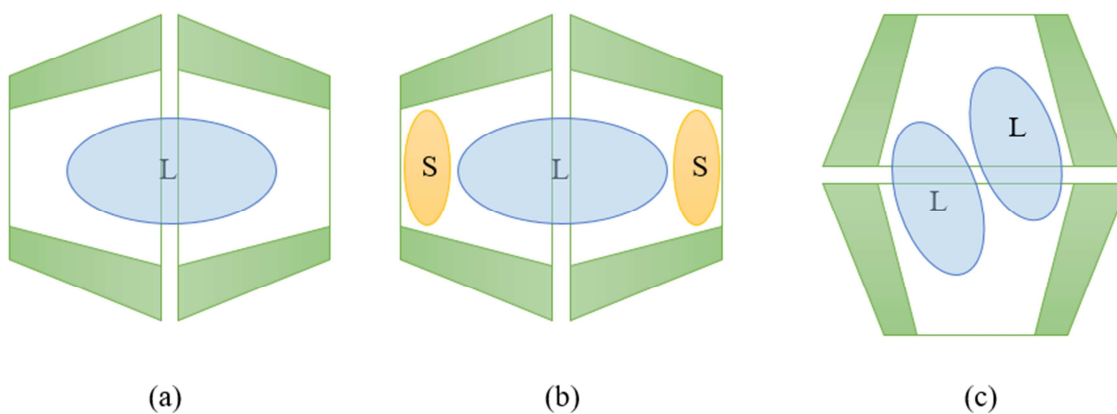
El modelo de regulación espacial puede esquematizarse según:



**Figura 10.** Complejos de inclusión ternario (a) y cuaternario (b). S: regulador espacial, L: fosforóforo

### 1.3.1.1.2. Complejos núcleo-cáscara

El fosforóforo, o el fosforóforo con el tercer e incluso el cuarto componente, es longitudinalmente encapsulado entre dos moléculas de CD enfrentadas por sus bordes hidroxílicos secundarios (los más amplios). El modelo puede esquematizarse según la Figura 11.



**Figura 11.** Complejos núcleo-cáscara: (a)  $\alpha$ -CD<sub>2</sub>/L; (b)  $\beta$ -CD<sub>2</sub>/L/S<sub>2</sub>; (c)  $\beta$ -CD<sub>2</sub>/L<sub>2</sub>. S: regulador espacial o tercer componente; L: fosforóforo

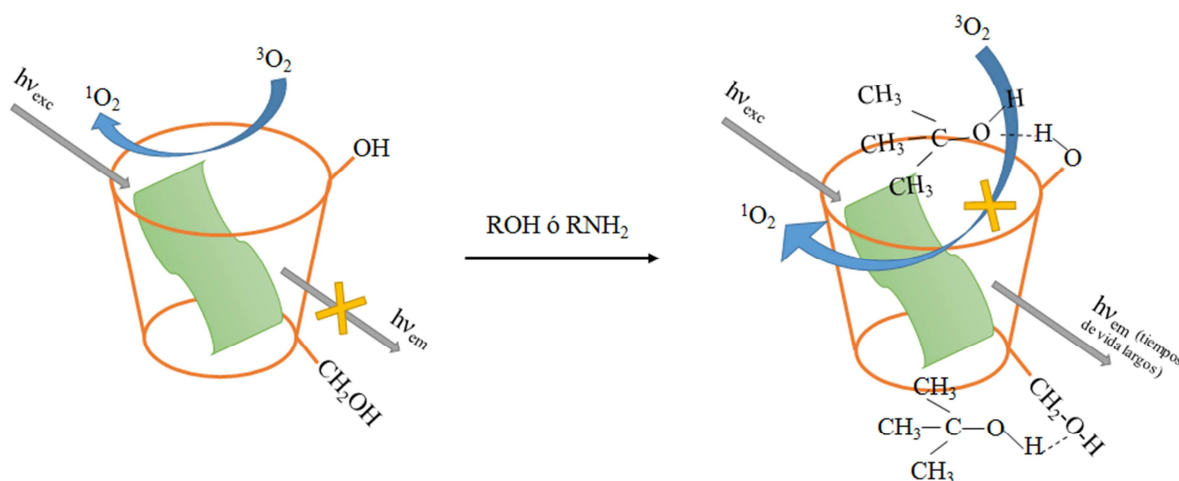
### 1.3.1.1.3. Efecto de protección

Existe la probabilidad de que se formen enlaces de puente de hidrógeno entre el tercer o cuarto componente, tales como alcoholes o aminas, y los hidroxilos del borde primario y secundario de la CD. Parte de la cadena del tercer o cuarto componente puede cubrir la entrada a la cavidad de la CD al



formarse enlaces de puente de hidrógeno (Figura 12) previniendo el quenching de, principalmente, el oxígeno molecular.

La formación de microcristales en la escala nano/micro puede ocurrir en presencia de una excesiva cantidad de tercer o cuarto componente, especialmente alcanos con o sin átomo pesado, debido a la disminución en la solubilidad de la CD. Los microcristales suspendidos en solución, formados por CD y sus varios complejos de inclusión, le otorgan rigidez al microentorno en el cual el fosforóforo se sitúa e incluso inducen o aumentan la RTP aun en presencia de oxígeno disuelto.



**Figura 12.** Efecto de protección por un alcohol

### 1.3.1.2. Aspectos del tercer y cuarto componente en nd-CD-RTP

Los tercer y cuartos componentes más utilizados en nd-CD-RTP son alcanos, alcoholes y sus haluros, aminas y surfactantes. Pueden cumplir una o más de las siguientes funciones:

- (i) perturbador de la emisión fotoluminiscente por la presencia de un átomo pesado externo,
- (ii) regulador espacial,
- (iii) agentes protectores en los bordes de la CD,
- (iv) inductores en la formación de microcristales.

#### 1.3.1.2.1. Haluros de alcanos y alcoholes

Los haluros de alcanos son los más utilizados para inducir la nd-CD-RTP: actúan no sólo como perturbadores por átomo pesado (incremento del cruce entre sistemas y rendimiento cuántico) sino también como reguladores espaciales al ingresar en la cavidad de la CD. La formación de microcristales observada en estos casos se cree necesaria para la obtención de RTP [81].

Entre los haluros de alcanos, el 1-bromociclohexano tiene la peculiaridad de que su estructura y conformación es similar a las unidades de glucopiranosas en la molécula de CD por lo que puede introducirse adecuadamente en la cavidad de la CD y desplazar al oxígeno y a moléculas de agua energéticas de la misma. Consecuentemente, el complejo de inclusión se vuelve compacto evitando que las moléculas de oxígeno ingresen a la cavidad de la CD y quenchen la RTP del fosforóforo [82, 83].

Los haluros de alcoholes también pueden actuar como tercer componente y sus disoluciones son transparentes [84-86].

#### 1.3.1.2.2. Alcanos sin átomo pesado

En el caso de fosforóforos que poseen átomo pesado, el tercer componente sin átomo pesado también ayuda a inducir la nd-CD-RTP. El ciclohexano es uno de los alcanos más utilizados y cumple la misma función que su haluro, mencionado anteriormente, salvo por la presencia del átomo pesado [87-89]. El volumen del compuesto utilizado y la capacidad de cubrir o proteger más eficientemente la entrada a la cavidad de la CD son dos factores importantes a tener en cuenta para la obtención de RTP [90, 91].

#### 1.3.1.2.3. Alcoholes

El volumen y la conformación espacial de los alcoholes son factores muy importantes en la formación de complejos ternarios estables. El incremento en la RTP inducida por los alcoholes puede relacionarse con la efectividad del mismo en alejar al fosforóforo en estado excitado del oxígeno. Las constantes de velocidad para el quenching por oxígeno generalmente disminuyen a medida que la voluminosidad del alcohol aumenta [92-97].

#### 1.3.1.2.4. Aminas

El efecto de las aminas en nd-CD-RTP es similar al de los alcoholes, con la diferencia que el átomo de nitrógeno en las aminas, especialmente las aromáticas, puede quenchar la RTP [98].

#### 1.3.1.2.5. Surfactantes

Los surfactantes son compuestos anfifílicos; su parte hidrofóbica tiende a ingresar en la cavidad de la CD modificando el microentorno de la CD, favoreciendo la RTP al otorgarle mayor rigidez [99-103].

#### 1.3.1.3. CD-RTP sustituida con halógenos

En CD-RTP, los compuestos que poseen átomos pesados actúan como perturbadores del sistema aumentando la velocidad del cruce entre sistemas y, a su vez, la población del estado triplete. Hay dos maneras de introducir un átomo pesado en CD-RTP:

(i) que el átomo pesado pertenezca al tercer o cuarto componente del sistema, tal como se mencionó previamente,

(ii) que la CD sea halogenada y, por lo tanto, actuaría como anfitriona y perturbador por átomo pesado hacia invitados no halogenados.

No se puede establecer como regla general que el uso de una CD halogenada garantiza un aumento en la RTP, especialmente en fosforóforos también halogenados, puesto que se ha encontrado lo contrario en algunos casos [104-106].

Dentro de las metodologías de nd-CD-RTP mencionadas, el presente trabajo de tesis doctoral evalúa el formado por  $\beta$ -ciclodextrina, fosforóforo y alcanos con y sin átomo pesado en presencia de alcohol.

## 2. Metodología

### 2.1. Reactivos y disoluciones

Todos los reactivos utilizados son de grado analítico y se emplearon tal como se recibieron.

Las disoluciones acuosas (agua bidestilada) de  $\beta$ -ciclodextrina (Cyclolab), cumarina (donación de una farmacia local) y umbeliferona (Sigma-Aldrich), y las disoluciones metanólicas (metanol OmniSolv, Merck) de 1-bromonaftaleno (Sigma-Aldrich), ciclohexano (Merck, grado espectroscópico), bromociclohexano (Sigma-Aldrich), 1,2-dibromoetano (Eastman Organic Chemicals), 1,1,2,2-tetrabromoetano (Eastman Organic Chemicals), 1-bromobutano (Shandong Docuris Chemical Co., Ltd.) y warfarina (Sigma-Aldrich) fueron preparadas diariamente. La disolución estándar de dicumarol (donación de una farmacia local) en NaOH (Carlo Erba) 0,1 M fue preparada diariamente. Partiendo de estas disoluciones, las disoluciones de trabajo fueron preparadas en agua:metanol (80:20 v/v).

#### 2.1.1. Determinación de warfarina

La determinación de warfarina se realizó en un anticoagulante comercial, Circuvit 2 mg (Laboratorio Ariston S.A.). Los comprimidos fueron pre-tratados siguiendo el procedimiento brindado por el Laboratorio Ariston S.A. Dicho método de preparación de muestra es análogo al reportado en la Farmacopea de los Estados Unidos (USP36-NF31) [107]. Se pulverizaron veinticinco comprimidos en un mortero de ágata; se pesaron 2000 mg del polvo resultante en un matraz de 50,00 mL y se adicionaron 30,0 mL del solvente de dilución -buffer pH 7,4:acetonitrilo (OmniSolv, Merck), 85:15 v/v-. La disolución fue agitada magnéticamente durante 60 minutos y se llevó a volumen con el solvente de dilución. La disolución resultante fue filtrada a través de papel de filtro (Whatman #41). La disolución madre utilizada para las medidas fue preparada mediante una dilución 1:5 v/v en agua.

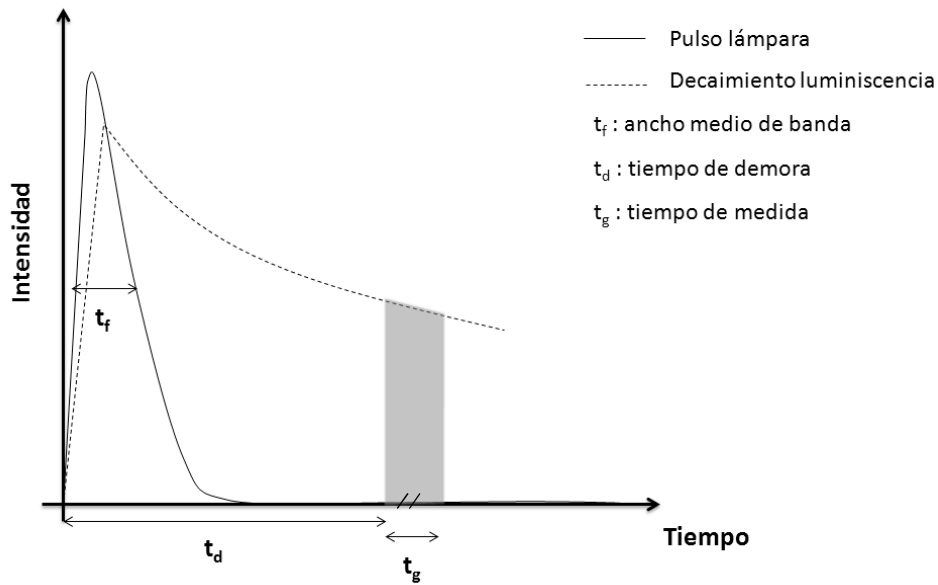
La disolución reguladora de pH 7,4 fue preparada disolviendo 0,683 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Riedel-de Haën Ag. Seelze-Hannover) en 25,0 mL de agua bidestilada y 39,1 mL de NaOH (Carlo Erba) 0,1 M. Se llevó a volumen (100,0 mL) con agua bidestilada previo ajuste de pH.

### 2.2. Instrumentación analítica

Todos los espectros de fosforescencia a temperatura ambiente fueron registrados con un espectrofluorómetro Perkin-Elmer LS-50B (Beaconsfield, Inglaterra) provisto de una lámpara pulsada de xenón como fuente de excitación (ancho de pulso  $<10 \mu\text{s}$ , 60 Hz) y un fotomultiplicador R928. El instrumento se encuentra conectado a una PC para el almacenamiento y tratamiento de datos a través del software FL Winlab. Las medidas de RTP a  $90^\circ$  fueron llevadas a cabo utilizando celdas de cuarzo convencionales de 1,0 cm de camino óptico mientras que las de iluminación frontal fueron realizadas utilizando el accesorio correspondiente y celdas cilíndricas de cuarzo de 1,0 cm de camino óptico. Se utilizaron tiempos de demora ( $t_d$ ) y de medida ( $t_g$ ) de 0,10 ms y 5,00 ms, respectivamente (la Figura 13

muestra esquemáticamente los tiempos considerados), longitudes de onda de excitación y emisión de 281 nm y 518 nm, respectivamente, y anchos de banda de excitación de 5 nm y de emisión de 2,5 nm.

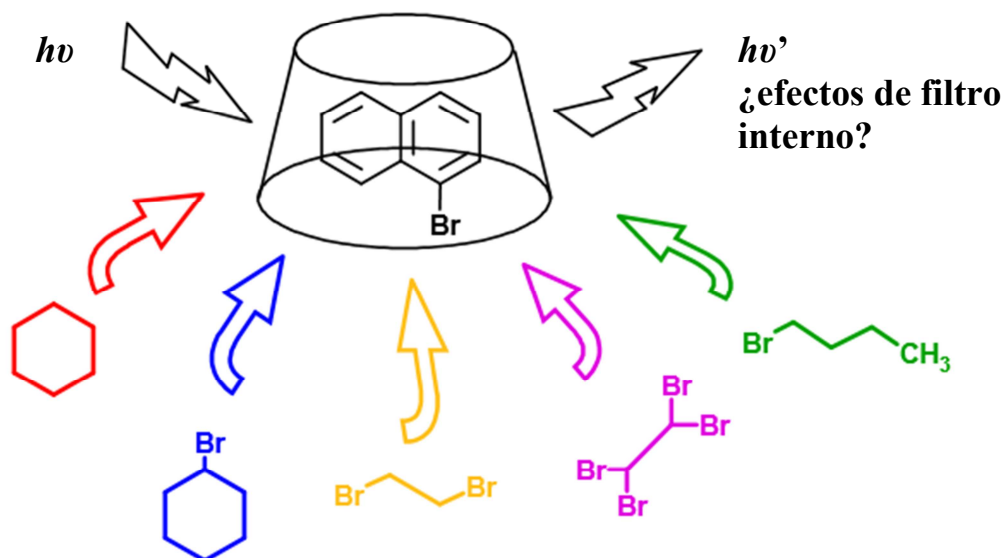
Los espectros de absorción fueron medidos en un espectrofotómetro Shimadzu UV-240 (Japón) equipado con celdas de cuarzo de 1,0 cm de camino óptico.



**Figura 13.** Consideraciones experimentales en medidas de fosforescencia

### 3. Resultados y discusión

#### 3.1. Estudio de la fosforescencia a temperatura ambiente del complejo de inclusión 1-bromonaftaleno/ $\beta$ -ciclodextrina



**Figura 14.** Resumen gráfico: Estudio de la fosforescencia a temperatura ambiente del complejo de inclusión 1-bromonaftaleno/ $\beta$ -ciclodextrina

La metodología CD-RTP es utilizada ampliamente en varios campos de la investigación. El 1-bromonaftaleno (1-BrN) forma un complejo de inclusión con la  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) el cual exhibe una baja RTPL (Figura 15). Este fenómeno fue reportado inicialmente por Turro y colaboradores para derivados bromo-sustituidos de naftaleno [108-110]. La inclusión de un tercer componente aumenta la RTP sin la necesidad de desoxigenar (nd-CD-RTP), habiéndose reportado el uso de diferentes moléculas [88, 89, 91, 97, 100, 102, 111-117].

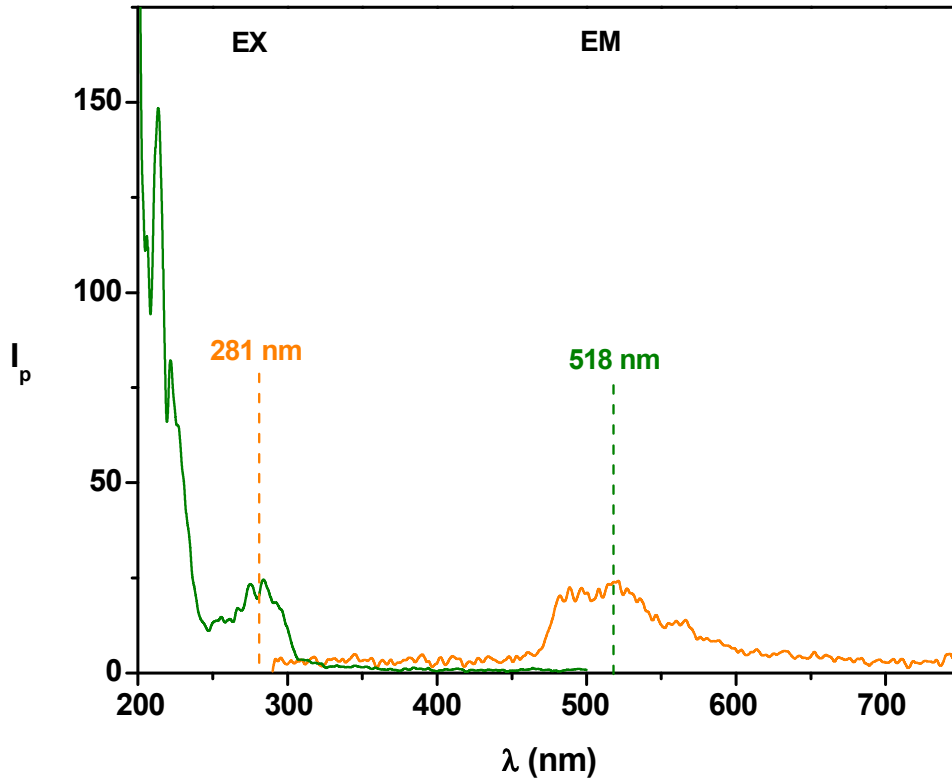


Figura 15. Espectros de excitación y emisión RTPL del complejo de inclusión 1-BrN/ $\beta$ -CD  
[ $\beta$ -CD] =  $5,00 \times 10^{-3}$  M; [1-BrN] =  $1,00 \times 10^{-5}$  M

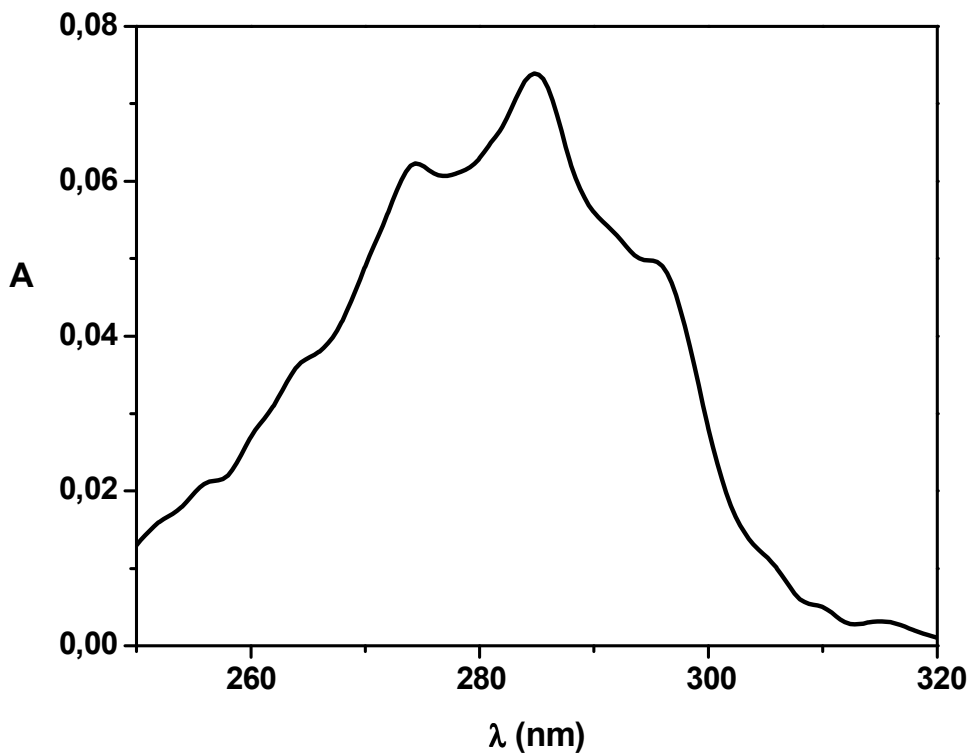
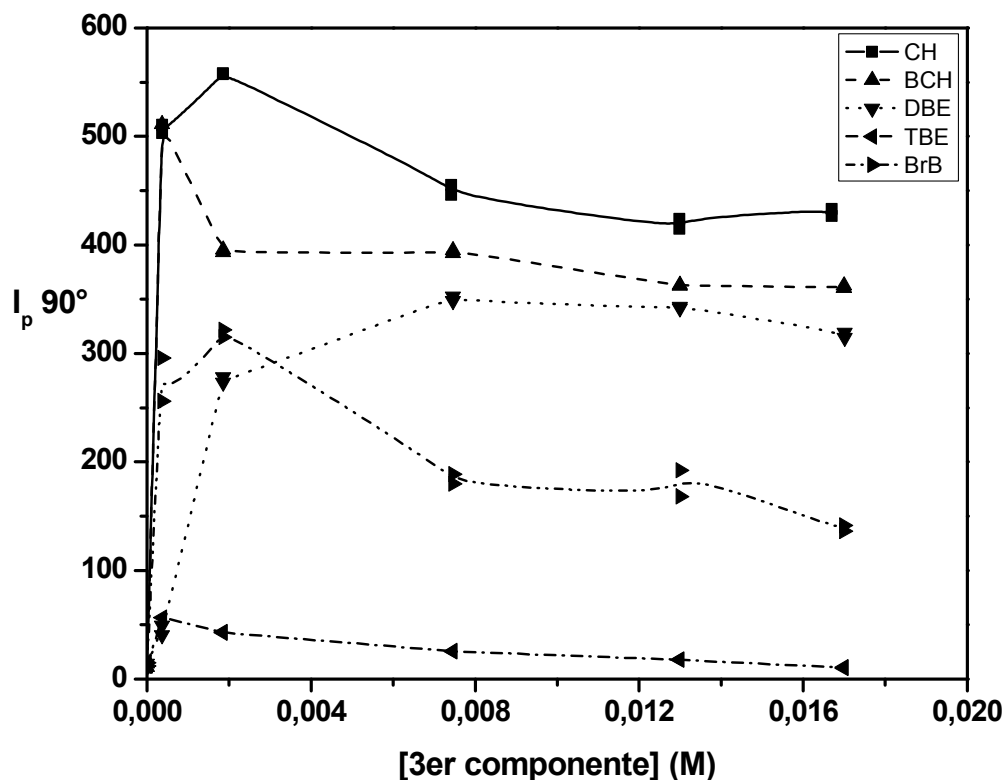


Figura 16. Espectro de absorción de 1-BrN en 20 % v/v metanol. [1-BrN] =  $1,00 \times 10^{-5}$  M

Las disoluciones acuo-metanólicas (80:20 v/v) de 1-BrN, en una concentración de  $1,00 \times 10^{-5}$  M, poseen una absorbancia considerable a la longitud de onda de excitación de 281 nm ( $\epsilon = 6466 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ). El alto valor de absorbancia ( $A = 0,065$ ) hace que sea necesario corregir por efectos de filtro interno (EFI). La Figura 16 muestra el espectro de absorción del 1-BrN en dichas condiciones.

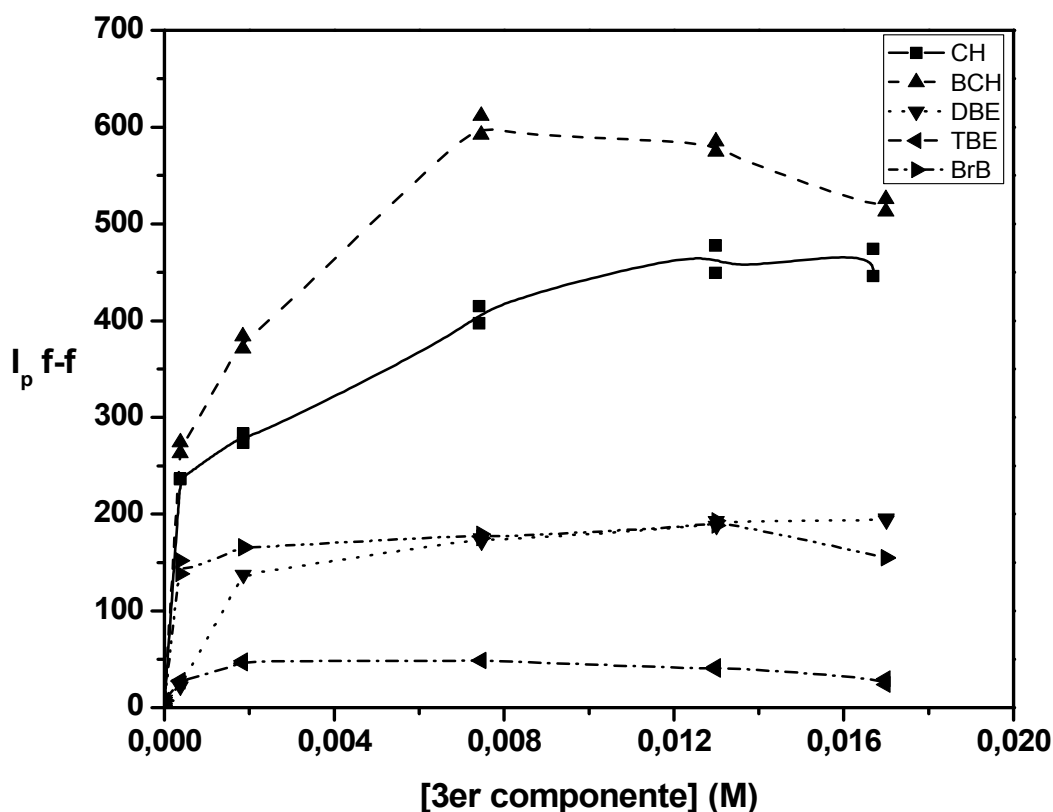
La influencia de los EFI no ha sido tomada en cuenta en los trabajos citados cuando se estudia el complejo de inclusión 1-BrN/ $\beta$ -CD con terceros componentes [88, 89, 91, 97, 100, 102, 111-117]. En este trabajo de tesis doctoral, se ha evaluado el EFI, utilizando geometría de iluminación a  $90^\circ$  (GI90) y geometría de iluminación frontal (GIF), estudiando el complejo de inclusión 1-BrN/ $\beta$ -CD con distintos terceros componentes (alcanos y bromoalcanos) y se han optimizado las concentraciones de  $\beta$ -CD y metanol (solvente de dilución de 1-BrN, alcanos y bromoalcanos).

Las Figuras 17 y 18 muestran el efecto del tercer componente en la RTP de 1-BrN/ $\beta$ -CD en presencia de 20 % v/v de metanol. La concentración de 1-BrN elegida fue la utilizada en los trabajos citados [88, 89, 91, 97, 100, 102, 111-117]. Las curvas en la Figura 17 corresponden a GI90 mientras que las de la Figura 18 a GIF. Ciclohexano (CH), bromociclohexano (BCH), 1,2-dibromoetano (DBE), 1,1,2,2-tetrabromoetano (TBE) y 1-bromobutano (BrB) fueron utilizados como tercer componente. En todos los casos, se observó que el sistema requería estabilizarse a fin de obtener señales reproducibles. De esta manera, todos los estudios realizados con el complejo de inclusión 1-BrN/ $\beta$ -CD/tercer componente se llevaron a cabo realizando las medidas de RTP considerando una hora como el tiempo de estabilización del sistema luego de la agitación del mismo.



**Figura 17.** RTP del complejo de inclusión 1-BrN/ $\beta$ -CD/tercer componente a concentraciones variables del tercer componente utilizando GI90. [ $\beta$ -CD] =  $5,00 \times 10^{-3}$  M; [1-BrN] =  $1,00 \times 10^{-5}$  M; 20 % v/v metanol

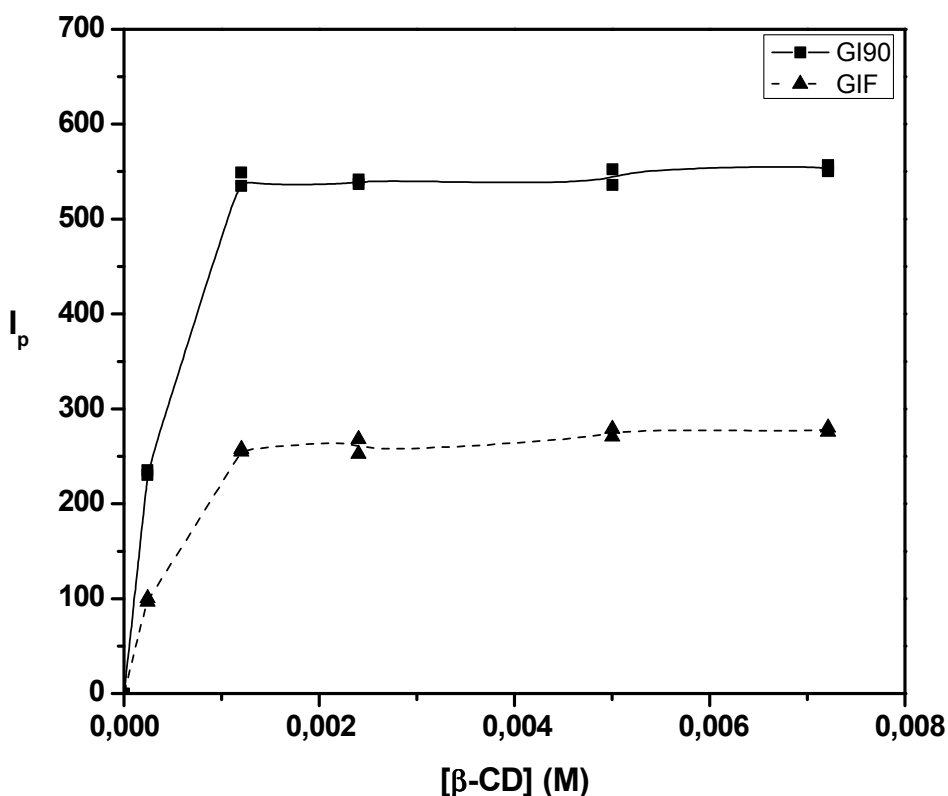




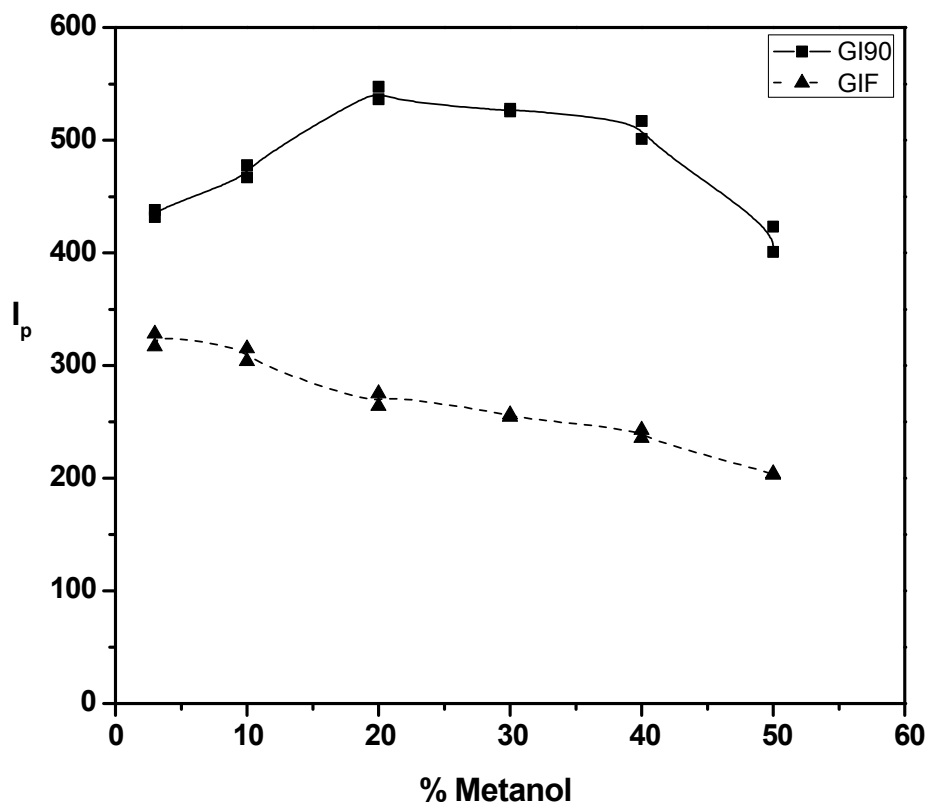
**Figura 18.** RTP del complejo de inclusión 1-BrN/ $\beta$ -CD/tercer componente a concentraciones variables del tercer componente utilizando GIF. [ $\beta$ -CD] =  $5,00 \times 10^{-3}$  M; [1-BrN] =  $1,00 \times 10^{-5}$  M; 20 % v/v metanol

Como puede observarse, el comportamiento del tercer componente es distinto cuando la RTP es medida utilizando GI90 o GIF. La presencia de microcristales suspendidos en solución pudo apreciarse en los cinco terceros componentes debido a la disminución en la solubilidad de la  $\beta$ -CD. Los microcristales consisten en  $\beta$ -CD y sus complejos de inclusión, los cuales favorecen la presencia de un microentorno más rígido y por tanto una mayor RTP [80]. CH y BCH causan el mayor aumento de la RTP. Así, la inclusión de CH o BCH en el sistema 1-BrN/ $\beta$ -CD da lugar a un complejo más protegido, comparado con el formado con los demás componentes estudiados, que favorece la RTP. Aun bajas concentraciones de BCH dan lugar a una cantidad considerable de precipitado lo cual introduce una gran variabilidad en la medida. Lo mismo ocurre con concentraciones de CH mayores a  $1,85 \times 10^{-3}$  M.

Las Figuras 19 y 20 muestran el efecto de  $\beta$ -CD y metanol en la RTP, respectivamente. Como puede observarse, el comportamiento del metanol es distinto cuando la RTP se mide utilizando GI90 o GIF mientras que para la  $\beta$ -CD el comportamiento es análogo. Bajas concentraciones de metanol producen una mayor cantidad de precipitado y, por tanto, existe una relación de compromiso entre reproducibilidad y valores de intensidad obtenidos, como en el caso de CH y BCH.

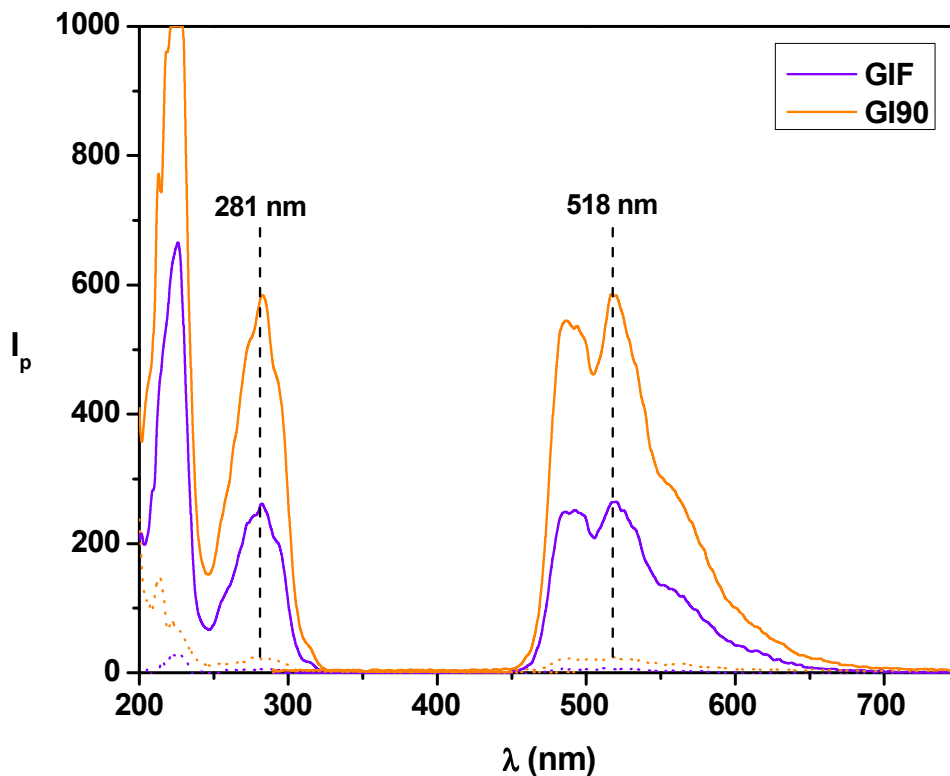


**Figura 19.** RTP del complejo de inclusión 1-BrN/β-CD/CH a concentraciones variables de β-CD utilizando GI90 y GIF. [1-BrN] =  $1,00 \times 10^{-5}$  M; [CH] =  $1,85 \times 10^{-3}$  M; 20 % v/v metanol



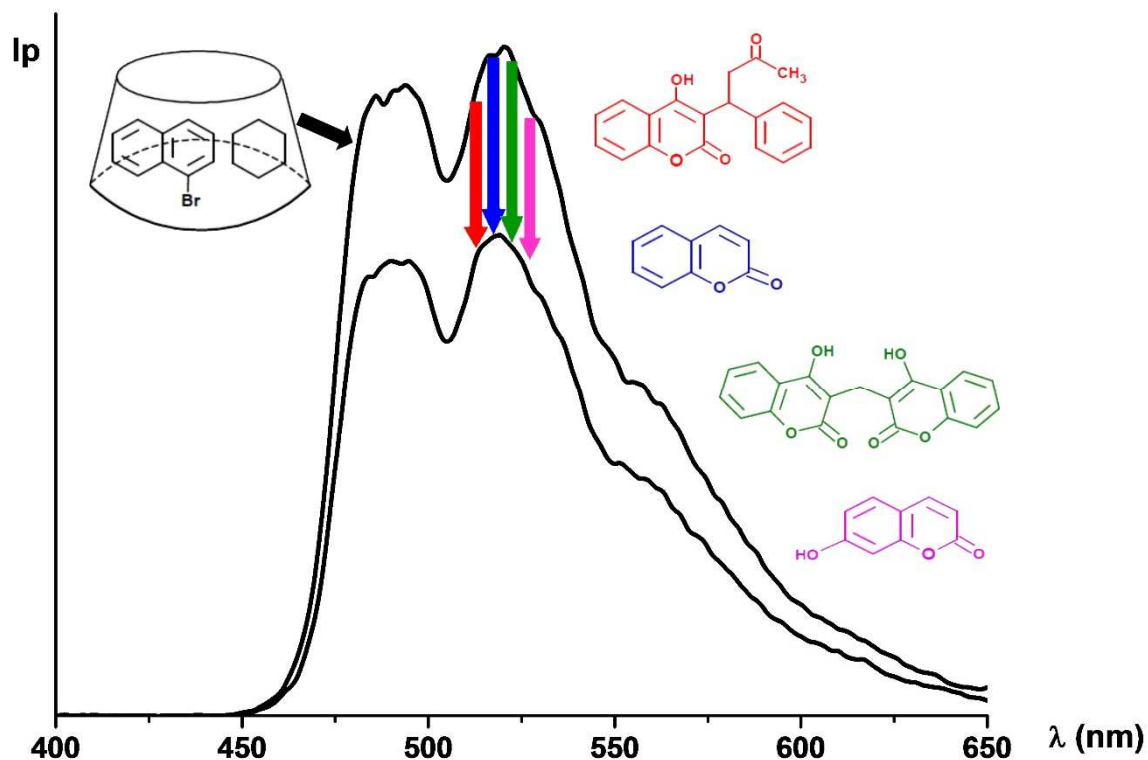
**Figura 20.** RTP del complejo de inclusión 1-BrN/β-CD/CH a concentraciones variables de metanol utilizando GI90 y GIF. [β-CD] =  $5,00 \times 10^{-3}$  M; [1-BrN] =  $1,00 \times 10^{-5}$  M; [CH] =  $1,85 \times 10^{-3}$  M

Las condiciones óptimas elegidas fueron:  $[\beta\text{-CD}] = 5,00 \times 10^{-3} \text{ M}$ ;  $[1\text{-BrN}] = 1,00 \times 10^{-5} \text{ M}$ ;  $[\text{CH}] = 1,85 \times 10^{-3} \text{ M}$ , 20 % v/v metanol. La Figura 21 muestra los espectros RTPL obtenidos bajo las condiciones experimentales propuestas. A pesar que estas condiciones son las mismas que se hubieran elegido considerando únicamente GI90, es importante remarcar que los EFI cumplen un rol importante cuando se analiza un dado sistema y deben ser tenidos en cuenta.



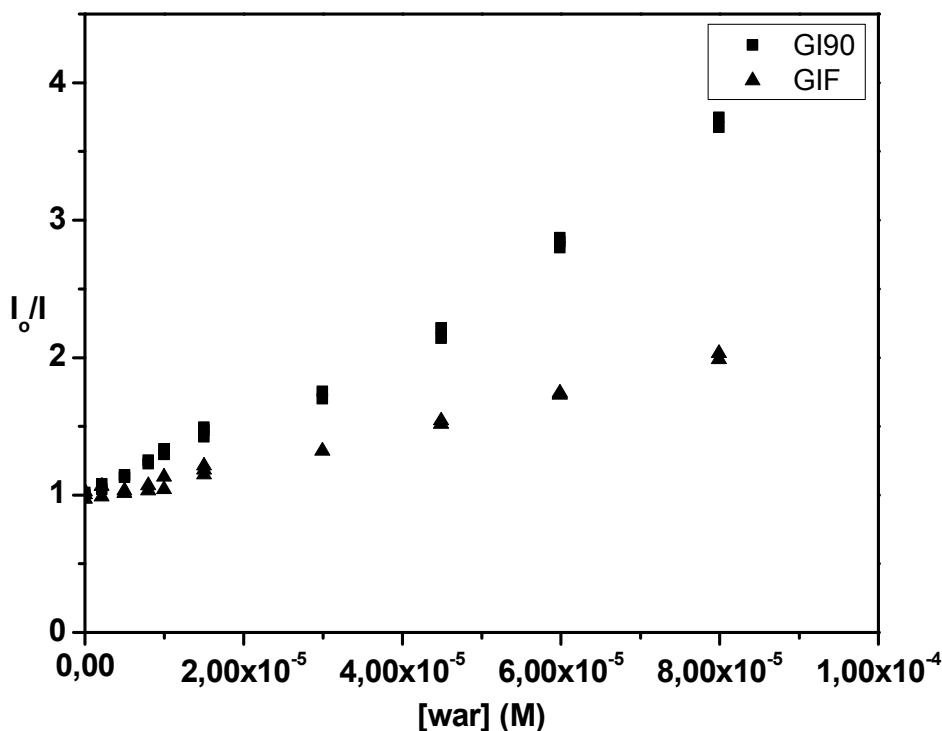
**Figura 21.** Espectros de excitación y emisión del complejo de inclusión 1-BrN/ $\beta$ -CD/CH en presencia de metanol.  $[\beta\text{-CD}] = 5,00 \times 10^{-3} \text{ M}$ ;  $[1\text{-BrN}] = 1,00 \times 10^{-5} \text{ M}$ ;  $[\text{CH}] = 1,85 \times 10^{-3} \text{ M}$ , 20 % v/v methanol  
-los espectros punteados corresponden al complejo de inclusión 1-BrN/ $\beta$ -CD-

3.2. Estudio del quenching de fosforescencia a temperatura ambiente del complejo de inclusión 1-bromonaftaleno/ $\beta$ -ciclodextrina/ciclohexano por cumarinas

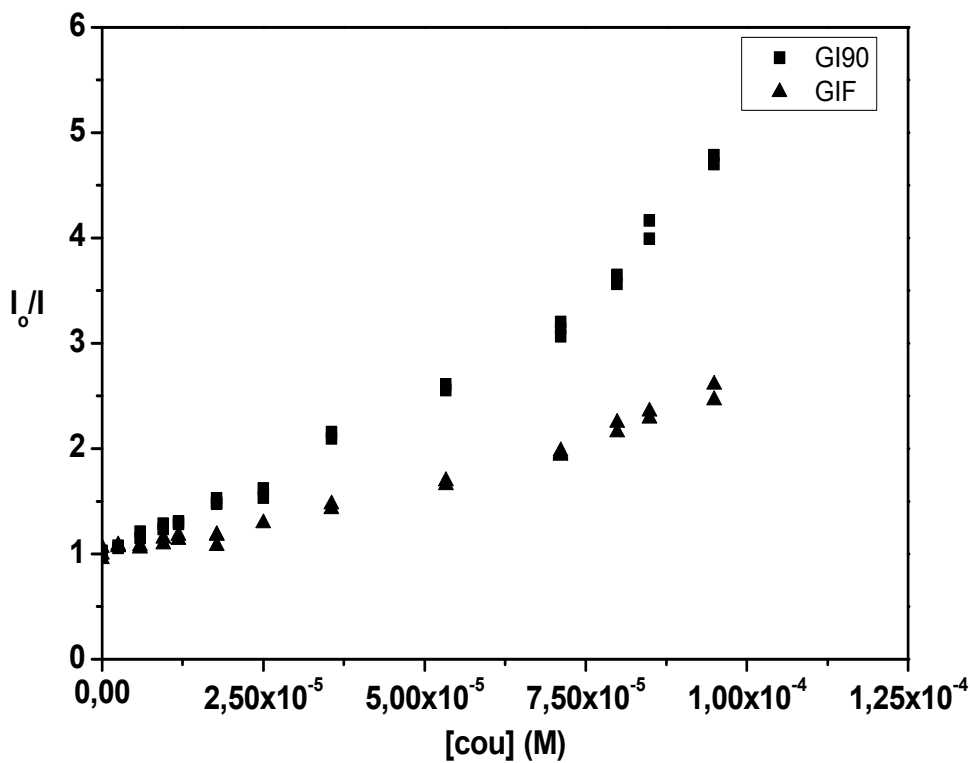


**Figura 22.** Resumen gráfico: Estudio del quenching de fosforescencia a temperatura ambiente del complejo de inclusión 1-bromonaftaleno/ $\beta$ -ciclodextrina/ciclohexano por cumarinas

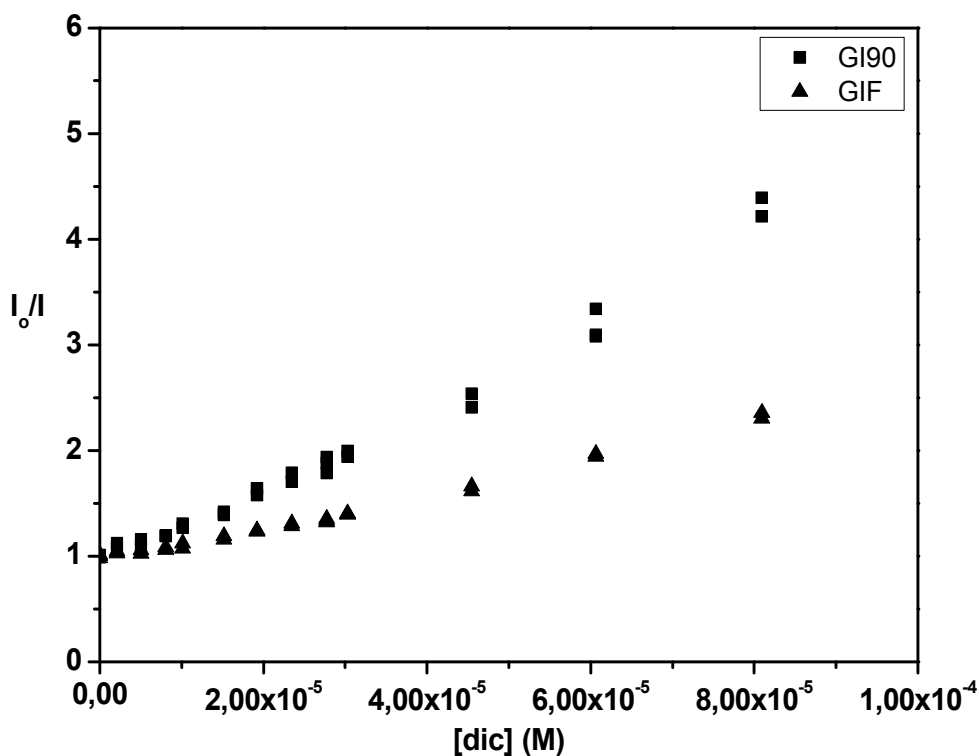
En el apartado anterior, se encontraron las condiciones experimentales óptimas cuando ciclohexano (CH) es utilizado como tercer componente en el sistema 1-BrN/ $\beta$ -CD en presencia de metanol. El uso de las cumarinas (warfarina, cumarina, dicumarol y umbeliferona) como cuarto componente dio lugar a un quenching de la RTP, sin modificación de la forma de los espectros de excitación y emisión correspondientes al complejo de inclusión 1-BrN/ $\beta$ -CD/CH. Las Figuras 23-26 muestran las representaciones gráficas de la ecuación de Stern-Volmer -ecuación (4) en términos de intensidad de fotoluminiscencia- para concentraciones variables de quencher. En cada figura, se comparan las medidas obtenidas para GI90 y GIF. Los puntos de la curva corresponden a duplicados obtenidos de soluciones independientes a cada nivel de concentración, salvo las concentraciones de los extremos y del centro donde son triplicados.



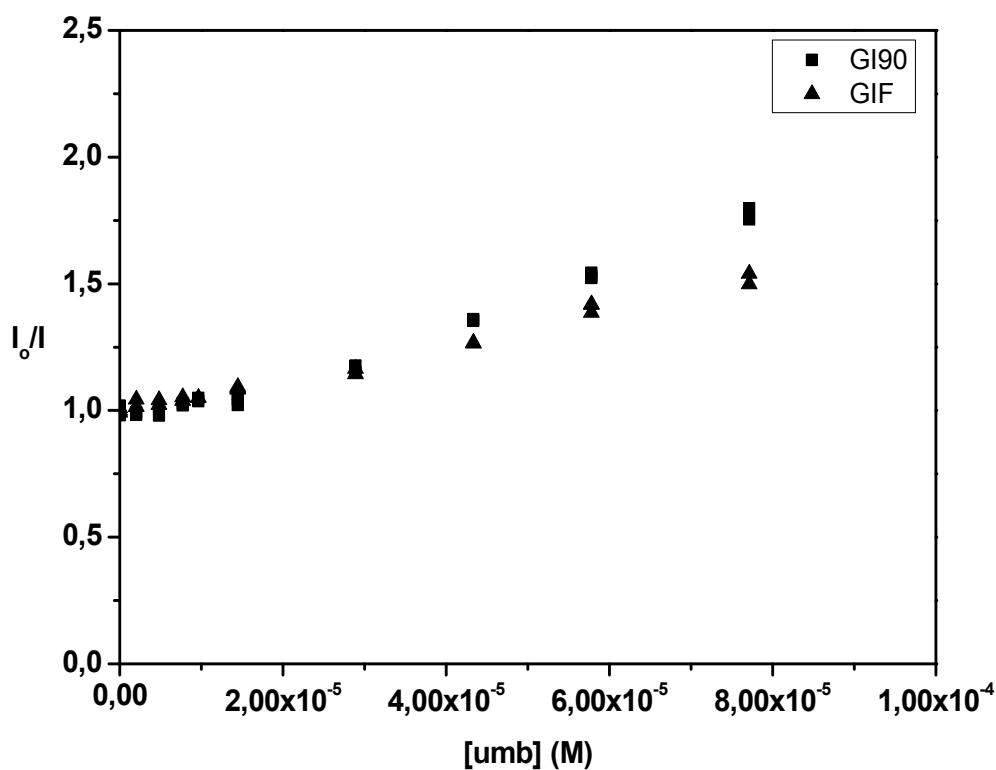
**Figura 23.** Representación gráfica de la ecuación de Stern-Volmer a concentraciones variables de warfarina, utilizando GI90 y GIF.  $[\beta\text{-CD}] = 5,00 \times 10^{-3} \text{ M}$ ;  $[1\text{-BrN}] = 1,00 \times 10^{-5} \text{ M}$ ;  $[\text{CH}] = 1,85 \times 10^{-3} \text{ M}$ ; 20 % v/v metanol



**Figura 24.** Representación gráfica de la ecuación de Stern-Volmer a concentraciones variables de cumarina, utilizando GI90 y GIF.  $[\beta\text{-CD}] = 5,00 \times 10^{-3} \text{ M}$ ;  $[1\text{-BrN}] = 1,00 \times 10^{-5} \text{ M}$ ;  $[\text{CH}] = 1,85 \times 10^{-3} \text{ M}$ ; 20 % v/v metanol



**Figura 25.** Representación gráfica de la ecuación de Stern-Volmer a concentraciones variables de dicumarol, utilizando GI90 y GIF.  $[\beta\text{-CD}] = 5,00 \times 10^{-3} \text{ M}$ ;  $[1\text{-BrN}] = 1,00 \times 10^{-5} \text{ M}$ ;  $[\text{CH}] = 1,85 \times 10^{-3} \text{ M}$ ; 20 % v/v metanol



**Figura 26.** Representación gráfica de la ecuación de Stern-Volmer a concentraciones variables de umbeliferona, utilizando GI90 y GIF.  $[\beta\text{-CD}] = 5,00 \times 10^{-3} \text{ M}$ ;  $[1\text{-BrN}] = 1,00 \times 10^{-5} \text{ M}$ ;  $[\text{CH}] = 1,85 \times 10^{-3} \text{ M}$ ; 20 % v/v metanol

Como puede apreciarse, hay notables diferencias entre las medidas de RTP utilizando GI90 o GIF. Esto se debe a los EFI como resultado de las características de absorción del 1-BrN (Figura 16) y las cumarinas (Figura 6). En el caso de la umbeliferona, las diferencias son menos pronunciadas debido a su bajo coeficiente de extinción molar a 281 nm (Tabla 5). La curvatura hacia arriba observada en las figuras se explica en términos de los altos valores de absorbancia; a medida que la concentración aumenta, los EFI se vuelven más importantes y aun en GIF se observa una pérdida de la linealidad.

Analito	$\epsilon$ ( $M^{-1} cm^{-1}$ ) $\lambda = 281$ nm	Incertidumbre estándar combinada*
<b>Warfarina</b>	10814	240
<b>Cumarina</b>	10941	168
<b>Dicumarol</b>	13115	191
<b>Umbeliferona</b>	4422	198

**Tabla 5.** Coeficientes de extinción molar de las cumarinas en estudio a 281 nm

\*Desviación estándar estimada igual a la raíz cuadrada positiva de la varianza total obtenida por combinación de todas las incertidumbres de los componentes utilizando la ley de propagación de la incertidumbre

Un hecho importante que puede observarse en las figuras es la primera región de las curvas de Stern-Volmer, a bajas concentraciones del cuarto componente. En todos los casos, GIF devela una región constante donde la relación  $I_0/I$  es aproximadamente la unidad, lo cual no se observa en GI90. Este hecho demuestra que, a bajas concentraciones, el quenching de RTP observado a GI90 es causado por EFI. Se debe tener una especial precaución cuando se analizan las cumarinas (o cualquier compuesto absorbente) dado que puede observarse un quenching aparente debido a EFI. La GIF es una herramienta útil en Química Analítica cuando se estudian sistemas absorbentes, convirtiéndose en un procedimiento experimental que asegura resultados confiables.

La Tabla 6 resume los valores de la constante de Stern-Volmer para cada sistema, obtenidas en la región lineal (GIF).

Analito	$K_{sv}$ ( $M^{-1}$ )
<b>Warfarina</b>	12540 $\pm$ 275
<b>Cumarina</b>	13345 $\pm$ 394
<b>Dicumarol</b>	12815 $\pm$ 470
<b>Umbeliferona</b>	6911 $\pm$ 227

**Tabla 6.** Constantes de Stern-Volmer para las cumarinas en estudio

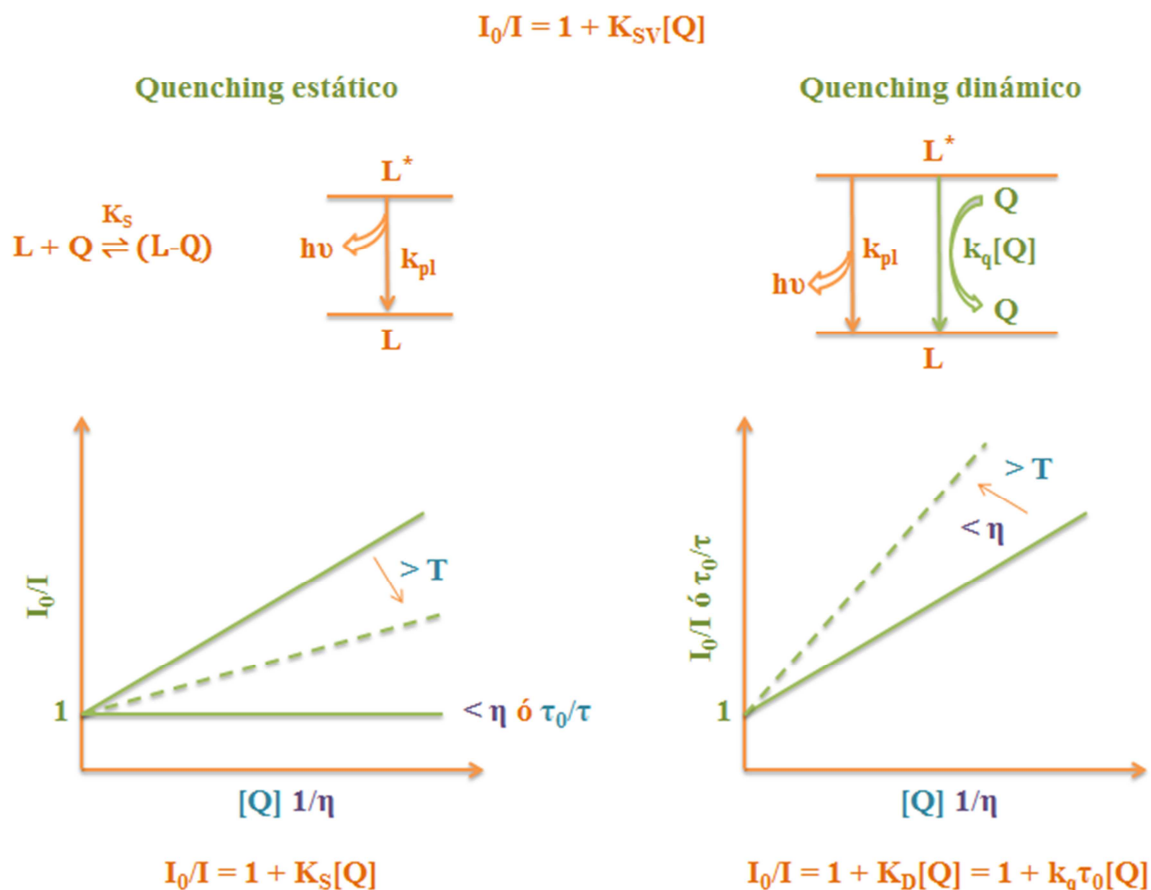
### 3.2.1. Determinación del mecanismo de quenching

Existen dos mecanismos de quenching que caracterizan la interacción entre un luminóforo y un quencher: quenching estático y dinámico. El quenching estático hace referencia a la formación de un complejo luminóforo-quencher no luminiscente en el estado fundamental y, por tanto, puede dar lugar a cambios en los espectros de absorción de los luminóforos y quenchers e inclusive a la aparición de un nuevo espectro de absorción. El quenching dinámico sólo afecta a los estados excitados de los luminóforos, por lo que no se esperan cambios en los espectros de absorción. Ambos tipos de quenching pueden distinguirse en función de su dependencia con la temperatura y la viscosidad. El quenching dinámico involucra la difusión del quencher hacia el luminóforo durante el tiempo de vida del estado excitado regresando al estado fundamental sin la emisión de un fotón. La difusión del quencher hacia el luminóforo puede dar lugar a un quenching colisional, el cual requiere contacto molecular, o un mecanismo de transferencia de energía, donde ambos deben encontrarse a una distancia específica. Los coeficientes de difusión son proporcionales a  $T/\eta$ , donde  $\eta$  es la viscosidad del disolvente (ecuación de Stokes-Einstein). Así, se espera que las constantes de quenching dinámico aumenten a mayores temperaturas y disminuyan al incrementarse la viscosidad. Por el contrario, un aumento de la temperatura resulta en una disminución de la estabilidad de los complejos y, por tanto, menores valores de constantes de quenching estático. Se espera que las constantes de quenching estático no varíen con  $1/\eta$  y, por tanto, tampoco la relación  $I_0/I$  [15, 118].

La medida de los tiempos de vida de fotoluminiscencia es el método más adecuado para distinguir entre quenching estático y dinámico. El quenching estático remueve una fracción de los luminóforos de la observación. Los luminóforos complejados no son luminiscentes y la única luminiscencia observada proviene de los luminóforos sin complejar (a la longitud de onda de excitación del luminóforo). La fracción no complejada no es perturbada y, por tanto, el tiempo de vida es  $\tau_0$ . Es por ello que para quenching estático  $\tau_0/\tau = 1$ . Por el contrario, para quenching dinámico  $I_0/I = \tau_0/\tau$ ; la disminución en el tiempo de vida ocurre dado que el quenching dinámico es un proceso adicional de decaimiento no radiativo del estado excitado [15].

La Figura 27 ilustra los mecanismos de quenching estático y dinámico.

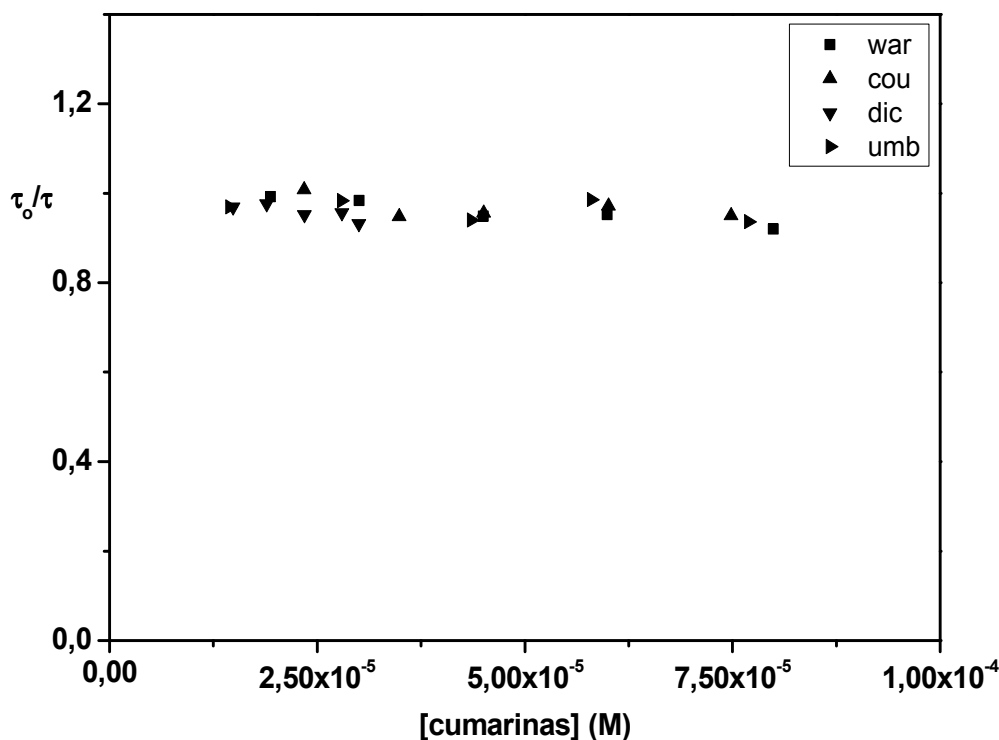




**Figura 27.** Mecanismos de quenching. L: luminóforo, Q: quencher  
El asterisco indica que se encuentra en un estado excitado

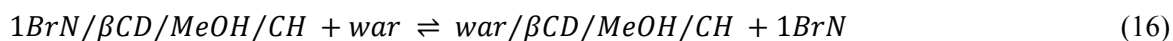
A fin de confirmar el mecanismo de quenching involucrado, se midieron los tiempos de vida de fosforescencia (GIF) utilizando un tiempo de medida ( $t_g$ ) de 1,00 ms y un tiempo de demora ( $t_d$ ) variable, estableciendo las longitudes de onda de excitación y emisión en 281 y 519 nm, respectivamente. La Figura 28 muestra las representaciones gráficas de la ecuación de Stern-Volmer en términos de los tiempos de vida de fosforescencia para el quenching de RTP del complejo de inclusión 1-BrN/ $\beta$ -CD/CH en presencia de metanol.

Puede notarse que existe una variación despreciable en la relación  $\tau_0/\tau$  con la concentración de quencher, indicando que el mecanismo de quenching es estático. Una posible explicación para la observación de un quenching estático en el sistema en estudio es el desplazamiento por las cumarinas del 1-BrN de la cavidad de la  $\beta$ -CD, formando un nuevo complejo de inclusión no fosforescente.

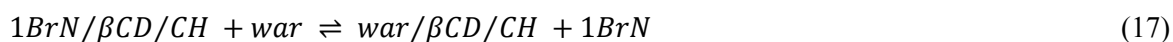


**Figura 28.** Representación gráfica de la ecuación de Stern-Volmer a concentraciones variables de warfarina (■), cumarina (▲), dicumarol (▼) y umbeliferona (►), utilizando GIF.  $[\beta\text{-CD}] = 5,00 \times 10^{-3} \text{ M}$ ;  $[1\text{-BrN}] = 1,00 \times 10^{-5} \text{ M}$ ;  $[\text{CH}] = 1,85 \times 10^{-3} \text{ M}$ ; 20 % v/v metanol

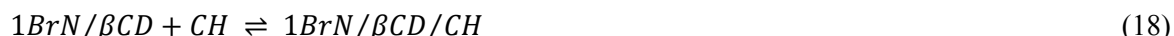
A partir de los resultados obtenidos, se propuso un mecanismo que explique la existencia de un quenching estático. Tomando a la warfarina como cumarina modelo, se podría considerar el siguiente equilibrio:



Una de las razones por las que se eligió metanol como disolvente (20 % v/v en las disoluciones de medida) fue la débil asociación con la  $\beta\text{-CD}$ . Dado que la constante de asociación  $\beta\text{-CD}/\text{metanol}$  (MeOH) es muy baja ( $K = 0,32 \text{ M}^{-1}$ ,  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  [119]), podemos reemplazar, a fines prácticos, la ecuación (16) por la (17). En la discusión anterior se ha considerado a CH y cumarinas como tercer y cuarto componente, respectivamente, en lugar de cuarto y quinto, debido a este hecho. De todas formas, la concentración de metanol ha sido optimizada a fin de obtener la mayor señal de RTPL en su presencia.



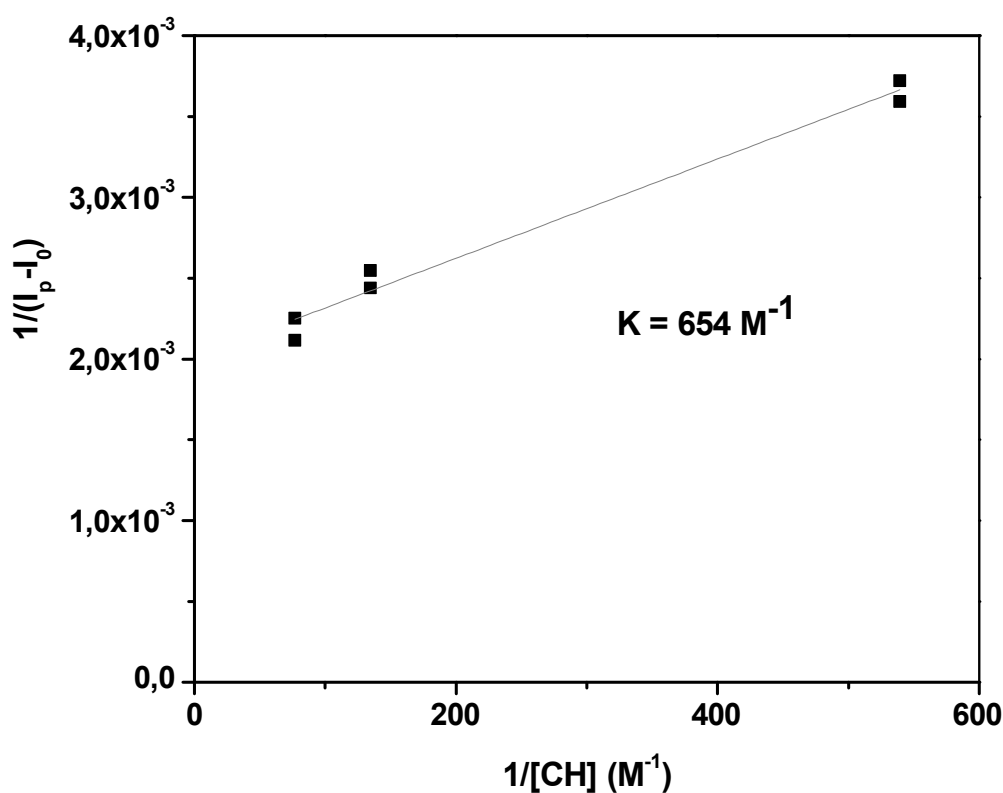
La constante de asociación del complejo de inclusión 1-BrN/ $\beta$ -CD/CH podría calcularse considerando el siguiente equilibrio:



Para su determinación (valor aproximado, sólo para tener una idea del orden), se midieron las intensidades de RTP del complejo variando la concentración de CH, utilizando el método clásico de Benesi-Hildebrand [120, 121]. Cuando la concentración del tercer componente (CH) es mucho mayor que la del complejo, la siguiente ecuación se aplica a complejos de inclusión ternarios [97]:

$$\frac{1}{(I_p - I_0)} = \frac{1}{K\kappa[\text{CH}][\beta\text{CD}]_0} + \frac{1}{\kappa[\beta\text{CD}]_0} \quad (19)$$

donde  $I_p$  es la intensidad de fosforescencia,  $I_0$  es la intensidad de fosforescencia en ausencia de CH,  $\kappa$  es una constante que tiene en cuenta al rendimiento cuántico de fosforescencia y factores instrumentales,  $[\text{CH}]$  la concentración de ciclohexano (variable) y  $[\beta\text{CD}]_0$  la concentración inicial de  $\beta$ -ciclodextrina. De la representación gráfica doble recíproca de  $1/(I_p - I_0)$  vs  $1/[\text{CH}]$ , se obtiene K de la relación entre la ordenada al origen y la pendiente (Figura 29).



**Figura 29.** Representación gráfica de Benesi-Hildebrand para el sistema 1-BrN/ $\beta$ -CD/CH.  
 $[\beta\text{-CD}] = 5,00 \times 10^{-3} \text{ M}$ ;  $[1\text{-BrN}] = 1,00 \times 10^{-5} \text{ M}$ ; 20 % v/v metanol; GIF

Tal como pudo determinarse, la formación del complejo de inclusión war/ $\beta$ -CD/CH da lugar al quenching estático de RTP del complejo de inclusión 1-BrN/ $\beta$ -CD/CH. Al ser el nuevo complejo no fosforescente, se observa una disminución de la intensidad de RTP. Si consideramos al complejo de inclusión 1-BrN/ $\beta$ -CD/CH como el luminóforo (L), a la warfarina como el quencher (Q) y al complejo de inclusión war/ $\beta$ -CD/CH como el complejo formado (L-Q), siguiendo la Figura 27 tendríamos:



$$K_S = \frac{[L-Q]}{[L][Q]} \quad (21)$$

donde [L-Q] es la concentración del complejo, [L] la concentración del luminóforo sin complejar y [Q] la concentración del quencher. Si las especies complejadas no son luminiscentes, la fracción de la luminiscencia remanente ( $I/I_0$ ) estará dada por la fracción total de luminóforos que no están complejados:  $f = I/I_0$ . Recordando que la concentración total de luminóforo,  $[L]_0$ , está dada por:

$$[L]_0 = [L] + [L - Q] \quad (22)$$

Sustituyendo en la ecuación (21):

$$K_S = \frac{[L]_0 - [L]}{[L][Q]} = \frac{[L]_0}{[L][Q]} - \frac{1}{[Q]} \quad (23)$$

Podemos sustituir las concentraciones de luminóforo por las intensidades de luminiscencia y, reordenando:

$$\frac{I_0}{I} = 1 + K_S[Q] \quad (24)$$

Se puede notar que la dependencia de  $I_0/I$  con [Q] es lineal tanto para el quenching estático o dinámico, con la salvedad que la constante de quenching es, para el quenching estático, la constante de asociación [15]. De la Tabla 6, puede verse que las constantes de asociación para las cumarinas son, en todos los casos, mayores al valor de la constante de asociación del complejo de inclusión 1-BrN/ $\beta$ -CD/CH ( $K = 654 \text{ M}^{-1}$ , Figura 29) por lo que es de esperar que ocurra el desplazamiento del 1-BrN por parte de las cumarinas, lo cual explicaría la presencia de un mecanismo de quenching estático y una consecuente disminución en la intensidad de RTP.

3.2.2. Determinación de warfarina en formulaciones farmacéuticas mediante quenching de fosforescencia del complejo 1-bromonaftaleno/ $\beta$ -ciclodextrina/ciclohexano

La muestra, pre-tratada según 2.1.1., fue analizada por triplicado a tres niveles de concentración.

Se realizaron los correspondientes ensayos de correlación y falta de ajuste para la curva de calibración (Tabla 7), se determinó la exactitud y precisión del método (Tabla 8) como así también las cifras de mérito de la metodología propuesta (Tabla 9) -Anexo I-. La Figura 30 muestra la representación gráfica de los residuos.

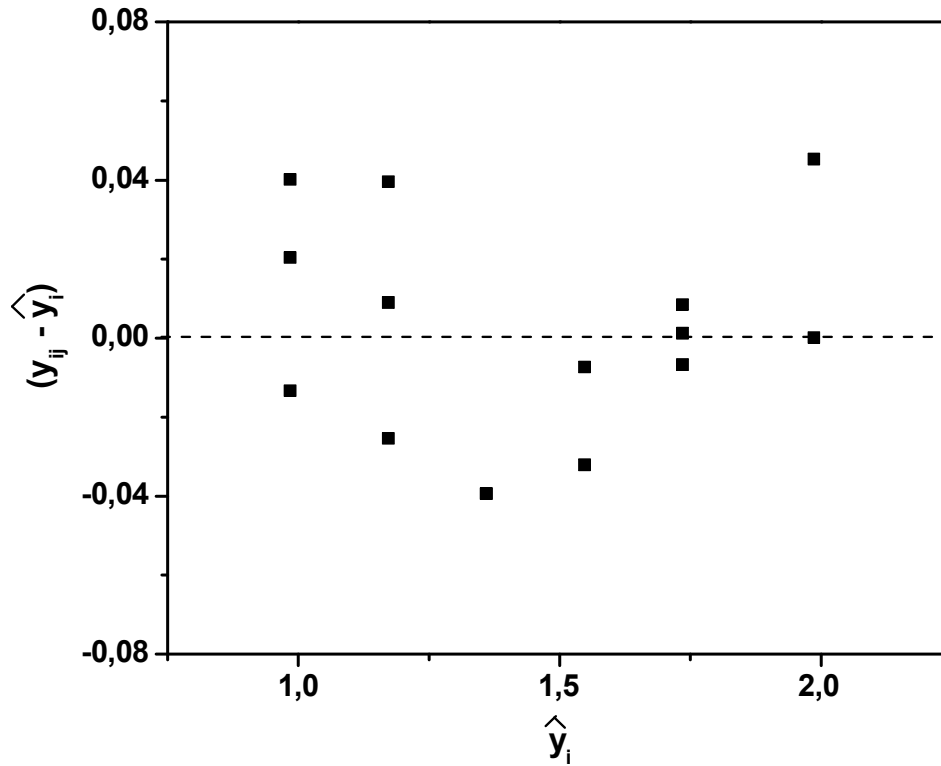
La concentración de warfarina hallada fue de  $2,12 \pm 0,09$  mg/comprimido. Dicho valor concuerda en buena medida con el valor reportado por el laboratorio y cumple con los requerimientos de la USP36-NF31 (las tabletas de warfarina sódica deben contener no menos del 95,0 % y no más del 105,0 % de la cantidad reportada) [107]. No se observó interferencia por parte de los excipientes.

<b>FV</b>	<b>SC</b>	$\phi$	<b>CM</b>	<b>F<sub>calc</sub></b>	<b>F<sub>crit</sub></b>
<b>R</b>	1,7309291	1	1,7309291	3101,299093	5,12
<b>FA</b>	0,005836026	4	0,001459007	2,614096559	3,63
<b>E</b>	0,005023173	9	0,00055813		
<b>T</b>	1,741788299	14			

**Tabla 7.** ANAVA

Ensayo correlación:  $F_{calc} > F_{crit}$ , se rechaza  $H_0$ , existe correlación entre las variables

Ensayo falta de ajuste:  $F_{calc} < F_{crit}$ , se acepta  $H_0$ , no hay falta de ajuste –el modelo lineal propuesto es el adecuado-



**Figura 30.** Representación gráfica de los residuos de la regresión

Puede verse que la distribución de los residuos es al azar y la variabilidad interna de las réplicas a cada nivel de concentración es comparable a la variabilidad global

Concentración	Exactitud		Precisión
	t calculado	t tabla	$C_v$ (%)
$1,50 \times 10^{-5} \text{ M}$	1,009		9,86
$4,00 \times 10^{-5} \text{ M}$	1,982	4,303	1,44
$6,00 \times 10^{-5} \text{ M}$	0,214		1,01

**Tabla 8.** Exactitud y precisión del método a tres niveles de concentración

Exactitud:  $t_{\text{calc}} < t_{\text{tabla}}$ , se acepta  $H_0$ , el método es exacto en los niveles de concentración estudiados

Precisión:  $C_v < 15 \%$ , el método es preciso en los niveles de concentración estudiados

$I_0/I = a + b[\text{war}]$			
<b>a</b>	0,98	<b>s<sub>a</sub></b>	0,01
<b>b</b>	12540 M <sup>-1</sup>	<b>s<sub>b</sub></b>	275 M <sup>-1</sup>
<b>s<sub>y/x</sub></b>	0,03		
<b>r</b>	0,99638		
<b>SEN</b>	12540 M <sup>-1</sup>		
<b>γ</b>	4,34x10 <sup>5</sup> M <sup>-1</sup>		
<b>LOD</b>	7,15x10 <sup>-6</sup> M		
<b>LOQ</b>	1,65x10 <sup>-5</sup> M		
<b>Intervalo dinámico</b>	7,15x10 <sup>-6</sup> M - 7,99x10 <sup>-5</sup> M		
<b>Intervalo lineal</b>	1,65x10 <sup>-5</sup> M - 7,99x10 <sup>-5</sup> M		

**Tabla 9.** Cifras de mérito para la determinación de warfarina

#### 4. Conclusiones

##### 4.1. Estudio de la fosforescencia a temperatura ambiente del complejo de inclusión 1-bromonaftaleno/ $\beta$ -ciclodextrina

El estudio del complejo de inclusión 1-bromonaftaleno/ $\beta$ -CD, a concentraciones de 1-bromonaftaleno de  $1,00 \times 10^{-5}$  M, requiere el uso de geometría de iluminación frontal a fin de eliminar los indeseables efectos de filtro interno. La optimización de los componentes podría arrojar los mismos resultados al utilizar geometría de iluminación a  $90^\circ$ , pero la evaluación de las constantes de asociación o la determinación de un tercer o cuarto componente puede verse influenciado por los efectos de filtro interno y, consecuentemente, arribar a conclusiones o cálculos erróneos. El conocimiento del espectro de absorción de un sistema en particular garantiza una correcta interpretación de los resultados, convirtiéndose en el primer paso a realizar en cualquier análisis. Si los valores de absorbancia a la longitud de onda de excitación son mayores a 0,02 –medido en celdas de 1,0 cm de camino óptico- (generalmente, no se tiene absorción a la longitud de onda de emisión fosforescente), se debe utilizar geometría de iluminación frontal a fin de obtener resultados confiables.

##### 4.2. Estudio del quenching de fosforescencia a temperatura ambiente del complejo de inclusión 1-bromonaftaleno/ $\beta$ -ciclodextrina/ciclohexano por cumarinas

El complejo de inclusión 1-bromonaftaleno/ $\beta$ -ciclodextrina/ciclohexano ha sido estudiado utilizando una serie de cumarinas como cuarto componente en presencia de metanol. Los efectos de filtro interno han sido notorios en el quenching de la fosforescencia a temperatura ambiente del complejo en estado líquido. Las características de absorción del 1-bromonaftaleno y de las cumarinas han hecho necesario el uso de una geometría de iluminación frontal a fin de sobrellevar los efectos indeseables de filtro interno. Esta configuración instrumental asegura que no se observe un quenching aparente, especialmente a bajas concentraciones de cumarinas. Se han calculado las constantes de Stern-Volmer en la región lineal y se han medido los tiempos de vida de fosforescencia revelando la existencia de un mecanismo de quenching estático. Se ha desarrollado una metodología analítica alternativa para la determinación de warfarina en productos comerciales obteniéndose buenas cifras de mérito y con resultados acordes a lo establecido por la Farmacopea de los Estados Unidos.

##### 4.3. Aspectos relevantes

El procedimiento experimental seguido en el desarrollo de este capítulo muestra la importancia de un buen criterio analítico cuando un compuesto es analizado por metodologías fosforescentes en el estado líquido (o cualquier metodología fotoluminiscente). Generalmente, las medidas de fosforescencia reportadas en los artículos no son corregidas por efectos de filtro interno a pesar de sus obvias contribuciones. Este trabajo proporciona una guía para futuras investigaciones en Química Analítica.



#### 4.4. Posibilidad de desarrollar un optosensor

El sistema conformado por el complejo de inclusión ternario 1-bromonaftaleno/ $\beta$ -ciclodextrina/ciclohexano en presencia de metanol ha demostrado ser un buen sensor fosforescente a temperatura ambiente en estado líquido para las diversas cumarinas estudiadas. Sin embargo, el hecho de que necesite un tiempo considerable para su estabilización (una hora luego de la agitación) genera una imposibilidad práctica que nos condiciona en el desarrollo de métodos de detección dinámicos como ser análisis por inyección en flujo (FIA).

El trabajo desarrollado en el presente capítulo ha dado lugar a dos publicaciones en la revista "Analytical Methods" [Anal. Methods 5 (2013) 6908-6910; Anal. Methods 6 (2014) 3462-3466].

Analytical  
Methods

RSC Publishing

COMMUNICATION

Cite this: *Anal. Methods*, 2013, 5, 6908

Received 14th September 2013  
Accepted 22nd October 2013

DOI: 10.1039/c3ay41599f

[www.rsc.org/methods](http://www.rsc.org/methods)

### Room temperature phosphorescence of the 1-bromonaphthalene/ $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex: comparison between right-angle and front-face illumination geometry

Maria Emilia Pacheco\* and Liliana Bruzzone

Analytical  
Methods



PAPER

Cite this: *Anal. Methods*, 2014, 6, 3462

### Room temperature phosphorescence quenching study of coumarins. Indirect determination of warfarin in pharmaceuticals

Maria Emilia Pacheco\* and Liliana Bruzzone

## *Quantum dots fosforescentes*

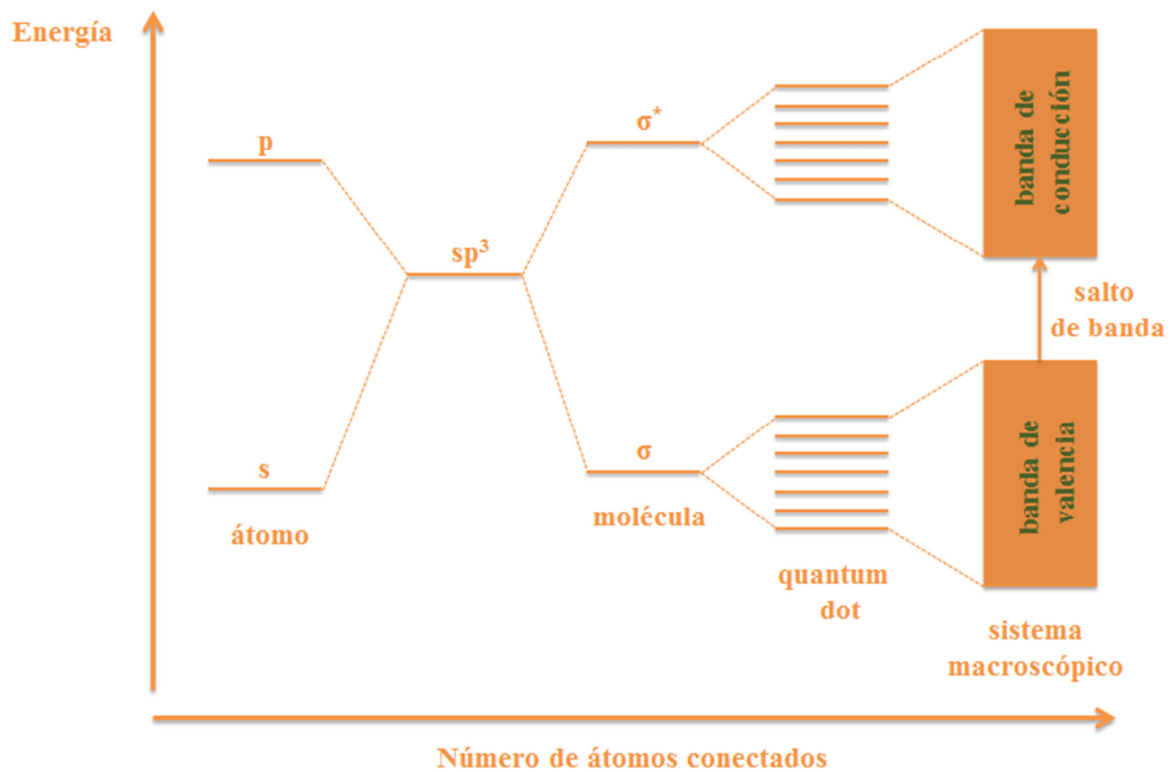
---

*Parte I*

### 1. Introducción

A lo largo de la última década, los nanocristales semiconductores, o quantum dots (QDs), han atraído especial atención, especialmente a los campos de la Química Analítica, debido a sus excepcionales propiedades optoelectrónicas, intermedias entre aquellas de los semiconductores macroscópicos (bulk) y de moléculas discretas. Sus características únicas son debidas al cambio en la estructura de los niveles de energía en la escala nanométrica (sus diámetros se encuentran en el intervalo de los 2-10 nm) así como por la composición y forma del núcleo de la nanopartícula. Están constituidos, generalmente, por elementos de los grupos II-VI, III-V o IV-VI de la tabla periódica.

A fin de evaluar las propiedades optoelectrónicas de los QDs, podemos considerar los estados electrónicos de un solo átomo de forma aislada y ver su evolución cuando los mismos se aproximan e interaccionan entre sí (Figura 31).

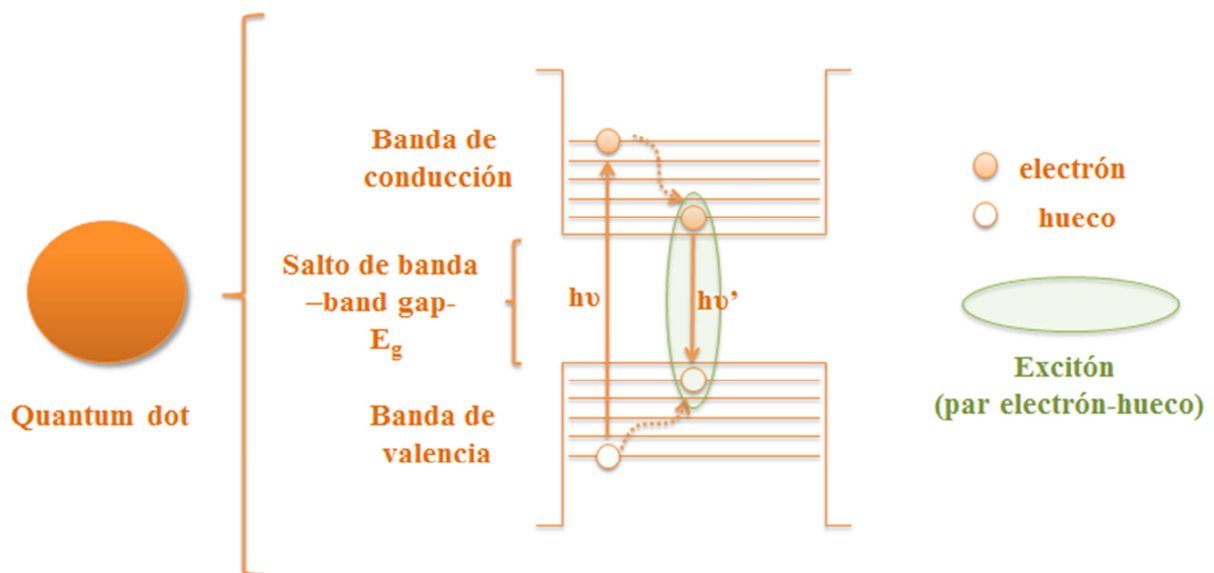


**Figura 31.** Diagrama de los niveles de energía en función del número de átomos unidos

A medida que aumenta el número de átomos, los niveles discretos de energía de los orbitales atómicos se convierten en bandas de energía (se muestra el caso de un material semiconductor). Los nanocristales semiconductores pueden considerarse un híbrido entre pequeñas moléculas y materiales macroscópicos.

Al combinarse varios átomos para formar una molécula, los niveles de energía discretos de los orbitales atómicos dan lugar a niveles discretos para los orbitales moleculares. Si el tamaño del

sistema poliatómico se incrementa de forma progresiva hasta tener un cristal infinito –macroscópico–, la estructura energética consistirá en bandas de energía (ya no niveles discretos de energía) donde cada banda puede ser ocupada con un número limitado de portadores de carga. La estructura electrónica de los niveles de energía de un nanocristal será una situación intermedia entre los niveles de energía de un sistema atómico y la estructura de bandas de un sistema macroscópico. En la Figura 31 puede verse que los niveles de energía de un nanocristal son discretos, su densidad mayor y su espaciado menor que el correspondiente a los niveles de un átomo. Los niveles atómicos altamente ocupados interaccionan entre sí formando la banda de valencia del nanocristal, mientras que los más bajos, no ocupados, interaccionan entre sí formando la banda de conducción del nanocristal. La diferencia de energía entre la banda de valencia y la banda de conducción da como resultado el salto de banda (band gap) en el nanocristal [122].



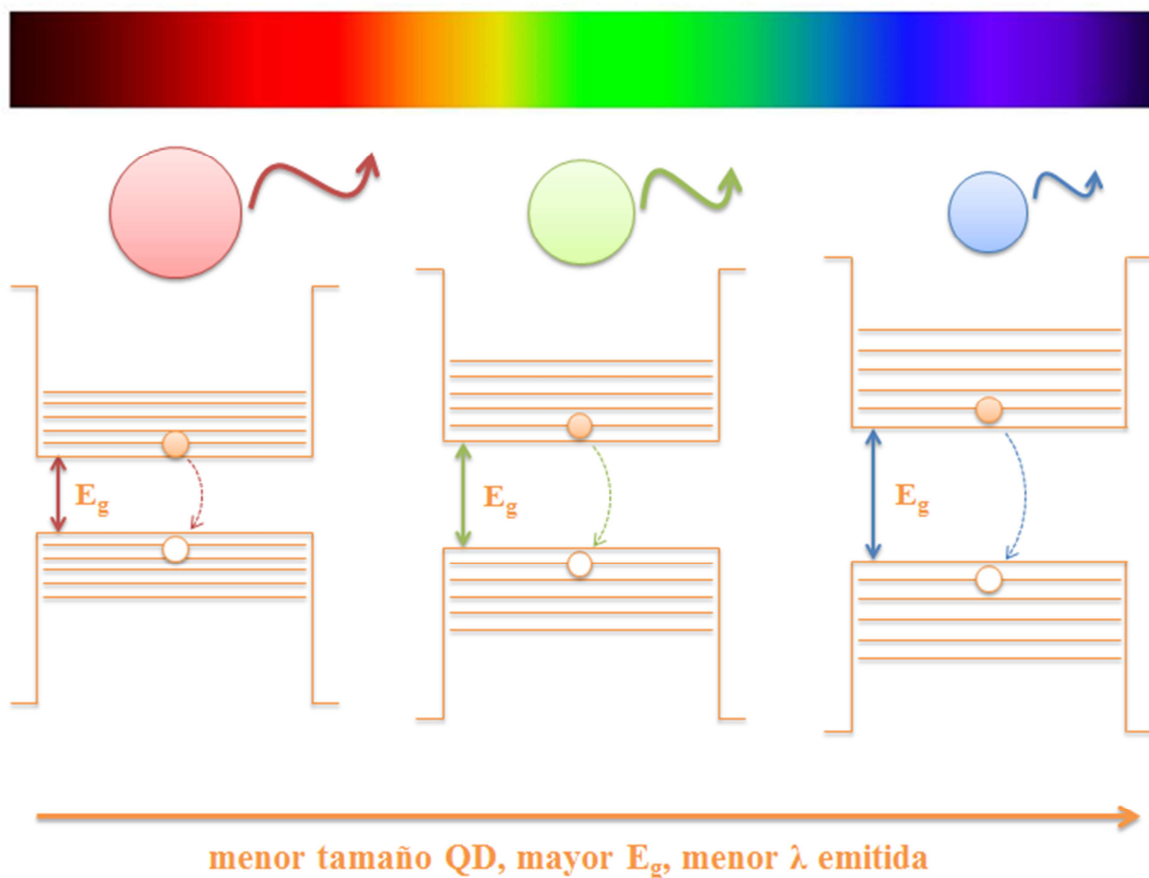
**Figura 32.** Diagrama de los niveles de energía de un QD

La energía mínima para crear un par electrón-hueco en un QD está dada por su salto de banda ( $E_g$ )

En los QDs, dado su pequeño tamaño (escala nanométrica), los excitones (par electrón-hueco, Figura 32) se hallan confinados en un espacio muy reducido dentro de las tres dimensiones del material. Este fenómeno se conoce como confinamiento cuántico: cuando el radio del nanocristal semiconductor es menor al del excitón de Bohr (el radio del excitón de Bohr es la distancia promedio entre el par electrón-hueco), existe una cuantización de los niveles de energía, es decir, pasan a ser discretos y finitos y dependen fuertemente del tamaño de la nanopartícula. Como consecuencia del confinamiento espacial de los pares electrón-hueco, la diferencia de energía entre las bandas de energía del semiconductor aumenta al disminuir el tamaño de la nanopartícula (el radio del excitón de Bohr para

el ZnS se estima en 25 Å; para nanocristales de ZnS de diámetros menores a 50 Å, se observa una dependencia con el tamaño de la  $E_g$  –desplazamiento hacia mayores energías- [123]). Esto es análogo a la partícula en la caja de la mecánica cuántica: por el principio de incertidumbre de Heisenberg, cuanto más precisamente conozcamos la posición de la partícula, mayor incerteza tendremos en su momento, y viceversa; así, cuanto más localizada y confinada espacialmente se vuelve la partícula, es mayor su momento/energía. Esto se manifiesta con un aumento en la energía promedio de los electrones en la banda de conducción, lo que equivale a un mayor salto de banda. El salto de banda de un QD esférico aumenta, respecto a su valor macroscópico, en un factor de  $1/R^2$ , donde R es el radio de la partícula (basado en la ecuación de onda de Schrödinger, válida para  $R < \text{radio excitón de Bohr}$ ) [122].

Las propiedades fotoluminiscentes de los QDs dependen, así, de su tamaño: a medida que el tamaño del nanocrystal disminuye, la energía del salto de banda aumenta por lo que la energía de excitación requerida es mayor y, por tanto, la energía emitida en la desexcitación también es mayor, resultando en un desplazamiento de las longitudes de onda hacia el azul (Figura 33). Como resultado de este fenómeno, los QDs pueden emitir energía radiante de cualquier longitud de onda simplemente cambiando el tamaño de los mismos. La posibilidad de modificar la emisión fotoluminiscente, al modular la energía del salto de banda, es una de las características más sobresalientes, y con mayor potencial analítico, de los QDs.



**Figura 33.** Propiedades optoelectrónicas de los QDs en función al tamaño

Dado que la fotoluminiscencia de los QDs proviene de la recombinación del excitón, se espera que cambios en el entorno de los átomos superficiales del QD (como ser, interacciones con moléculas circundantes) afecten la eficiencia de la recombinación electrón-hueco y, consecuentemente, su eficiencia fotoluminiscente. Esa es una de las principales razones por las que los QDs se han convertido en una potencial herramienta analítica para el sensado químico [124].

En el año 1994, Bhargava y colaboradores [123] propusieron un método alternativo para modular las características optoelectrónicas y magnéticas de los QDs: la adición de impurezas metálicas durante la síntesis de las nanopartículas a fin de obtener QDs dopados. Para asegurar un proceso de dopado eficiente, el tamaño y el estado de valencia de la impureza metálica deben ser acordes al material anfitrión seleccionado. Sólo una pequeña fracción de las impurezas adicionadas durante la síntesis será finalmente incorporada dentro de la estructura del nanocrystal, pero aun así modificarán sus propiedades optoelectrónicas.

Los QDs dopados han resultado de gran interés dada la posibilidad de obtener propiedades fotoluminiscentes variables, principalmente en longitud de onda, utilizando distintos iones como impurezas en un mismo nanocrystal semiconductor anfitrión [125]. Están constituidos, generalmente, por nanocrystal semiconductores de los grupos II-VI como anfitriones, principalmente ZnS, ZnSe y CdS dado que ofrecen un amplio salto de banda (3,6 eV, 2,69 eV y 2,49 eV, respectivamente). Dentro de éstos, los QDs de ZnS han emergido como una alternativa biocompatible a los tradicionales QDs basados en cadmio y poseen, además, un mayor salto de banda. Como impurezas, generalmente se emplean iones de metales de transición, como ser  $Mn^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$  o  $Co^{+2}$ , y de tierras raras, incluyendo  $Tb^{+3}$ ,  $Eu^{+3}$  y  $Er^{+3}$ . El  $Mn^{+2}$  se encuentra entre los más utilizados como impureza al ser su emisión fotoluminiscente independiente del tamaño, aunque puede verse afectada por cambios estructurales en su microentorno.

En el presente trabajo de tesis doctoral se han evaluado las propiedades fotoluminiscentes de los QDs de ZnS dopados con Mn por lo que las siguientes secciones tratarán de explicar el mecanismo fotoluminiscente implicado y sus potenciales aplicaciones analíticas.

## 1.1. Quantum dots de ZnS dopados con Mn

### 1.1.1. Mecanismo fotoluminiscente

La emisión de los QDs dopados con  $Mn^{+2}$  se centra alrededor de los 590 nm y se corresponde con una coordinación tetraédrica del ión. Luego de la excitación, se genera un excitón en los niveles del anfitrión. Si alguno de los electrones deslocalizados de estos excitones puede alcanzar los átomos de  $Mn^{+2}$ , el proceso de desactivación ocurre a través de la conocida transición d-d del manganeso,  ${}^4T_1-{}^6A_1$ . Dado que esta transición es prohibida por espín, los QDs dopados muestran una emisión fotoluminiscente retardada con características típicas de la emisión fosforescente (tiempos de vida del

orden de los milisegundos, amplia separación entre las longitudes de onda de excitación y emisión, entre otras) [126].

A fin de explicar la fotoluminiscencia observada en los QDs de ZnS dopados con Mn (Mn:ZnS), en el trabajo publicado por Bhargava y colaboradores [123] se comparan las energías del salto de banda de los nanocristales con sus correspondientes sistemas macroscópicos a partir de la evaluación de los espectros de excitación y emisión fotoluminiscente. Podemos resumir sus observaciones como sigue:

- Espectro fotoluminiscente (PL), banda de la transición  ${}^4T_1-{}^6A_1$  del  $Mn^{+2}$ :

(i) nanocristal: 2,10 eV (590 nm)

(ii) sistema macroscópico: 2,12 eV (585 nm)

La despreciable variación en el PL indica la no dependencia de la emisión del  $Mn^{+2}$  con el tamaño.

- Espectro de excitación fotoluminiscente (PLE), banda de la transición  ${}^4T_1-{}^6A_1$  del  $Mn^{+2}$ :

(i) nanocristales de 3 nm de diámetro: 4,68 eV (265 nm)

(ii) sistema macroscópico: 3,73 eV (332 nm)

El PLE debe compararse con la energía del salto de banda ( $E_g$ ) a temperatura ambiente para un solo cristal cúbico de ZnS, la cual corresponde a 3,66 eV (339 nm). El desplazamiento observado, para el caso del nanocristal, en 1,02 eV hacia mayores energías indica un aumento en el salto de banda debido a efectos de confinamiento cuántico.

- Correlación entre  $E_g$  (espectro PLE) y diferentes tamaños del nanocristal: confirma que la transferencia de energía ocurre desde los estados de la banda s-p del par electrón-hueco a los estados d del ion Mn. Esto establece que el ion Mn es una parte integral del nanocristal de ZnS; el  $Mn^{+2}$  ocupa los sitios catiónicos del  $Zn^{+2}$  en el nanocristal de ZnS.

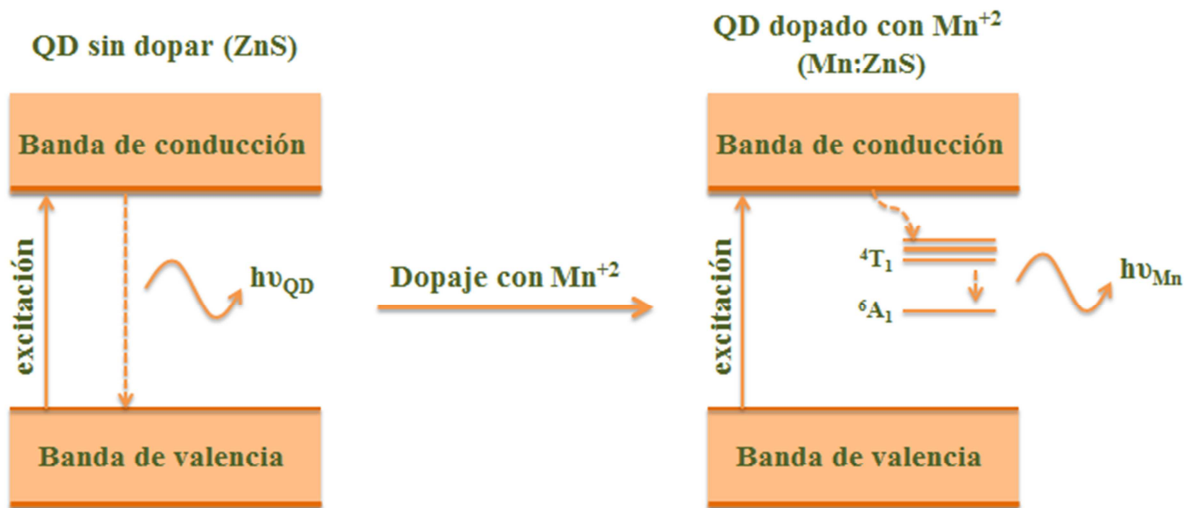
En el 2008, Beaulac y colaboradores [127] organizaron a los nanocristales semiconductores de los grupos II-VI, dopados con  $Mn^{+2}$ , en tres grupos de acuerdo a la localización relativa de los estados excitados del  $Mn^{+2}$  respecto al salto de banda del nanocristal semiconductor anfitrión. La posición relativa de dichos estados excitados dio lugar a la distinción de tres escenarios posibles de relajación luego de la fotoexcitación.

Los QDs de Mn:ZnS están enmarcados dentro del primer escenario descrito por los autores: los estados excitados del  $Mn^{+2}$  se encuentran a menor energía y dentro del salto de banda del semiconductor anfitrión (Figura 34). Tras la excitación del QD, se produce la transferencia de energía desde los niveles energéticos excitados del material semiconductor a los niveles energéticos excitados del Mn y se registra la desactivación radiativa debida a la transición típica del Mn en torno a los 590 nm. Esta emisión fotoluminiscente presenta altos rendimientos cuánticos y tiempos de vida largos (ms). Dentro de este primer escenario también se encuentran los nanocristales semiconductores de ZnSe y CdS dopados con  $Mn^{+2}$ .

Las transiciones desde el estado fundamental  ${}^6A_1$  del  $Mn^{+2}$  hacia los estados excitados  ${}^4T_1$  son prohibidas por espín y son parcialmente permitidas por acoplamiento espín-órbita. Las transiciones correspondientes a la absorción poseen coeficientes de extinción molar de aproximadamente  $10^0-10^1$



$M^{-1} \text{ cm}^{-1}$  en el máximo, comparados con valores de  $10^5$ - $10^6 M^{-1} \text{ cm}^{-1}$  para el primer máximo de absorción de un QD típico, posibilitando que actúen como centros fotoluminiscentes (radiativos) eficaces. A su vez, el hecho que sea prohibida por espín da lugar a bajas constantes de velocidad para la emisión fotoluminiscente  ${}^4T_1$ - ${}^6A_1$ . El salto de banda  ${}^4T_1$ - ${}^6A_1$ , combinado con las bajas energías fonónicas (vibración de la red) de la mayoría de los semiconductores de los grupos II-VI, permite que ocurra la emisión fotoluminiscente  ${}^4T_1$ - ${}^6A_1$  con altos rendimientos cuánticos [127].



**Figura 34.** Esquema de las transiciones involucradas en la emisión fotoluminiscente de los QDs

Es posible obtener espectros de emisión luminiscente con dos máximos de emisión si se controla la cantidad de Mn incorporado como dopante: una banda correspondiente a la transición d-d de Mn (590 nm) y una segunda a menores longitudes de onda (420-470 nm) debida a la recombinación del par electrón-hueco del semiconductor nanométrico.

En este tipo de QDs dopados, la emisión es menos energética que la debida al salto de banda del semiconductor (longitud de onda de emisión desplazada hacia el rojo). Por tanto, dicha emisión no es absorbida por el material que compone el QD, minimizando los problemas de autoabsorción.

### 1.2. Aplicaciones analíticas de los QDs fotoluminiscentes

Con el advenimiento de la Nanotecnología, los luminóforos orgánicos convencionales están siendo reemplazados por nanomateriales fotoluminiscentes los cuales poseen un alto potencial en el desarrollo de novedosas metodologías analíticas. Altos rendimientos cuánticos fotoluminiscentes, espectros de emisión simétricos, con anchos medio de banda espectral angostos y modulables según el tamaño de las nanopartículas, sumado a la sensibilidad de los estados superficiales, son algunas de las

propiedades únicas que permiten el uso de los QDs para un sensado directo (y simple) de diferentes tipos de analitos [128].

Los QDs de ZnS dopados con Mn (Mn:ZnS QDs) han atraído una especial atención como sensores fotoluminiscentes dado que el dopaje con  $\text{Mn}^{+2}$  promueve una emisión del tipo fosforescente centrada alrededor de 590 nm. Los iones de  $\text{Mn}^{+2}$  podrían actuar como centros recombinantes para los pares excitados electrón-hueco resultando en una fotoluminiscencia característica a longitudes de onda largas. La fosforescencia a temperatura ambiente (RTP) posee varias ventajas frente a la fluorescencia: desplazamientos de Stokes mayores, tiempos de vida del orden de los milisegundos, interferencia mínima (casi nula) de compuestos fluorescentes concomitantes y remoción de la energía radiante dispersada. Estas propiedades, características de la emisión de fosforescencia, no se encuentran en los QDs tradicionales de CdS, CdSe o ZnS. Adicionalmente, la ausencia de  $\text{Cd}^{+2}$  minimiza la toxicidad debida a la eventual liberación de dichos iones metálicos tóxicos de los nanocristales, particularmente importante en experimentos in-vivo. Las ventajas mencionadas convierten a los Mn:ZnS QDs en nanomateriales fotoluminiscentes analíticamente atractivos para su utilización como sensores. Se consigue, además, una mejora en la selectividad ya que los factores que usualmente afectan la emisión clásica de fosforescencia (presencia de átomos pesados, oxígeno disuelto, medio rígido, etc.) no tienen influencia en la emisión fotoluminiscente de los Mn:ZnS QDs [129].

En el presente trabajo de tesis doctoral, se sintetizaron Mn:ZnS QDs recubiertos con L-cisteína (L-cys) a fin de obtener sensores fosforescentes en estado líquido a temperatura ambiente. El recubrimiento superficial con L-cys proporciona solubilidad en agua y biocompatibilidad a los QDs, convirtiéndolos en potenciales sensores para analitos solubles en agua en muestras biológicas. Así, en esta etapa, se propone la evaluación de los Mn:ZnS QDs como sensores ópticos de las cumarinas en estudio en disolución acuosa a fin de poder utilizarlos en el desarrollo de un optosensor.

## 2. Metodología

### 2.1. Reactivos y disoluciones

Todos los reactivos utilizados son de grado analítico y se emplearon tal como se recibieron.

Las disoluciones acuosas (buffer fosfato) de QDs, cumarina (donación de una farmacia local) y umbeliferona (Sigma-Aldrich), y la disolución metanólica (metanol OmniSolv, Merck) de warfarina (Sigma-Aldrich) fueron preparadas diariamente. La disolución estándar de dicumarol (donación de una farmacia local) en NaOH (Carlo Erba) 0,1 M fue preparada diariamente. Partiendo de éstas, las disoluciones de trabajo fueron preparadas en buffer fosfato excepto para warfarina donde se mantuvo una relación buffer/metanol constante (8% v/v metanol).

La disolución reguladora (buffer) de pH 7,4 fue preparada disolviendo 0,683 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Riedel-de Haën Ag. Seelze-Hannover) en 25,0 mL de agua bidestilada y 39,1 mL de NaOH (Carlo Erba) 0,1 M. Se llevó a volumen (100,0 mL) con agua bidestilada previo ajuste de pH.

Para las medidas de rendimientos cuánticos de fotoluminiscencia, se utilizó rodamina B (BDH Chemicals Ltd) disuelta en etanol absoluto (Merck).

Para el estudio de selectividad, se prepararon disoluciones acuosas (buffer fosfato) de L-triptofano (Sigma-Aldrich), clorhidrato de L-cisteína monohidratado (Fluka AG Buchs SG), clorhidrato de triptamina (Sigma-Aldrich),  $\beta$ -naftol (Sigma-Aldrich) y disoluciones metanólicas de fenantreno (Sigma-Aldrich), antraceno (Sigma-Aldrich) y naftaleno (Fluka AG Buchs SG). Partiendo de éstas, las disoluciones de trabajo fueron preparadas manteniendo una relación buffer/metanol constante (8% v/v metanol).

### 2.2. Instrumentación analítica

Todos los espectros de fotoluminiscencia (PL) fueron registrados con un espectrofluorómetro Perkin-Elmer LS-50B (Beaconsfield, Inglaterra) provisto de una lámpara pulsada de xenón como fuente de excitación (ancho de pulso  $<10 \mu\text{s}$ , 60 Hz) y un fotomultiplicador R928. El instrumento se encuentra conectado a una PC para el almacenamiento y tratamiento de datos a través del software FL Winlab. Las medidas de fluorescencia fueron llevadas a cabo utilizando celdas de cuarzo convencionales de 1,0 cm de camino óptico. Las medidas de RTP con iluminación frontal fueron realizadas utilizando el accesorio correspondiente, celdas cilíndricas de cuarzo de 1,0 cm de camino óptico, tiempos de demora ( $t_d$ ) y de medida ( $t_g$ ) de 0,10 ms y 5,00 ms, respectivamente (ver Figura 13, Capítulo II). La longitud de onda de excitación de los QDs fue 276 nm, registrando su emisión de fosforescencia a 584 nm, utilizando anchos de banda de excitación de 15 nm y de emisión de 20 nm.

Los espectros de absorción fueron medidos en un espectrofotómetro Shimadzu UV-240 (Japón) equipado con celdas de cuarzo de 1,0 cm de camino óptico.

Los diagramas de difracción de rayos X (XRD) –difractogramas- fueron obtenidos utilizando un difractómetro de rayos X Philips, equipado con un generador PW 1732/20 y un goniómetro PW

1050/70. Se utilizó la radiación  $K_{\alpha}$  del Cu ( $\lambda = 0,15406$  nm) a 40 kV y 40 mA. El intervalo escaneado fue  $2\theta = 15^{\circ}$ - $65^{\circ}$  (modo de escaneo escalonado; tamaño del escalón  $0,040^{\circ}$ ; velocidad de escaneo  $1^{\circ}/\text{min}$ ).

### 2.3. Síntesis de Mn:ZnS QDs

Los QDs de ZnS dopados con  $\text{Mn}^{+2}$ , recubiertos con L-cys (solubles en agua), fueron sintetizados siguiendo el procedimiento descrito por Sotelo y colaboradores [129] con leves modificaciones (Figura 35).

Brevemente, el agente de recubrimiento (L-cys: clorhidrato de L-cisteína monohidratado, Fluka AG Buchs SG) y los precursores ( $\text{Zn}^{+2}$ : acetato de zinc, Mallinckrodt;  $\text{Mn}^{+2}$ : cloruro de manganeso, Analar) fueron mezclados en un vaso de precipitados y el pH fue ajustado a 11 utilizando NaOH 0,1 M. La mezcla de reacción se colocó en un matraz de tres bocas y se la sometió a agitación magnética durante 30 minutos bajo atmósfera de nitrógeno ( $25^{\circ}\text{C}$ ). Se inyectó rápidamente una disolución acuosa de tioacetamida (Carlo Erba) permitiendo así la nucleación de las nanopartículas. La mezcla se mantuvo bajo agitación magnética y atmósfera de nitrógeno durante 20 minutos ( $25^{\circ}\text{C}$ ). Luego, la disolución se mantuvo a  $50^{\circ}\text{C}$  durante dos horas (aire) con el fin de mejorar la estructura cristalina de los QDs. El proceso de purificación se llevó a cabo por precipitación de las nanopartículas con etanol (Merck), centrifugando a 3600 rpm durante 10 minutos (el procedimiento se repitió tres veces). Finalmente, los QDs fueron secados bajo vacío y guardados bajo atmósfera de nitrógeno (polvo amarronado).

El mismo procedimiento se efectuó para la síntesis de los QDs de ZnS, exceptuando la adición de  $\text{Mn}^{+2}$ .

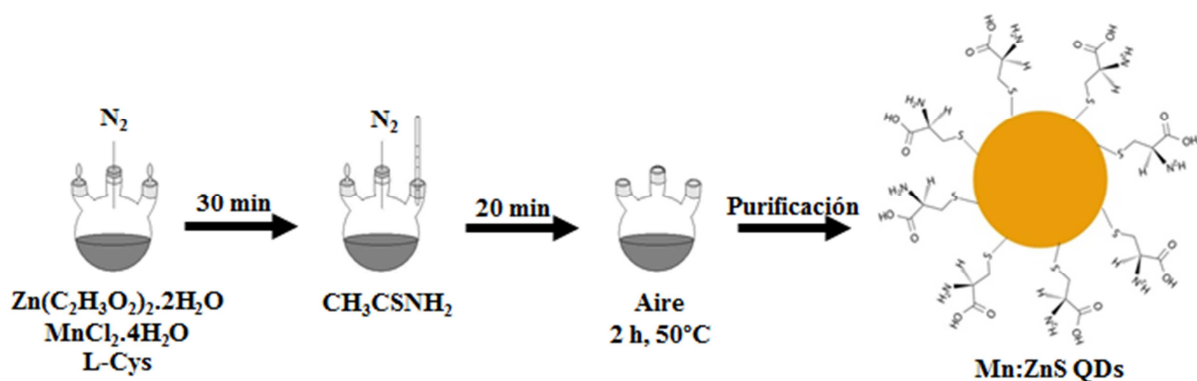


Figura 35. Síntesis de los quantum dots de ZnS dopados con Mn (Mn:ZnS QDs)

#### 2.4. Consideraciones analíticas para las medidas de fosforescencia

La regulación del pH resultó sumamente importante debido a la presencia de moléculas que poseen grupos ionizables que modifican sus propiedades de absorción: L-cys y las cumarinas. El buffer fosfato (pH = 7,4) se seleccionó por varias razones: es el pH fisiológico, las disoluciones de QDs son estables y es el buffer utilizado para la determinación de warfarina (ver sección 2.5.).

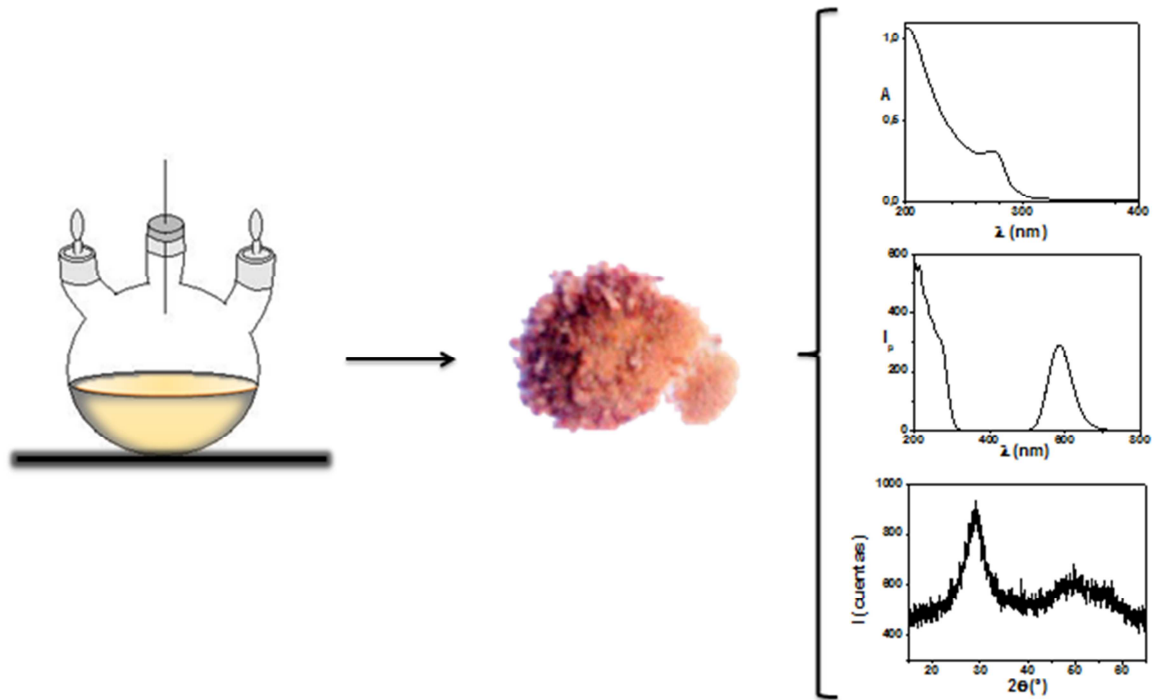
Salvo para las medidas de rendimiento cuántico, se ha utilizado geometría de iluminación frontal a fin de evitar los posibles efectos de filtro interno.

#### 2.5. Procedimiento analítico para la determinación de warfarina

La determinación de warfarina se realizó en un anticoagulante comercial, Coumadin 5 mg (Bristol-Meyers Squibb). Los comprimidos fueron pre-tratados siguiendo el procedimiento brindado por el Laboratorio Ariston S.A (Circuvit 2 mg), adaptado para mantener las relaciones comprimido:solvente de dilución en los nuevos comprimidos (Coumadin 5 mg). Dicho método de preparación de muestra es análogo al reportado en la Farmacopea de los Estados Unidos (USP36-NF31) [107]. Se pulverizaron veinte comprimidos en un mortero de ágata; se pesaron 885 mg del polvo resultante en un matraz de 50,00 mL y se adicionaron 30,0 mL del solvente de dilución -buffer pH 7,4:acetonitrilo (OmniSolv, Merck), 85:15 v/v-. La disolución fue agitada magnéticamente durante 60 minutos y se llevó a volumen con el solvente de dilución. La disolución resultante fue filtrada a través de papel de filtro (Whatman #41). La disolución madre utilizada para las medidas fue preparada mediante una dilución 1:5 v/v en buffer fosfato pH 7,4.

### 3. Resultados y discusión

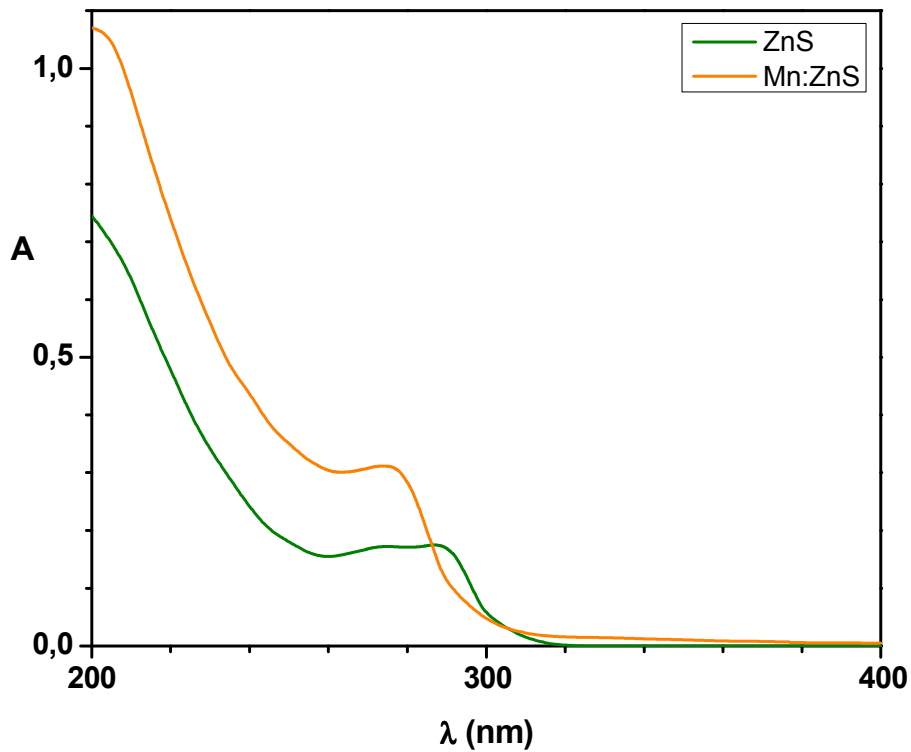
#### 3.1. Quantum dots de ZnS dopados con Mn recubiertos con L-cisteína: síntesis y caracterización



**Figura 36.** Resumen gráfico: Quantum dots de ZnS dopados con Mn recubiertos con L-cisteína, síntesis y caracterización

##### 3.1.1. Absorción

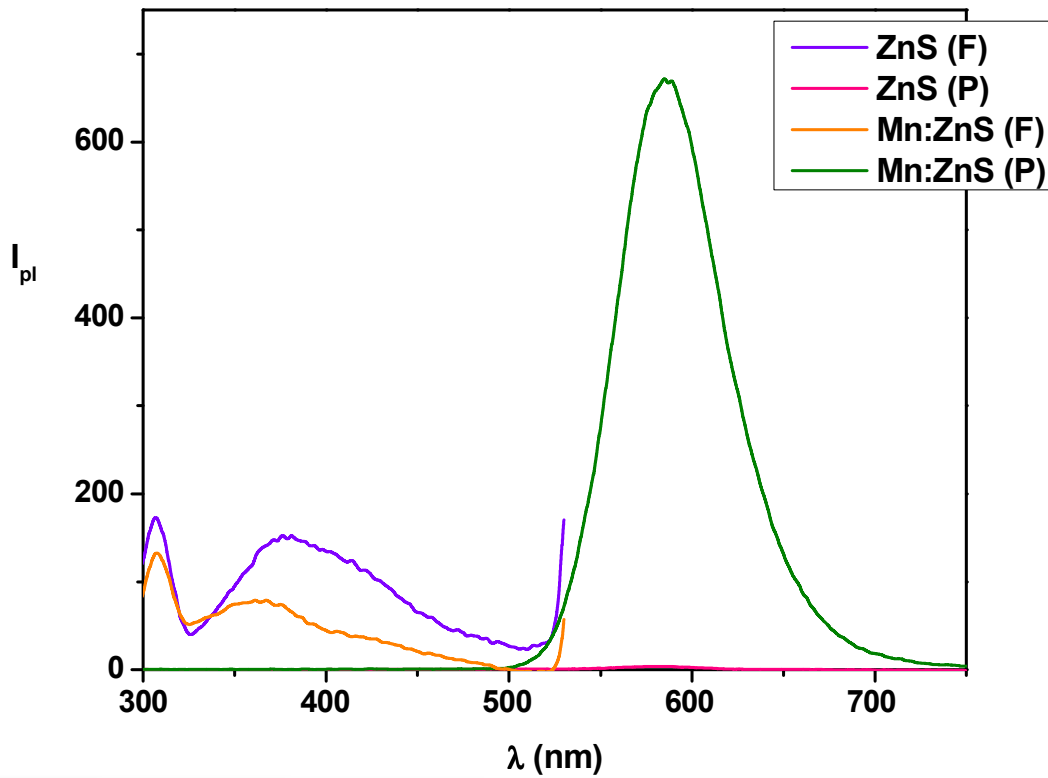
Los espectros de absorción de los Mn:ZnS QDs exhiben una absorción centrada en 276 nm. En comparación con las nanopartículas de ZnS, cuya absorción se encuentra a 290 nm, ésta se halla desplazada al azul, hecho que podría atribuirse a efectos del confinamiento cuántico –formación de partículas más pequeñas luego del dopaje con Mn- (Figura 37).



**Figura 37.** Espectros de absorción de ZnS y Mn:ZnS QDs

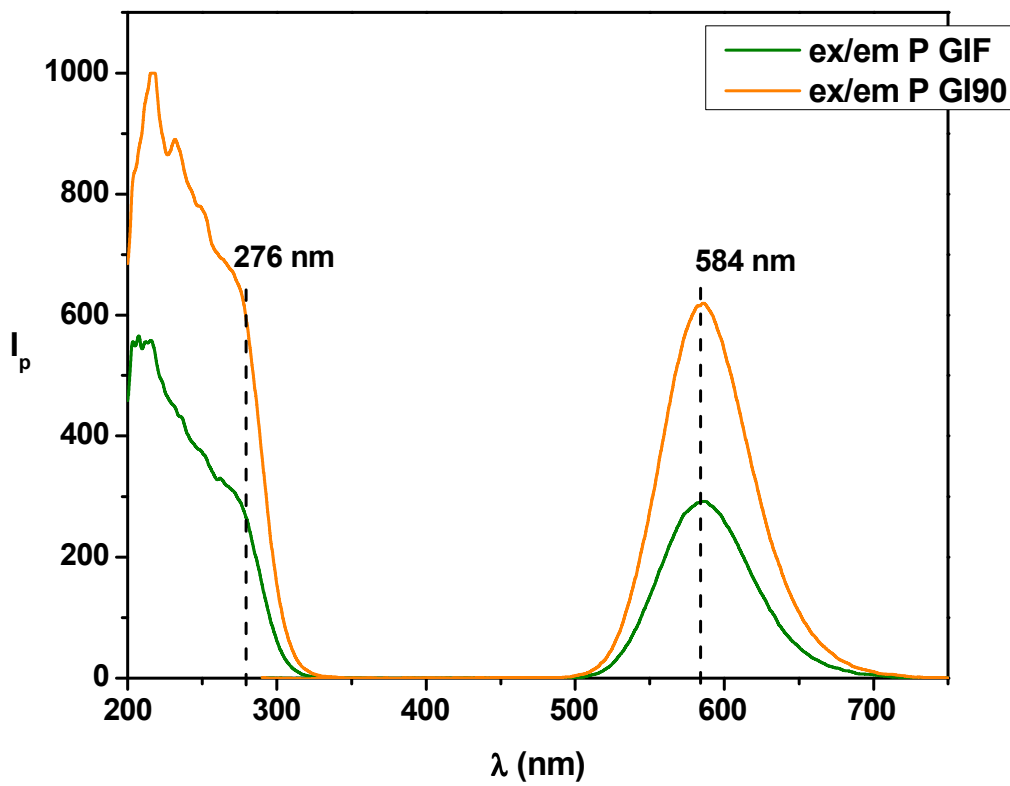
### 3.1.2. Excitación/emisión fotoluminiscente

Los espectros de excitación y emisión fotoluminiscente de una disolución de ZnS y de Mn:ZnS QDs se muestran en la Figura 38. Excitando a 276 nm, se observa un máximo de emisión a 584 nm (modo fosforescencia) y una banda más ancha entre los 350 y 450 nm (modo fluorescencia). Como se explicó en la Introducción del presente capítulo, la emisión fosforescente se atribuye al dopaje de  $Mn^{+2}$  dentro de la red del ZnS. Luego de la excitación, la energía es transferida desde los niveles de energía de los estados excitados del material semiconductor a los niveles de energía del estado excitado del  $Mn^{+2}$ . El proceso de desactivación ocurre a través de la conocida transición d-d del manganeso ( ${}^4T_1-{}^6A_1$ ). La emisión cercana a los 400 nm se debe a la desexcitación a través del salto de banda del semiconductor. Como puede observarse, la emisión en modo fluorescencia no muestra la emisión en la región de los 580 nm dado que las bandas de dispersión, de mayor intensidad, se solapan con la misma (se deberían colocar filtros a fin de eliminarlas –sección 3.1.3.-). La Figura 39 muestra los espectros de excitación y emisión fosforescente del Mn:ZnS y las longitudes de onda seleccionadas.



**Figura 38.** Espectros de emisión fotoluminiscente de ZnS y Mn:ZnS QDs

P: fosforescencia (anchos banda ex/em: 15/20 nm); F: fluorescencia (anchos banda ex/em: 10/10 nm)



**Figura 39.** Espectros de excitación y emisión fosforescente de Mn:ZnS QDs

GIF: geometría de iluminación frontal; GI90: geometría de iluminación a 90°



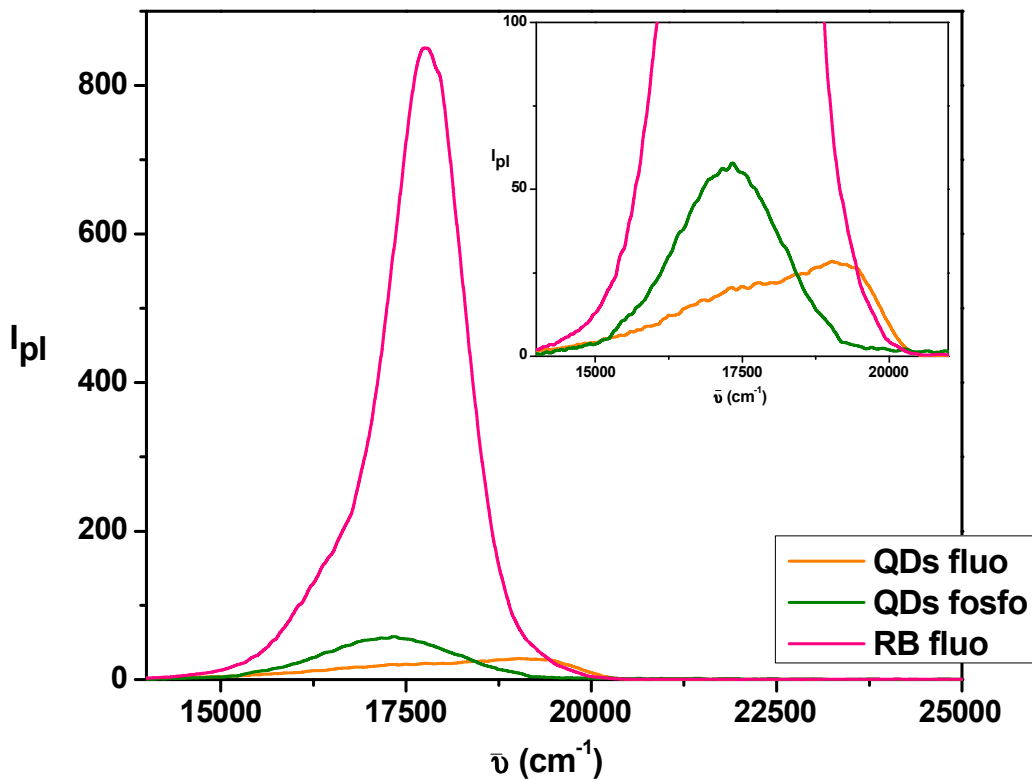
La emisión del  $Mn^{+2}$  es una emisión de fotoluminiscencia retardada, observada en modo fluorescencia y en modo fosforescencia. Dado que la transición  ${}^4T_1-{}^6A_1$  es prohibida por espín, dicha emisión presenta las propiedades típicas de la emisión fosforescente: desplazamiento de Stokes alto (308 nm, Figura 39) y largos tiempos de vida de fotoluminiscencia (del orden de algunos ms, ver sección 3.2.). A fin de aislar la banda de emisión cercana a los 580 nm, se trabaja experimentalmente en modo fosforescencia obteniendo así una mayor sensibilidad. Como puede verse en la Figura 39, la fosforescencia detectada utilizando geometría de iluminación frontal (GIF) es menor a la correspondiente a geometría de iluminación a  $90^\circ$  dado que en GIF sólo se ilumina la superficie. Aun así, es necesario el uso de GIF a fin de eliminar los posibles efectos de filtro interno (Tabla 10).

### 3.1.3. Rendimiento cuántico de fotoluminiscencia

El valor del rendimiento cuántico de fotoluminiscencia (PL-QY) para Mn:ZnS QDs fue determinado utilizando el método propuesto por Parker y Rees [130]:

$$QY_{muestra} = \left( \frac{F_{muestra}}{F_{ref}} \right) \left( \frac{A_{ref}}{A_{muestra}} \right) \left( \frac{n_{muestra}^2}{n_{ref}^2} \right) QY_{ref} \quad (20)$$

donde  $F$  es el área bajo el espectro de emisión en unidades de frecuencia ( o número de onda),  $A$  es el valor de absorbancia a la longitud de onda de excitación y  $n$  es el índice de refracción. Una disolución de rodamina B en etanol fue utilizada como referencia ( $QY = 0,73$  [2]). La Figura 40 muestra los espectros de emisión fotoluminiscente de rodamina B y Mn:ZnS QDs, modo fluorescencia y modo fosforescencia fijados en el equipo. Dado que la emisión fotoluminiscente de la rodamina B es del tipo fluorescente y su rendimiento cuántico está calculado como tal, la integración del espectro de emisión fotoluminiscente de Mn:ZnS QDs fue llevada a cabo teniendo en cuenta la banda de emisión fluorescente aislada, utilizando filtros adecuados, a longitudes de onda largas correspondiente a la transición  ${}^4T_1-{}^6A_1$  del  $Mn^{+2}$  (según superposición con el espectro fosforescente). El valor determinado para el PL-QY fue 0,0003.



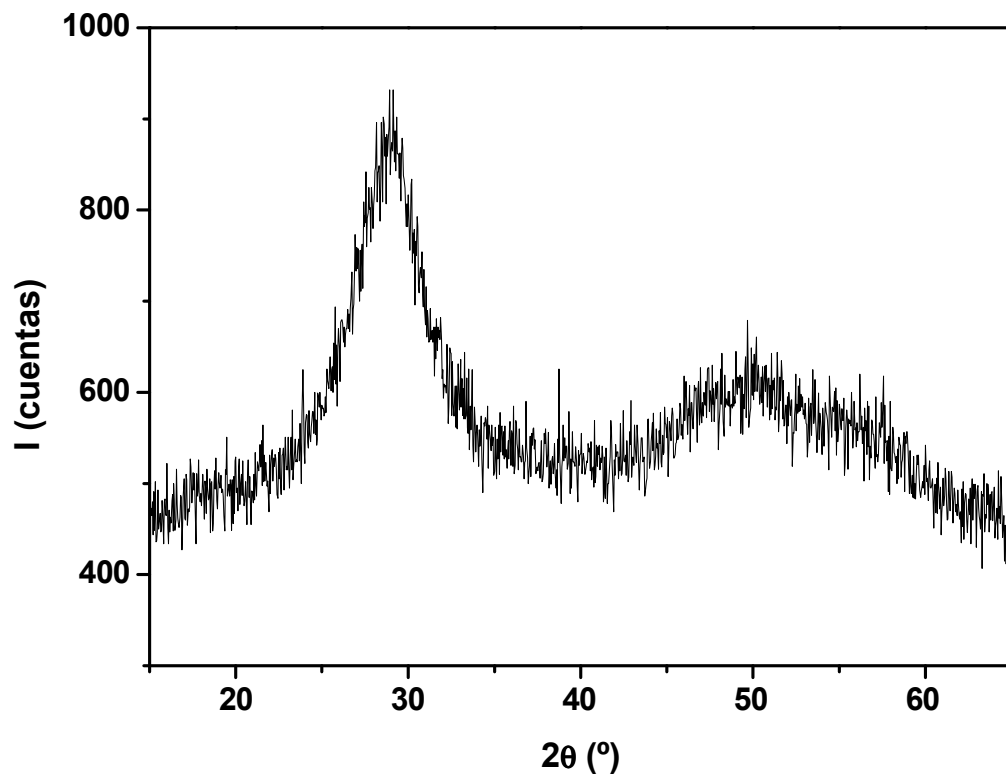
**Figura 40.** Espectros de emisión fotoluminiscente de rodamina B (RB) y Mn:ZnS QDs (QDs). Anchos de banda de excitación y emisión: 7,5 nm; filtro: 515 nm cut-off

#### 3.1.4. Tamaño cristalino

El difractograma del Mn:ZnS QDs se muestra en la Figura 41; la naturaleza ensanchada del mismo confirma la formación de nanopartículas de tamaño pequeño. A fin de estimar el tamaño cristalino promedio, se utilizó la ecuación de Debye-Scherrer [131]:

$$D = \frac{K \lambda}{\beta \cos \theta} \tag{21}$$

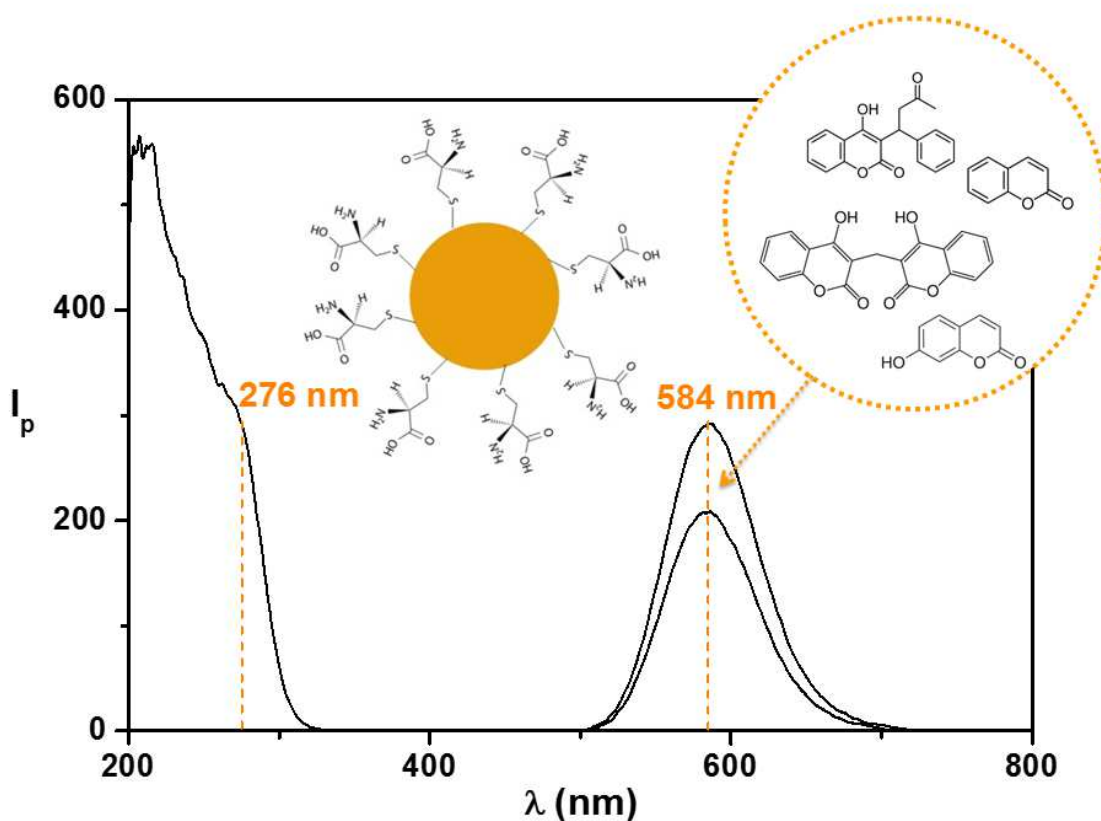
donde  $\lambda$  es la longitud de onda de rayos X del borde  $K_{\alpha}$  del Cu (0,15406 nm),  $\beta$  es el ancho de banda medio del pico más prominente en radianes,  $\theta$  es el ángulo de difracción de Bragg y  $K$  puede tomarse como 0,9 para partículas esféricas. El tamaño cristalino promedio estimado para Mn:ZnS QDs fue 2,7 nm.



---

**Figura 41.** Difractograma para Mn:ZnS QDs

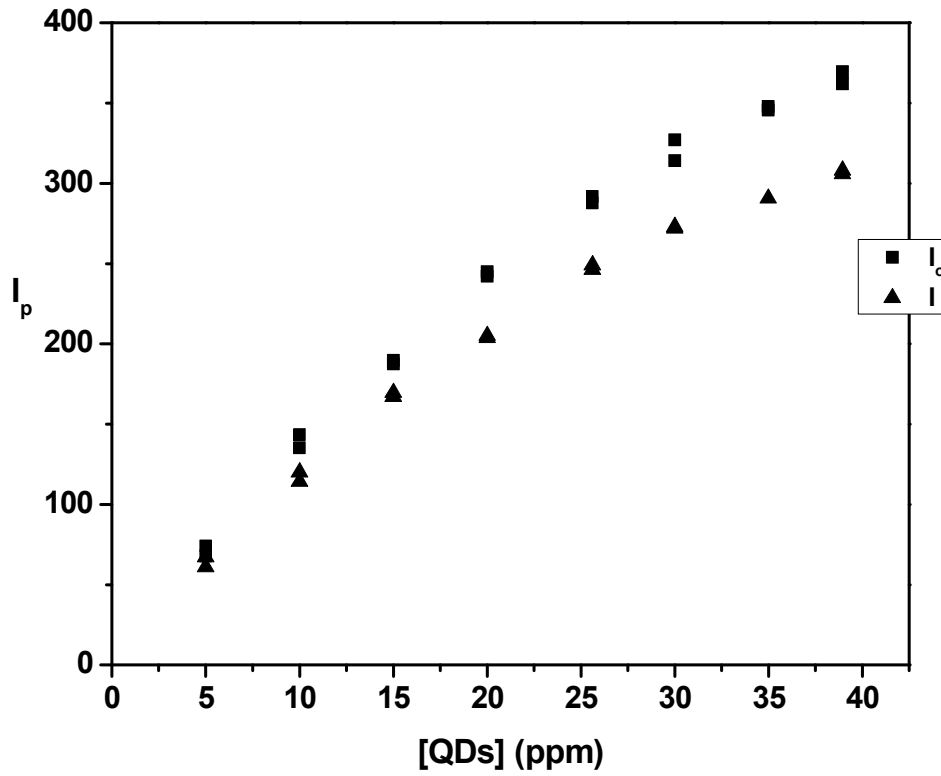
3.2. Quantum dots de ZnS dopados con Mn recubiertos con L-cisteína: Interacción con cumarinas



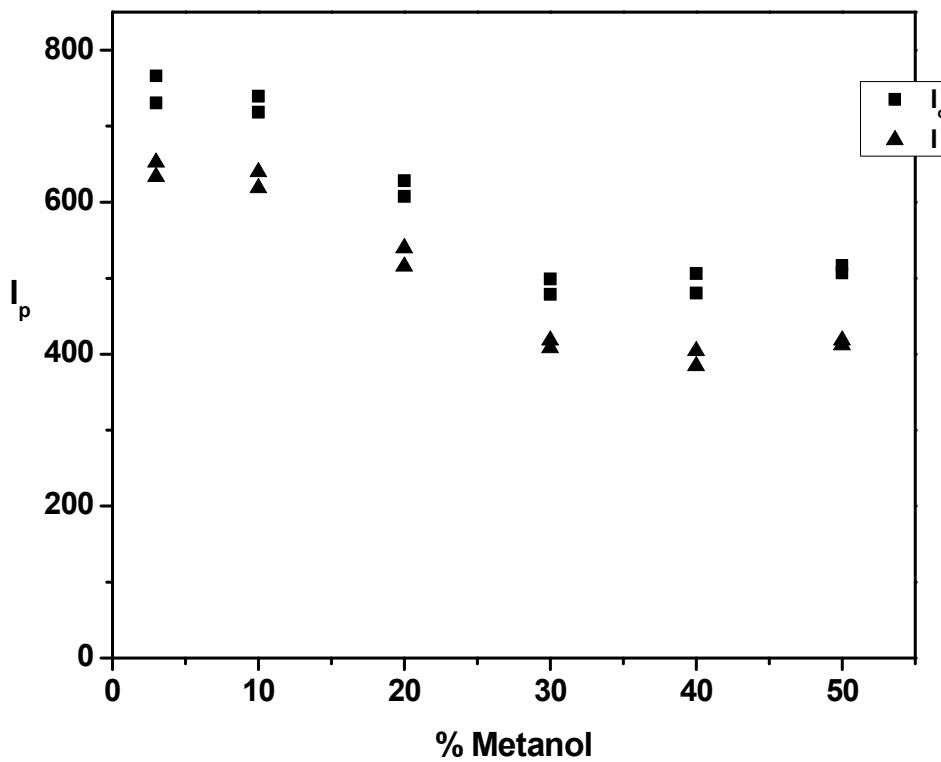
**Figura 42.** Resumen gráfico: Quantum dots de ZnS dopados con Mn recubiertos con L-cisteína. Interacción con cumarinas

Las propiedades fotoluminiscentes de los QDs dependen fuertemente de la interacción entre su superficie y las diferentes especies químicas [124, 128]. La sensibilidad a los cambios en su superficie y su entorno es la base para el desarrollo de novedosos sensores ópticos. En esta línea, el presente trabajo de tesis doctoral propone el posible sensado óptico de las cumarinas, en estado líquido, en términos de su interacción con los Mn:ZnS QDs.

La adición de cantidades crecientes de cumarinas a disoluciones de Mn:ZnS QDs ha dado lugar a un quenching eficiente de la RTPL. Se ha llevado a cabo la optimización de la concentración de QDs (Figura 43) a fin de obtener la mayor diferencia entre las intensidades de fosforescencia en presencia y ausencia de cumarinas ( $I_0-I$ ). La warfarina ha sido utilizada como cumarina modelo. Bajo las condiciones estudiadas, la concentración óptima de QDs hallada fue 20 ppm, alcanzando una relación de compromiso entre la mayor diferencia ( $I_0-I$ ) y sus valores de absorbancia –efectos de filtro interno-. El porcentaje de metanol se optimizó para el caso de la warfarina, dando lugar a un valor óptimo de 8 % v/v (Figura 44).



**Figura 43.** Optimización de la concentración de Mn:ZnS QDs  
 [war] =  $3,00 \times 10^{-5}$  M; 8 % v/v metanol; buffer pH 7,4



**Figura 44.** Optimización del contenido de metanol  
 [QDs] = 20 ppm; [war] =  $3,00 \times 10^{-5}$  M; buffer pH 7,4

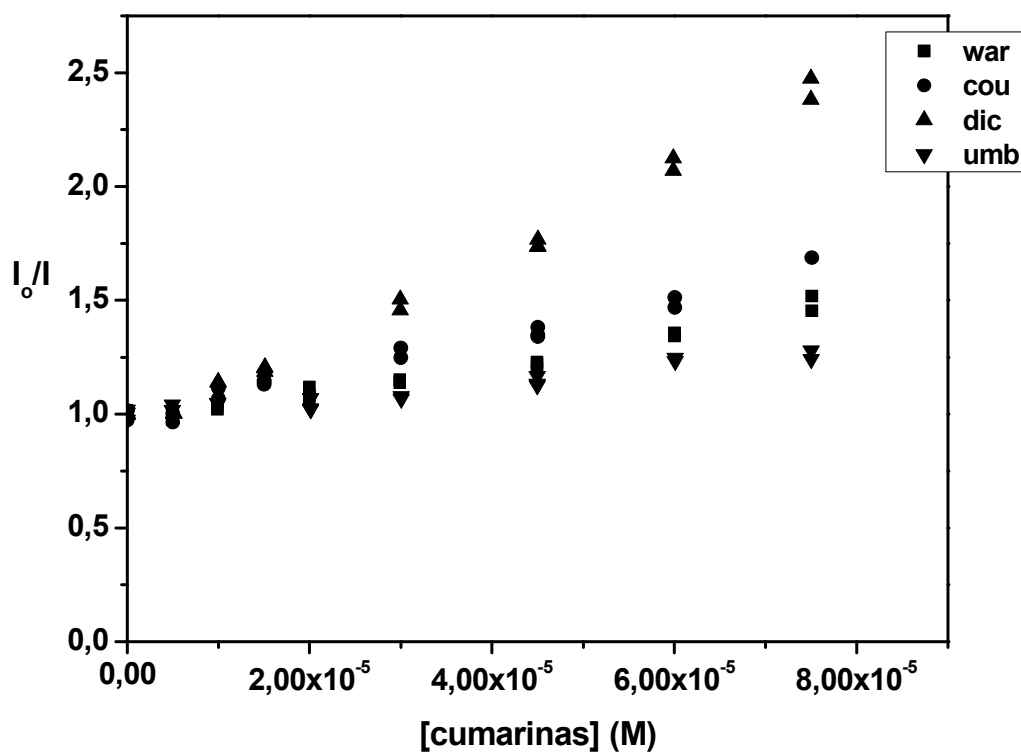
El quenching de la RTP observado puede ser explicado en términos de la clásica ecuación de Stern-Volmer (Figura 45). Los datos experimentales son duplicados al mismo nivel de concentración obtenidos de disoluciones independientes, exceptuando los extremos y puntos centrales donde son triplicados. Tal como se ha demostrado en el Capítulo II, existen notables diferencias entre las medidas de RTP utilizando geometría de iluminación a 90° y geometría de iluminación frontal cuando se utilizan cumarinas debido a efectos de filtro interno. A fin de evitarlos, todas las medidas se realizaron utilizando geometría de iluminación frontal. La leve curvatura observada en las figuras se explica en términos de las características de absorción de los compuestos estudiados (Tabla 10); a medida que la concentración aumenta, los efectos de filtro interno se tornan cada vez más importantes e incluso utilizando la geometría de iluminación frontal se observa una pérdida de linealidad. La Tabla 11 resume los valores de la constante de Stern-Volmer ( $K_{SV}$ ) para cada compuesto, obtenidas de las representaciones gráficas de la ecuación de Stern-Volmer en el intervalo lineal.

El mecanismo de quenching se discute en la siguiente sección pero en esta instancia, la interacción entre los QDs y las cumarinas parece ser una potencial metodología para el sensado óptico de las mismas.

	$\epsilon$ ( $M^{-1} cm^{-1}$ ) 276 nm	Incertidumbre estándar combinada*
<b>war</b>	9433	238
<b>cou</b>	11100	168
<b>dic</b>	10117	189
<b>umb</b>	3537	197

**Tabla 10.** Coeficientes de extinción molar

\*Desviación estándar estimada igual a la raíz cuadrada positiva de la varianza total obtenida por combinación de todas las incertidumbres de los componentes utilizando la ley de propagación de la incertidumbre



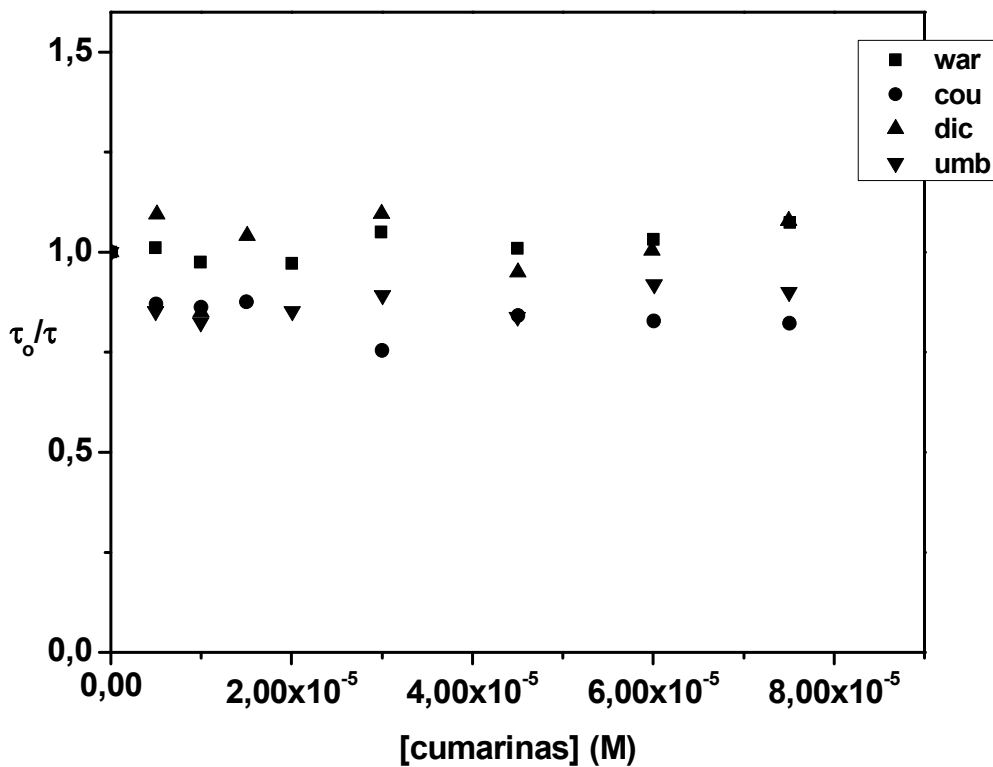
**Figura 45.** Representación gráfica de la ecuación de Stern-Volmer a concentraciones variables de warfarina (■), cumarina (●), dicumarol (▲) y umbeliferona (▼). [QDs] = 20 ppm

	$K_{SV} (M^{-1})$
QDs:war	$4937 \pm 583$
QDs:cou	$7967 \pm 631$
QDs:dic	$16865 \pm 961$
QDs:umb	$3547 \pm 529$

**Tabla 11.** Constantes de Stern-Volmer

### 3.2.1. Determinación del mecanismo de quenching

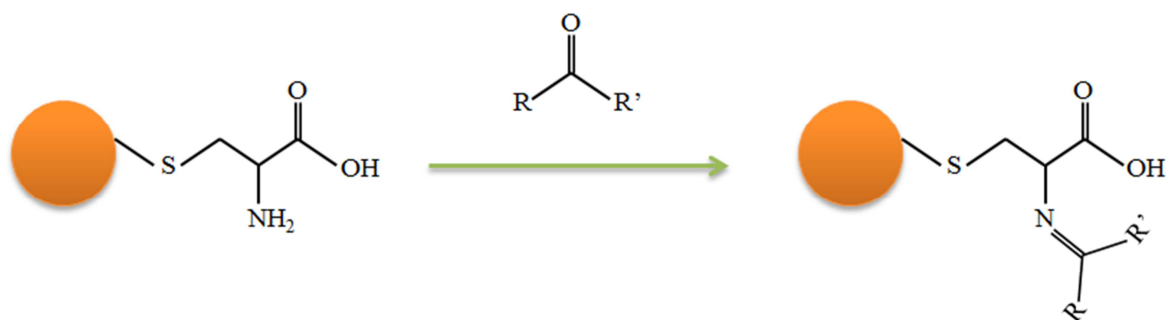
A fin de confirmar el mecanismo de quenching involucrado (Capítulo II, sección 3.2.1.), se midieron los tiempos de vida de fosforescencia utilizando geometría de iluminación frontal, tiempos de medida de 1,00 ms y de demora variables y longitudes de onda de excitación y emisión de 276 y 584 nm, respectivamente. Las curvas de decaimiento se ajustaron a una función exponencial doble con dos componentes, el primero ( $\tau_1$ ) dentro de los 0,7 ms y el segundo ( $\tau_2$ ) alrededor de 2,7 ms. Para Mn:ZnS QDs, el primer componente se atribuye a distintos procesos como la desactivación fluorescente del ZnS o los iones  $Mn^{+2}$  superficiales (expuestos). El segundo componente, más lento, se relaciona a la emisión a través de los niveles de energía del dopante [126]. Dado que se analiza la emisión fosforescente, se toma en cuenta el segundo componente del decaimiento.



**Figura 46.** Representación gráfica de la ecuación de Stern-Volmer en términos de los tiempos de vida a concentraciones variables de warfarina (■), cumarina (●), dicumarol (▲) y umbeliferona (▼). [QDs] = 20 ppm

La Figura 46 muestra las representaciones gráficas de la ecuación de Stern-Volmer en términos de los tiempos de vida para el quenching de la RTP de los QDs. Puede notarse que existe una variación despreciable en la relación  $\tau_0/\tau$  con la concentración de quencher, indicando que el mecanismo de quenching es estático (Capítulo II, sección 3.2.1). Una posible explicación para la observación de un quenching estático en el sistema en estudio es la formación de un complejo imina entre el grupo carbonilo de las cumarinas y el grupo amino de la L-cys (Figura 47) [129].





**Figura 47.** Posible formación de imina entre el grupo amino de L-cys en el QD y el grupo carbonilo de las cumarinas

### 3.2.2. Determinación de warfarina mediante quenching de fosforescencia de quantum dots de ZnS dopados con Mn

La muestra, pre-tratada según 2.5., fue analizada por triplicado a tres niveles de concentración.

Se realizaron los correspondientes ensayos de correlación y falta de ajuste para la curva de calibración (Tabla 12), se determinó la exactitud y precisión del método (Tabla 13) como así también las cifras de mérito de la metodología propuesta (Tabla 14) -Anexo I-. La Figura 48 muestra la representación gráfica de los residuos.

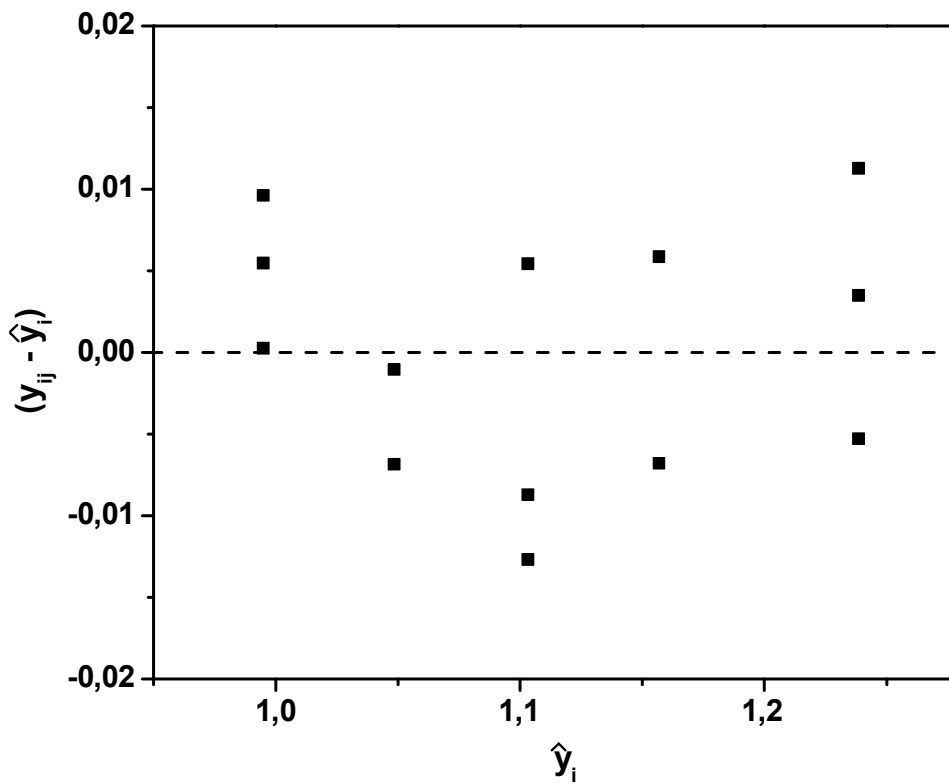
La concentración de warfarina hallada fue de  $4,9 \pm 0,1$  mg/comprimido. Dicho valor concuerda en buena medida con el valor reportado por el laboratorio y cumple con los requerimientos de la USP36-NF31 (las tabletas de warfarina sódica deben contener no menos del 95,0 % y no más del 105,0 % de la cantidad reportada) [107]. No se observó interferencia por parte de los excipientes.

FV	SC	$\phi$	CM	F <sub>calc</sub>	F <sub>crit</sub>
R	0,10137079	1	0,10137079	1766,60423	5,32
FA	0,00022514	3	$7,5047 \times 10^{-5}$	1,30785999	4,07
E	0,00045905	8	$5,7382 \times 10^{-5}$		
T	0,10205498	12			

**Tabla 12.** ANAVA

Ensayo correlación:  $F_{\text{calc}} > F_{\text{crit}}$ , se rechaza  $H_0$ , existe correlación entre las variables

Ensayo falta de ajuste:  $F_{\text{calc}} < F_{\text{crit}}$ , se acepta  $H_0$ , no hay falta de ajuste –el modelo lineal propuesto es el adecuado-



**Figura 48.** Representación gráfica de los residuos de la regresión

Puede verse que la distribución de los residuos es al azar y la variabilidad interna de las réplicas a cada nivel de concentración es comparable a la variabilidad global

Concentración	Exactitud		Precisión
	t calculado	t tabla	$C_v$ (%)
$1,00 \times 10^{-5} \text{ M}$	0,539		9,69
$2,00 \times 10^{-5} \text{ M}$	0,969	4,303	9,23
$4,50 \times 10^{-5} \text{ M}$	0,661		3,36

**Tabla 13.** Exactitud y precisión del método a tres niveles de concentración

Exactitud:  $t_{\text{calc}} < t_{\text{tabla}}$ , se acepta  $H_0$ , el método es exacto en los niveles de concentración estudiados

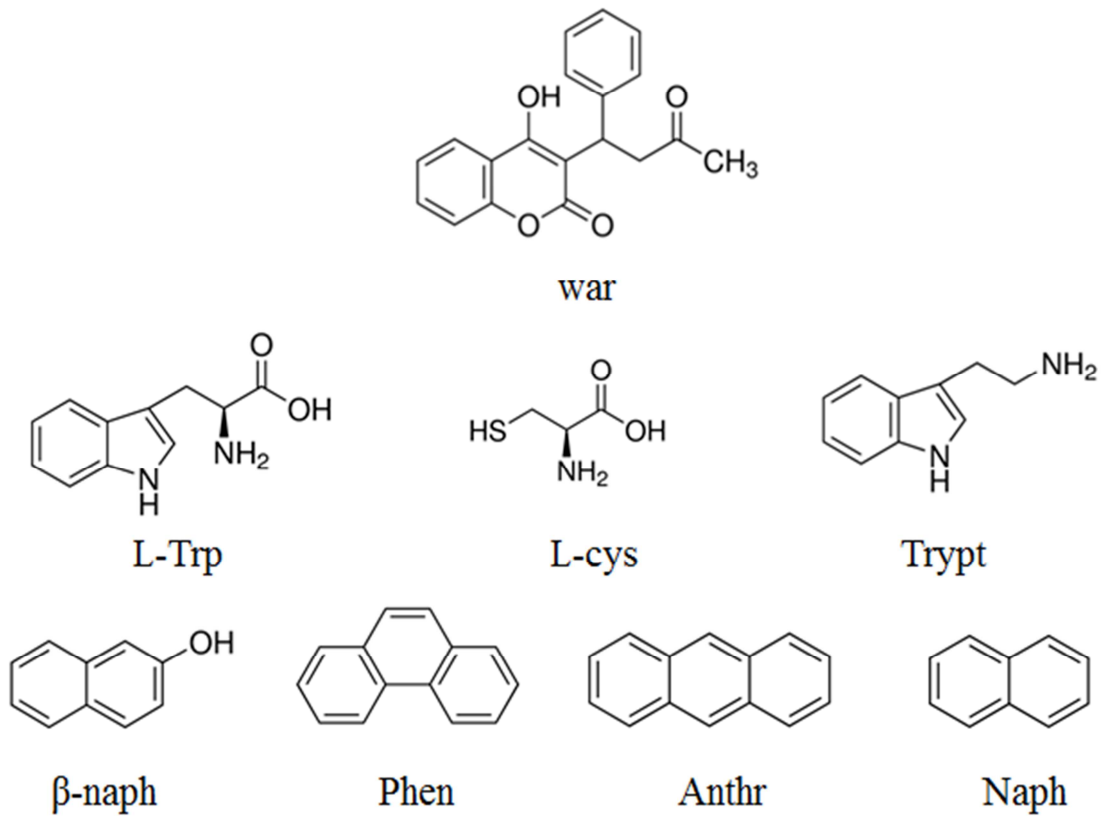
Precisión:  $C_v < 15 \%$ , el método es preciso en los niveles de concentración estudiados

$I_0/I = a + b[\text{war}]$			
<b>a</b>	0,995	<b>s<sub>a</sub></b>	0,004
<b>b</b>	5417 M <sup>-1</sup>	<b>s<sub>b</sub></b>	134 M <sup>-1</sup>
<b>s<sub>y/x</sub></b>	0,008		
<b>r</b>	0,997		
<b>SEN</b>	5417 M <sup>-1</sup>		
<b>γ</b>	6,87x10 <sup>5</sup> M <sup>-1</sup>		
<b>LOD</b>	4,71x10 <sup>-6</sup> M		
<b>LOQ</b>	1,07x10 <sup>-5</sup> M		
<b>Intervalo dinámico</b>	4,71x10 <sup>-6</sup> M – 4,50x10 <sup>-5</sup> M		
<b>Intervalo lineal</b>	1,07x10 <sup>-5</sup> M – 4,50x10 <sup>-5</sup> M		

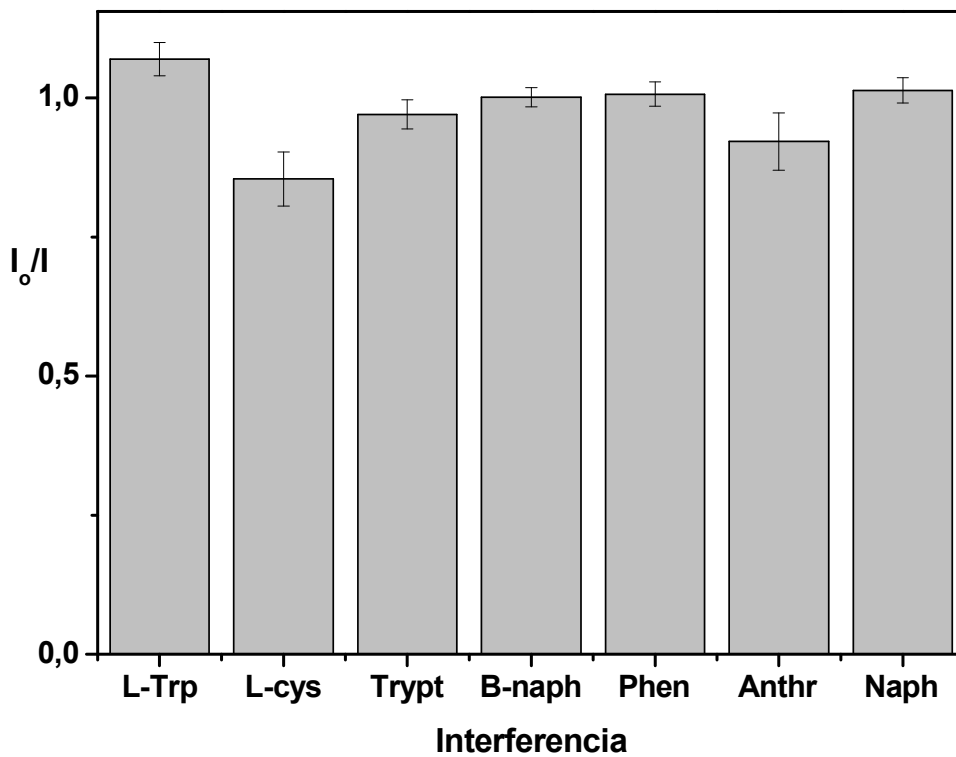
**Tabla 14.** Cifras de mérito para la metodología analítica propuesta

### 3.2.2.1. Selectividad

La respuesta de los Mn:ZnS QDs a otras moléculas (interferencias, Figura 49) fue examinada a fin de evaluar la selectividad de los QDs hacia la warfarina. La intensidad de RTP de los QDs más warfarina en presencia (I) y ausencia (I<sub>0</sub>) de la interferencia fue medida utilizando una concentración equimolar de warfarina e interferencia. La Figura 50 muestra la variación en la relación I<sub>0</sub>/I para las distintas moléculas evaluadas. Como puede observarse, los Mn:ZnS QDs exhiben una alta selectividad hacia la warfarina: la relación I<sub>0</sub>/I es aproximadamente la unidad en presencia de las moléculas concomitantes.



**Figura 49.** Estructura molecular de la warfarina (war) y las interferencias estudiadas: L-triptofano (L-Trp), L-cisteína (L-cys), triptamina (Trypt),  $\beta$ -naftol ( $\beta$ -naph), fenantreno (Phen), antraceno (Anthr) y naftaleno (Naph)



**Figura 50.** Intensidad de RTP de los QDs más warfarina en presencia (I) y ausencia (I<sub>0</sub>) de interferencias. [QDs] = 20 ppm; [war] = [interferencia] = 2,00 x 10<sup>-5</sup> M; buffer pH 7,4/metanol (8 % v/v)

#### 4. Conclusiones

Los quantum dots (QDs) de ZnS dopados con Mn (Mn:ZnS) han atraído una especial atención como sensores fotoluminiscentes. El dopaje con  $Mn^{+2}$  promueve una emisión del tipo fosforescente, permitiendo el desarrollo de novedosas fases sensoras altamente selectivas. Siguiendo esta línea, se ha desarrollado un sensor fosforescente de cumarinas basado en el quenching de la fosforescencia a temperatura ambiente en estado líquido de los QDs de Mn:ZnS, solubles en agua. Se han medido los tiempos de vida de fosforescencia a fin de esclarecer el mecanismo de quenching involucrado, resultando en un mecanismo estático. Se ha llevado a cabo la determinación cuantitativa de warfarina en productos farmacéuticos, obteniendo buenas cifras de mérito. La metodología analítica desarrollada es un método alternativo, rápido, simple, sensible y selectivo para la determinación de cumarinas en muestras farmacéuticas.

##### 4.1 Posibilidad de desarrollar un optosensor

Los quantum dots de ZnS dopados con Mn han demostrado ser un buen sensor fosforescente a temperatura ambiente en estado líquido para las diversas cumarinas estudiadas. El mecanismo de respuesta es rápido y sensible por lo que se considera pueden constituir potenciales fases sensoras. El Capítulo IV se centra en la inmovilización de los quantum dots sobre matrices poliméricas a fin de desarrollar métodos de detección dinámicos, específicamente, de análisis por inyección en flujo (FIA).

El trabajo desarrollado en el presente capítulo ha dado lugar a una publicación en la revista “Sensors & Actuators: B. Chemical” [Sensors and Actuators B 238 (2017) 660-666].

Sensors and Actuators B 238 (2017) 660–666



Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Sensors and Actuators B: Chemical

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/snb](http://www.elsevier.com/locate/snb)



#### Mn-doped ZnS phosphorescent quantum dots: Coumarins optical sensors



Maria E. Pacheco\*, Cecilia B. Castells, Liliana Bruzzone

Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Métodos Analíticos (LIDMA), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Calle 47 esq. 115, 1900 La Plata, Argentina

---

*Parte II*

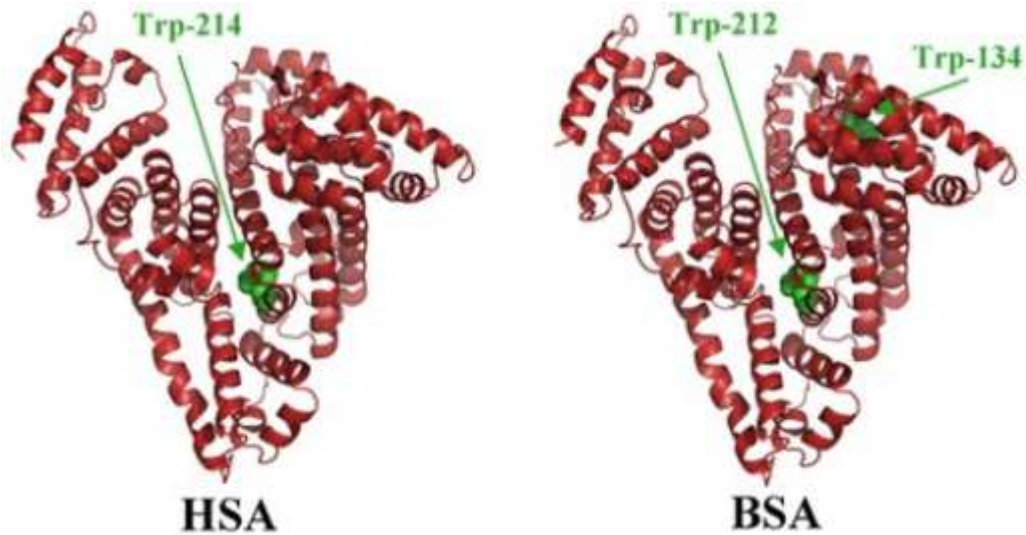
## 1. Introducción

Los quantum dots de ZnS dopados con Mn (Mn:ZnS QDs), recubiertos con L-cisteína, han demostrado características fotoluminiscentes óptimas como sensores ópticos de cumarinas en estado líquido a temperatura ambiente y un prometedor uso en el desarrollo de fases sensoras por medio de su inmovilización en matrices poliméricas.

La utilización de los QDs en bioanálisis requiere, además de la ausencia de iones metálicos tóxicos, que el recubrimiento de los mismos sea biocompatible y le otorgue solubilidad en agua. Siguiendo esta línea, las biomacromoléculas pueden ser una alternativa viable en la síntesis de esta clase de QDs.

La seroalbúmina humana (HSA) es la proteína más abundante del plasma, con una concentración normal en sangre de 50 g/L. Es, probablemente, la proteína más estudiada. Basados en la estructura cristalina de la HSA, ésta se compone de tres dominios homólogos (I, II y III), subdivididos en dos dominios (A y B). Muchos solutos de bajo peso molecular muestran una unión reversible con la HSA, incluyendo agentes endógenos (cadenas largas de ácidos grasos, esteroides, bilirrubina, entre otros) y compuestos exógenos (salicilato, diazepam y warfarina, entre otros). La unión de estas sustancias a la HSA ocurre en regiones de la proteína relativamente bien definidas. Para los fármacos, las dos regiones más importantes de unión son los sitios de Sudlow I y II, comúnmente denominados sitios de warfarina-azapropazone y de indol-benzodiazepina, respectivamente, debido a la afinidad por solutos pertenecientes a dichos grupos de compuestos. El sitio I de Sudlow se encuentra en el subdominio IIA de la HSA y se une específicamente a la warfarina y a cumarinas, como así también al salicilato y otros fármacos relacionados. El sitio II de Sudlow se localiza en el dominio IIIA de la HSA e interactúa con agentes tales como el L-triptófano, diazepam y naproxeno [132].

Las propiedades y modos de unión de la interacción fármaco-proteína en distintas albúminas han sido estudiadas por Kosa y colaboradores utilizando aquellos que se unen específicamente a los sitios I (warfarina, fenilbutazona) y II (ibuprofeno, diazepam) de la HSA [133]. Dada la similitud estructural entre la albúmina humana y las albúminas de distintos mamíferos, es de esperar que los sitios de unión sean análogos. Se ha encontrado que las afinidades de unión de los sitios I para la albúmina bovina (BSA) son similares a las correspondientes a la humana y que las diferencias encontradas en los modos de unión pueden deberse a las pequeñas variaciones en el microentorno de los mismos. El sitio I contiene un área de unión warfarina-azapropazone que consiste en dos sitios de unión solapados para ambas moléculas; el triptófano 214 (Trp-214), único residuo de Trp en la HSA, se encuentra en la región no solapada del sitio de unión de la warfarina –sitio I de Sudlow, subdominio IIA- [134]. En el caso de la BSA, el sitio de unión de la warfarina es distinto al de la azapropazone; la BSA posee dos residuos de Trp: Trp-212 en el subdominio IIA (sitio I de Sudlow) y Trp-134 en el subdominio IB [135].



**Figura 51.** Estructura molecular de las seroalbúminas humana y bovina donde se muestran los residuos de triptofano

Dadas las características de unión de las albúminas con las cumarinas en el sitio I de Sudlow y la analogía entre HSA y BSA, se propone la utilización de BSA y BSA desnaturalizada (dBSA) como recubrimiento alternativo para los QDs. La dBSA es una biomacromolécula que contiene 37 grupos tioles por monómero y puede prepararse a partir de la reducción química de la BSA, la cual posee 17 puentes disulfuro.



## 2. Metodología

### 2.1. Seroalbúmina bovina desnaturalizada

Se llevó a cabo la preparación de la seroalbúmina bovina desnaturalizada (dBSA) siguiendo el procedimiento descrito por Wang y colaboradores [136].

La dBSA fue preparada tratando la BSA (Cohn-Analog,  $\geq 98\%$ : Sigma-Aldrich) con  $\text{NaHB}_4$  (Merck). Se disolvieron 0,165 g de BSA en 50,0 mL de agua bidestilada; se adicionaron 0,0042 g de  $\text{NaHB}_4$  (reductor) y se mantuvo la disolución a 20 °C durante una hora bajo agitación magnética. Luego, se elevó la temperatura a 60-80 °C hasta que no se observó más generación de  $\text{H}_2$ . Bajo estas condiciones, se desnaturaliza la BSA y la mayoría de sus puentes disulfuro son convertidos en grupos sulfhidrilos, siendo la concentración final de la disolución acuosa de dBSA  $5,00 \times 10^{-5}$  M.

### 2.2. Mn:ZnS QDs recubiertos con dBSA

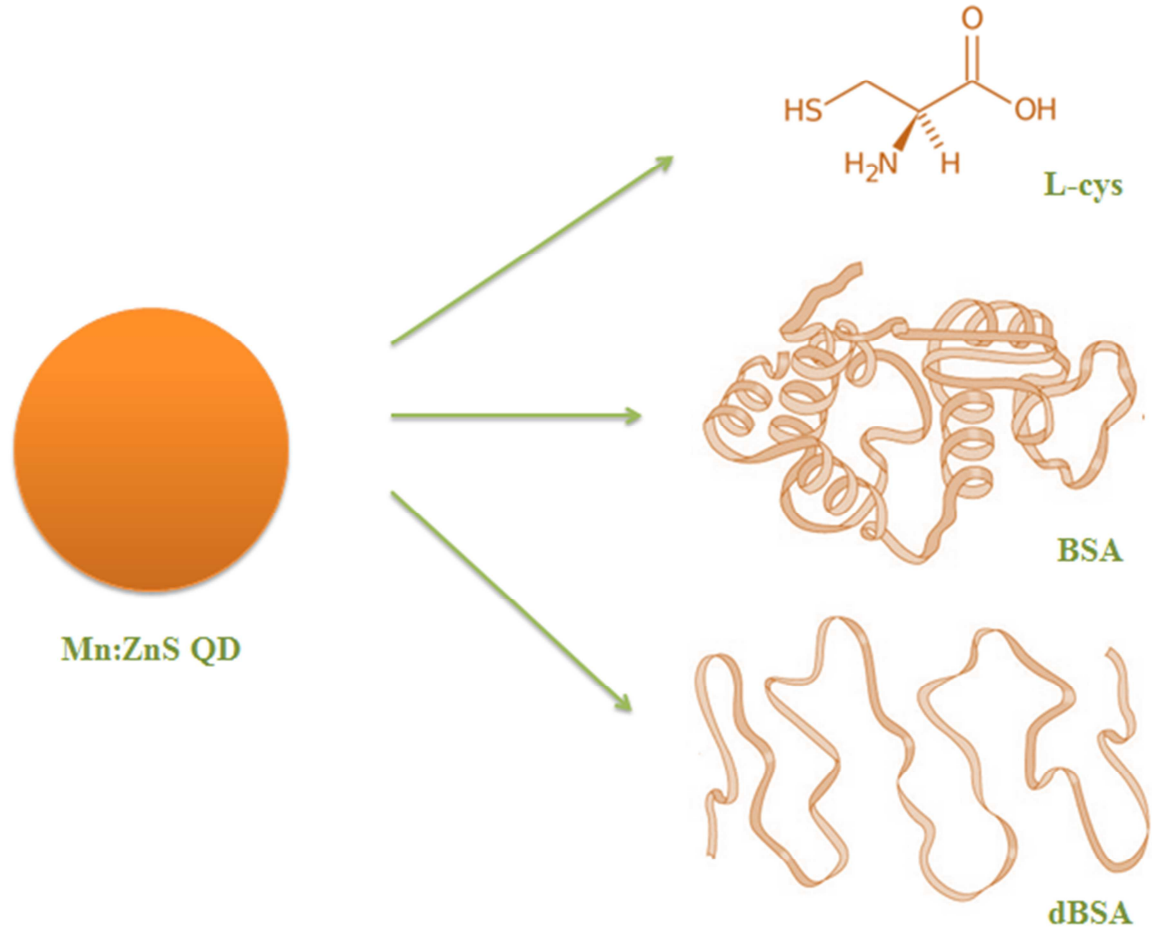
Los QDs sintetizados (Parte I, sección 2.3) fueron redissueltos en una cantidad medida de la disolución de dBSA descrita anteriormente. La disolución resultante fue incubada a 60-80 °C durante 15 minutos y se llevó a volumen con buffer fosfato de pH 7,4 (Parte I, sección 2.1) a fin de obtener la concentración deseada (relación 4:1 p/v dBSA:QD). Se mantuvo a temperatura ambiente durante tres días.

### 2.3. Mn:ZnS QDs recubiertos con BSA

Los QDs sintetizados (Parte I, sección 2.3) fueron redissueltos en una cantidad medida de una disolución acuosa de BSA  $5,00 \times 10^{-5}$  M. La disolución resultante fue incubada a temperatura ambiente durante 15 minutos y se llevó a volumen con buffer fosfato de pH 7,4 (Parte I, sección 2.1) a fin de obtener la concentración deseada (relación 4:1 p/v BSA:QD). Se mantuvo a temperatura ambiente durante tres días.

### 3. Resultados y discusión

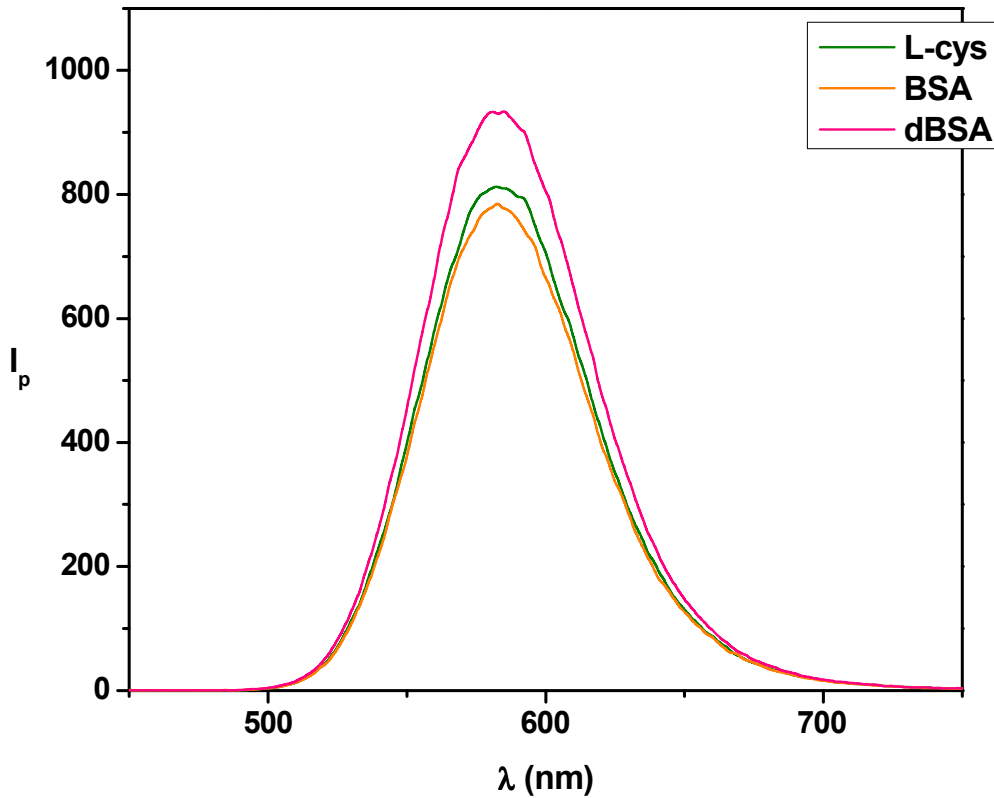
#### 3.1. Mn:ZnS QDs recubiertos con L-cys, BSA y dBSA



**Figura 52.** Resumen gráfico: Mn:ZnS QDs recubiertos con L-cys, BSA y dBSA

##### 3.1.1. Espectros de emisión fotoluminiscente

La Figura 53 muestra los espectros de emisión fotoluminiscente de disoluciones de Mn:ZnS QDs recubiertos con L-cys, BSA y dBSA en buffer fosfato de pH 7,4. Como puede verse, no se observan modificaciones en la forma de los espectros al cambiar el agente de recubrimiento.



**Figura 53.** Espectros de emisión de Mn:ZnS QDs recubiertos con L-cys, BSA y dBSA  
 [QDs] = 20 ppm; buffer fosfato pH 7,4

### 3.1.2. Interacción con cumarinas

A fin de seleccionar el recubrimiento más adecuado para la detección de las cumarinas, se estudió su interacción con los Mn:ZnS QDs recubiertos con L-cys, BSA y dBSA. Se empleó a la warfarina como cumarina modelo.

La adición de concentraciones crecientes de warfarina a una disolución de los QDs ha dado lugar a un quenching de la RTPL que pudo evaluarse a partir de la representación gráfica de la ecuación de Stern-Volmer (Figura 54). La Tabla 15 resume los valores de las constantes de Stern-Volmer hallados.

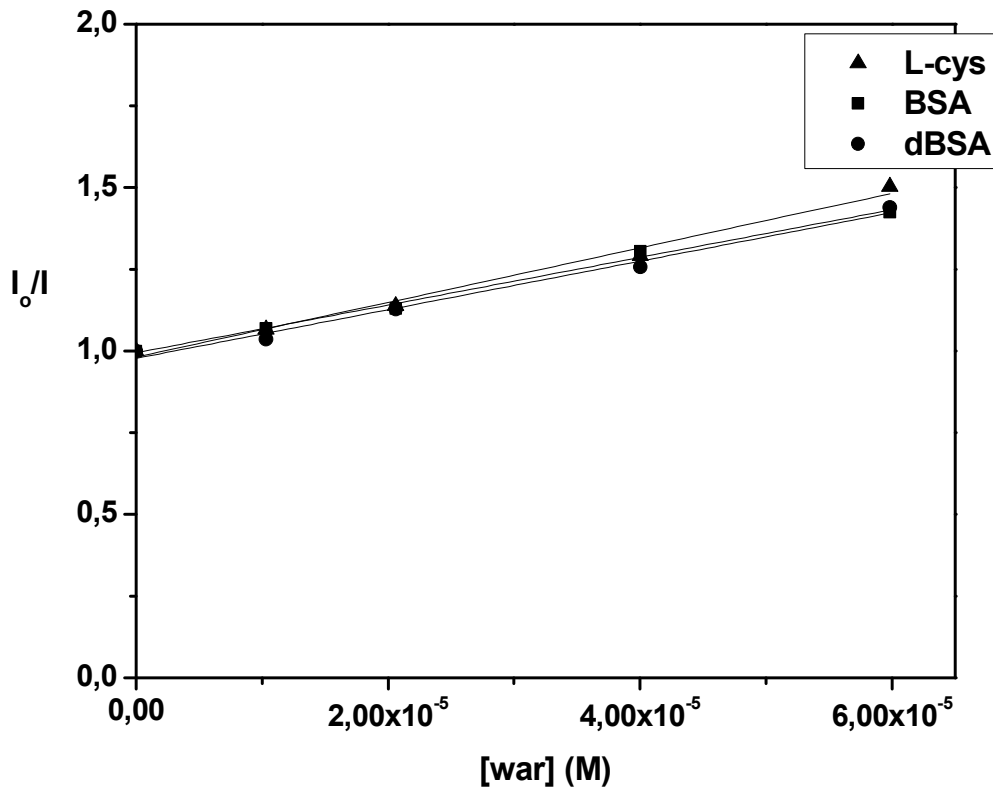


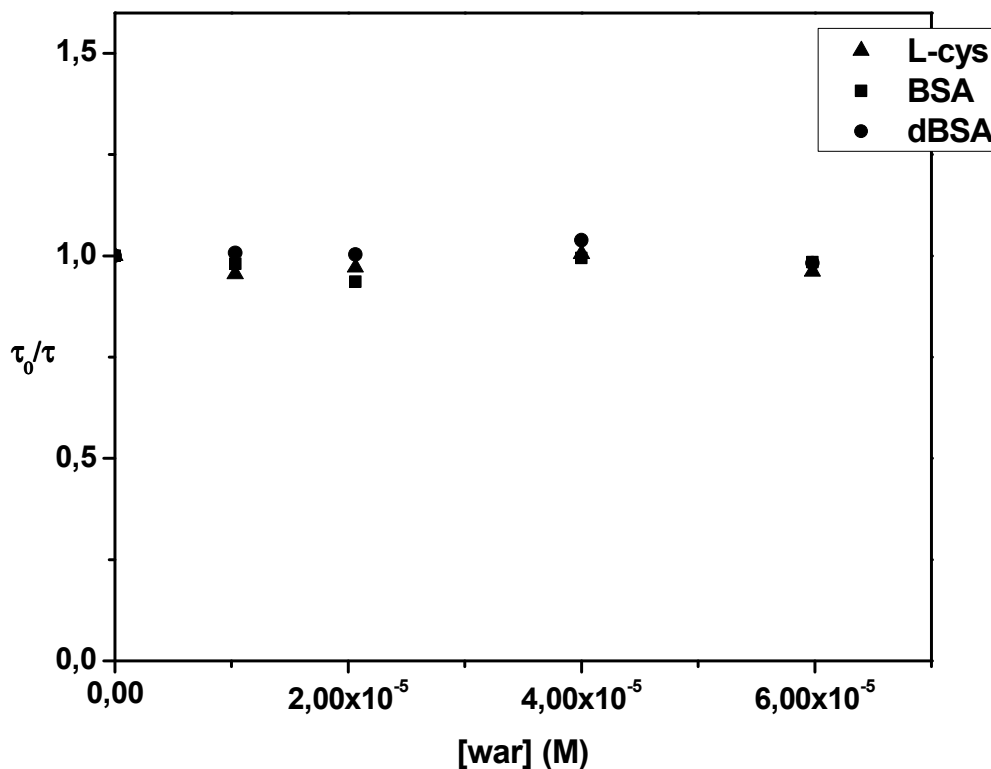
Figura 54. Representación gráfica de la ecuación de Stern-Volmer

	$K_{sv} (M^{-1})$
<b>L-cys</b>	$8350 \pm 976$
<b>BSA</b>	$7298 \pm 604$
<b>dBSA</b>	$7436 \pm 922$

Tabla 15. Constantes de Stern-Volmer

A fin de confirmar el mecanismo de quenching involucrado (Capítulo II, sección 3.2.1.), se midieron los tiempos de vida de fosforescencia utilizando geometría de iluminación frontal, tiempos de medida de 1,00 ms y de demora variables y longitudes de onda de excitación y emisión de 276 y 584 nm, respectivamente. Las curvas de decaimiento se ajustaron a una función exponencial doble con dos componentes, el primero ( $\tau_1$ ) dentro de los 0,5 ms y el segundo ( $\tau_2$ ) alrededor de 2,6 ms. Dado que se analiza la emisión fosforescente, se toma en cuenta el segundo componente del decaimiento. La Figura 55 muestra las representaciones gráficas de la ecuación de Stern-Volmer en términos de los tiempos de vida para el quenching de la RTPL de los QDs. Puede notarse que existe una variación despreciable en

la relación  $\tau_0/\tau$  con la concentración de quencher para los tres recubrimientos, indicando que el mecanismo de quenching es estático (Capítulo II, sección 3.2.1). En los QDs con L-cys, puede explicarse en términos de la formación de una imina (Parte I, sección 3.2.1); en el caso de las biomacromoléculas, la unión de la warfarina en el sitio I de Sulfolow (o al correspondiente residuo de Trp en la dBSA) daría lugar a un cambio en los estados superficiales de los QDs resultando en un quenching de la RTPL producto de la formación de un complejo no fosforescente.



**Figura 55.** Representación gráfica de la ecuación de Stern-Volmer en términos de los tiempos de vida a concentraciones variables de warfarina. [QDs] = 20 ppm

De los resultados obtenidos, se puede notar que los tres recubrimientos se comportan de manera análoga: se observa el mismo mecanismo de quenching y los valores para las constantes de asociación parecen no diferir.

Se realizó un test de comparación de pendientes a fin de verificar si los valores de la Tabla 15 difieren o no significativamente entre sí (Anexo I). Como puede verse en la Tabla 16, los valores calculados para el estadístico t son menores al valor crítico, por lo que las pendientes no difieren entre sí al nivel de significación  $\alpha = 0,05$ .

	$t_{\text{exp}}$	$t_{\text{tabla}}$
<b>Lcys-BSA</b>	1,833	2,447
<b>Lcys-dBSA</b>	1,363	2,447
<b>BSA-dBSA</b>	0,249	2,447

**Tabla 16.** Test de comparación de pendientes

#### 4. Conclusiones

Se evaluaron tres recubrimientos biocompatibles para los quantum dots de ZnS dopados con Mn: L-cisteína, seroalbúmina bovina y seroalbúmina bovina desnaturalizada. El comportamiento de las biomacromoléculas como agentes de recubrimiento fue análogo al estudiado en la Parte I del presente capítulo con L-cisteína: se observó la existencia de un mecanismo de quenching estático al interaccionar los QDs con las cumarinas (warfarina), con un tiempo de respuesta rápido. Dado que las pendientes de las curvas de calibración no difieren significativamente entre sí, la sensibilidad alcanzada con los tres recubrimientos es la misma por lo que cualesquiera de las tres opciones es viable para el desarrollo de las fases sensoras inmovilizadas sobre matrices poliméricas.

*Inmovilización de quantum dots:  
desarrollo de fases sensoras*



## 1. Introducción

Las excelentes propiedades optoelectrónicas que muestran los quantum dots (QDs), junto con las mejoras logradas en el proceso de solubilización de los mismos en medios acuosos, han permitido el desarrollo de un gran número de aplicaciones analíticas donde son utilizados en forma de dispersión coloidal (Capítulo III). En particular, los QDs de ZnS dopados con Mn (Mn:ZnS QDs) han atraído especial atención en los últimos años debido a su potencial uso como sensores fosforescentes en estado líquido a temperatura ambiente (RTPLS) al exhibir una emisión fotoluminiscente con propiedades características de la fosforescencia sin la necesidad de utilizar medios rígidos o de protección del estado triplete, agentes desoxigenantes o inductores de la misma (Capítulo I, sección 2 - condiciones para RTPL-). Este hecho posibilita la detección en fluidos biológicos o muestras ambientales donde las clásicas medidas de fluorescencia pueden verse afectadas por interferencias debidas a la autofluorescencia o dispersión de la energía radiante por la presencia de una matriz compleja. A su vez, la sensibilidad de los estados superficiales de los Mn:ZnS QDs a la presencia de otras moléculas ha permitido la detección de analitos no fosforescentes, ampliando las posibilidades de determinación de los mismos utilizando metodologías que logren bajos límites de detección y cuantificación.

A fin de desarrollar fases sensoras selectivas y sensibles, se ha planteado la necesidad de inmovilizar los QDs en un soporte sólido sin perder sus propiedades fotoluminiscentes. El desarrollo de optosensores parece ser una alternativa viable para aumentar la selectividad de los QDs. En estos sistemas de detección dinámicos, el sólido ópticamente activo (fase sensora) se encuentra empaquetado en el interior de una celda de flujo que se coloca en el interior del compartimiento de celdas del sistema de detección (espectrofotómetro, espectrofluorómetro, etc.); este diseño implica la utilización de un sistema de análisis por inyección en flujo (FIA). En esta línea, la incorporación de los QDs en el interior de polímeros ha brindado materiales muy adecuados para el desarrollo de sensores ópticos fotoluminiscentes. En particular, la inmovilización de los QDs a partir de técnicas de impresión molecular ofrece una propiedad adicional importante a fines analíticos: el reconocimiento selectivo del analito que se pretende detectar.

Los polímeros de impresión molecular (MIPs) son matrices poliméricas sintéticas que se comportan como receptores biomiméticos artificiales resultantes de la copolimerización de monómeros funcionales y entrecruzantes en presencia de una molécula molde. Luego de la polimerización, las moléculas molde son removidas de la red tridimensional porosa mediante extracción con solvente, dejando un sitio de unión específico para la misma. Estas cavidades de reconocimiento e interacción son complementarias en tamaño, forma y funcionalidad química al analito que fue empleado como molde en la síntesis, siendo así específicas para el mismo. Dada su selectividad inherente, los MIPs han sido ampliamente utilizados en diversas áreas como ser métodos separativos, biomedicina y optosensores [137-139]. Además, presentan una serie de ventajas que ha favorecido su empleo para el desarrollo de nuevas fases sensoras fotoluminiscentes:

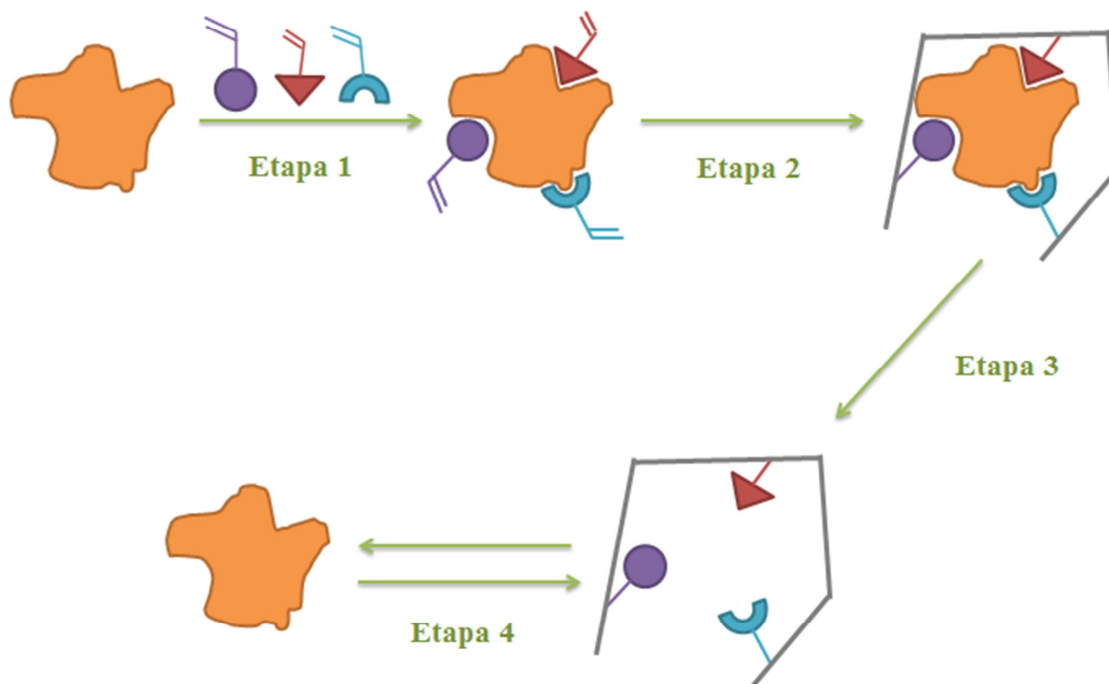
- (i) sensibilidad y la ya mencionada selectividad;
- (ii) posibilidad de desarrollo frente a diversos analitos;
- (iii) estabilidad física: resistencia mecánica, a altas presiones y temperaturas;
- (iv) estabilidad química: resistencia a diferentes condiciones de pH y solventes orgánicos;
- (v) especificidad teóricamente predecible;
- (vi) bajo costo: uso repetido sin reducción en la capacidad de reconocimiento.

Los optosensores basados en MIPs han atraído un especial interés dado que las técnicas fotoluminiscentes poseen méritos sobre las demás: alta sensibilidad y selectividad, baja o nula interferencia de las fuentes eléctricas y un potencial uso en el sensado remoto “in situ”. La incorporación de MIPs dentro de los optosensores es una metodología prometedora si se pretende aumentar la selectividad. Así, se han reportado varias metodologías en el desarrollo de sensores fosforescentes a temperatura ambiente (RTPS) para la detección selectiva de analitos basados en el empleo de MIPs (MIPs-RTPS), donde una señal estable y de intensidad apreciable es inducida por la presencia de átomos pesados o por la formación de un compuesto fosforescente. Sin embargo, la necesidad de poder detectar analitos no fosforescentes requiere de nuevas metodologías para el desarrollo de MIPs-RTPS [140]. Es así como se plantea la necesidad de modificar los MIPs a fin de obtener una señal de RTP de base y que la interacción de los analitos no fosforescentes con el mismo provoque un cambio en la señal analítica medida, positiva o negativamente, haciendo posible la detección de los mismos en forma selectiva.

El “casamiento” de la RTP de los QDs con los MIPs constituye un nuevo enfoque en el desarrollo de nuevos MIPs-RTPS. La vía más prometedora en la combinación de las propiedades fotoluminiscentes de los nanomateriales con la alta selectividad provista por los MIPs parece ser la técnica de impresión molecular sobre la superficie del mismo. Ésta permite que las cavidades de reconocimiento para la molécula molde se sitúen en la superficie del nanomaterial, o en su proximidad, proveyendo así las ventajas de alta selectividad, sitios más accesibles y cinéticas de asociación/disociación rápidas [140].

### 1.1. Síntesis de polímeros de impresión molecular

En términos generales, la técnica de impresión molecular se basa en la preparación de un polímero altamente entrecruzado en presencia del analito (molécula molde) para el cual se desea el reconocimiento selectivo. La síntesis de los mismos consta de varias etapas las cuales se esquematizan en la Figura 56.



**Figura 56.** Esquema de la síntesis de los MIPs

En la **etapa 1**, la molécula seleccionada como analito (molécula molde) se pone en contacto con los monómeros funcionales disueltos en un disolvente adecuado dando lugar a la formación de un complejo de pre-polimerización.

En la **etapa 2**, se lleva a cabo la polimerización en presencia de un exceso de agente entrecruzante. La polimerización por lo general sigue un mecanismo de propagación radicalario que puede ser inducido térmica o fotoquímicamente.

En la **etapa 3**, se extrae la molécula molde de la matriz polimérica generando de esta manera las cavidades de reconocimiento que son complementarias en forma, tamaño y funcionalidad química al analito.

En la **etapa 4**, se produce la unión de la molécula molde a las cavidades formadas. La presencia de estas cavidades hace que el polímero impreso sea capaz de reconocer y unirse de forma selectiva (efecto memoria) al analito o a otros compuestos análogos estructuralmente con gran afinidad [138].

#### 1.1.1. Proceso de impresión molecular

La impresión molecular es una técnica utilizada para sintetizar polímeros altamente entrecruzados y con reconocimiento molecular selectivo. El principio se ilustra en la Figura 56: la polimerización del

monómero ocurre en presencia de la molécula molde (MM), la cual es incorporada en la matriz polimérica. El proceso comienza con la disolución de la molécula molde, el monómero funcional (MF), el agente entrecruzante (AE) y el iniciador (I) en un disolvente porogénico (DP). Los MF se seleccionan de manera tal que interactúen con la MM a fin de formar un complejo estable MM-MF el cual es fundamental para un reconocimiento molecular efectivo. Los MF se posicionan espacialmente alrededor de la MM y la posición queda fijada por la copolimerización con los monómeros entrecruzantes. El polímero obtenido es una matriz macroporosa que posee microcavidades con una estructura tridimensional complementaria a la MM. Así, la remoción de la MM del polímero, por extracción con solvente, deja sitios de unión complementarios en forma a la MM. Consecuentemente, el polímero resultante reconoce y se une selectivamente a las MM [141].

Los sitios de unión muestran distintas características dependiendo de las interacciones establecidas durante la polimerización. Tradicionalmente, la impresión molecular se clasifica en función de la naturaleza de las interacciones entre el MF y la MM durante la polimerización. Así, en el modelo de impresión molecular covalente el mecanismo de formación del polímero implica la unión de la MM al MF a través de un enlace covalente “reversible”; en el modelo de impresión molecular no covalente, el complejo de pre-polimerización formado entre la MM y el MF se forma mediante interacciones moleculares de carácter débil (enlaces de hidrógeno, interacciones  $\pi$ - $\pi$ , dipolo-dipolo, electrostáticas y/o hidrofóbicas).

A pesar de la elevada selectividad de los polímeros covalentes, su aplicación analítica ha sido considerablemente escasa al verse el modelo limitado por el número de MF capaces de formar enlaces covalentes reversibles con las MM, la ruptura química de la plantilla del polímero y la lenta cinética de unión. Debido a la amplia disponibilidad comercial de MF y MM capaces de dar lugar a una interacción de carácter débil, junto a la facilidad de la síntesis y la extracción de la MM (simple lavado del polímero con el solvente apropiado), los polímeros no covalentes son los más empleados en la actualidad.

### 1.1.3. Consideraciones generales

En la síntesis de los MIPs han de tenerse en cuenta varios parámetros que pueden influenciar la morfología, propiedades y eficiencia de los polímeros [141].

Actualmente, el método más utilizado en la síntesis de MIPs es la polimerización radicalaria. Generalmente, el procedimiento de la síntesis se lleva a cabo bajo condiciones de reacción suaves (por ej., temperaturas menores a 80 °C y presión atmosférica) en solución, pudiendo ser toleradas por la mayoría de los grupos funcionales y estructuras de la MM. La reacción de polimerización es generalmente rápida, iniciada térmica o fotoquímicamente por un iniciador azo, comúnmente azo N-N'-bis isobutironitrilo (AIBN; iniciador fotoquímico a baja temperatura o iniciador térmico a más de 60 °C). La elección del iniciador radicalario dependerá de la estabilidad del resto de los reactivos empleados.

La elección del MF es muy importante a fin de crear cavidades altamente específicas hacia la MM. Los MF más comunes son ácidos carboxílicos (ácido acrílico, ácido metacrílico, ácido vinilbenzoico), ácidos sulfónicos (ácido 2-acrilamido-2-metilpropano sulfónico), bases heteroaromáticas (vinilpiridina, vinilimidazol), o moléculas neutras (acrilamida). En el modelo no covalente, se utilizan normalmente en exceso comparado con la MM para favorecer el equilibrio hacia la formación del complejo MM-MF (generalmente, en una relación en número de moles 1:4 MM:MF). Consecuentemente, existen diferentes configuraciones para el complejo MM-MF lo cual produce una distribución heterogénea de sitios de unión en el MIP resultante con un intervalo de valores de constantes de afinidad. La selección del mejor MF a utilizar se basa en la consideración de la fuerza y naturaleza de las interacciones MM-MF.

El agente entrecruzante (AE) también cumple un papel importante en la síntesis de los MIPs dado que estabiliza los sitios de unión impresos, controla la morfología y le otorga estabilidad mecánica a la matriz polimérica a fin de conservar su capacidad de reconocimiento molecular. Generalmente, se utilizan altas relaciones de AE a fin de obtener materiales macroporosos con una adecuada estabilidad mecánica. Uno de los AE más empleados es el etilenglicoldimetacrilato (EGDMA).

La naturaleza y volumen del disolvente se deben tener en cuenta en el proceso de impresión molecular, siendo los más utilizados el tolueno, cloroformo, diclorometano y acetonitrilo. El disolvente se encarga de que todos los componentes (MF, MM, I, AE) se hallen en una sola fase en la polimerización y es el responsable de crear los poros en los polímeros macroporosos, razón por la cual también se lo denomina disolvente porogénico (DP) o simplemente porógeno. El DP debe producir poros grandes a fin de asegurar un buen flujo a través del MIP resultante; a mayor volumen del DP, se agrandan los poros del polímero. En una polimerización no covalente, el DP debe elegirse considerando su rol en la promoción de la formación del complejo MM-MF: disolventes menos polares, como el cloroformo o el tolueno, promueven la formación del complejo al facilitar las interacciones polares no covalentes como los puentes de hidrógeno; disolventes más polares tienden a disociar las interacciones no covalentes en el complejo de pre-polimerización, especialmente disolventes próticos que alcanzan un mayor grado de disrupción de los puentes de hidrógeno.

Usualmente, se prefieren disolventes apolares, no próticos, como tolueno o cloroformo, para la síntesis de los MIPs; si existen fuerzas de interacción hidrofóbicas en el proceso de complejación, puede seleccionarse al agua u otros disolventes próticos. Se ha observado que, luego de la polimerización, la eficiencia de la interacción de la MM con los sitios de reconocimiento se optimiza cuando se utiliza el mismo disolvente que el utilizado en el proceso de impresión, sugiriendo que se requieren las mismas, o muy similares, condiciones de solvatación utilizadas para la polimerización.

#### 1.1.4. Proceso de impresión molecular a seguir

Dada la experiencia previa del grupo en la síntesis de MIPs con sistema de detección fotoluminiscente, se propone evaluar la técnica de impresión molecular basada en la polimerización

radicalaria utilizando ácido metacrílico (MAA) como monómero funcional, EGDMA como agente entrecruzante, AIBN como iniciador y cloroformo como disolvente porogénico. Los monómeros funcionales ácidos, como el MAA, se destacan dado su carácter tanto aceptor como dador de protones en la formación de enlaces por puente de hidrógeno, la formación de pares iónicos o la interacción a través de la formación de enlaces dipolo-dipolo. Por su parte, el MAA, puede actuar mediante interacciones iónicas con las aminas y vía enlaces de hidrógeno con las amidas, carbamatos y grupos hidroxilo. Como veremos en la sección 3.1.1, se han reportado síntesis de MIPs de estas características utilizando warfarina como molécula molde por lo que es de esperar que el proceso de polimerización sea eficiente.

El presente capítulo evalúa el posible desarrollo de una fase sensora fotoluminiscente basada en el empleo de QDs dopados, inmovilizados en una matriz polimérica (MIPs), para su utilización en la determinación de cumarinas (warfarina) en muestras acuosas.

## 2. Metodología

### 2.1. Reactivos y disoluciones

#### 2.1.1. Síntesis de los MIPs

Como monómero funcional, se utilizó ácido metacrílico -MAA (Fluka)-, el cual fue destilado en vacío (78 mm Hg, 78 °C) para remover los estabilizadores. Como agente entrecruzante, se utilizó etilenglicoldimetacrilato -EGDMA (Aldrich)-, el cual fue purificado por extracción con NaOH 0,1 N, secado con sulfato de sodio anhidro y pasado a través de una columna de alúmina activada. Como iniciador radicalario, se utilizó al azo N-N'-bis isobutironitrilo -AIBN (Aldrich)-. Se utilizó cloroformo (Merck) como disolvente porogénico y warfarina (Sigma-Aldrich) como molécula molde.

#### 2.1.2. Lavado de los polímeros

Para el lavado en la celda de flujo, se utilizaron como fases móviles metanol (OmniSolv, Merck), acetonitrilo (OmniSolv, Merck), buffer fosfato pH 7,4 (Capítulo III, Parte I, sección 2.1) y mezclas de los mismos.

Para el lavado en Soxhlet, se utilizó metanol/ácido acético (90:10 v/v) –ácido acético Analar-, metanol y acetonitrilo/buffer (15:85 v/v).

#### 2.1.3. Medidas en flujo

Para la evaluación de la capacidad de reconocimiento de los polímeros, se utilizaron como fases móviles metanol y acetonitrilo/buffer (15:85 v/v).

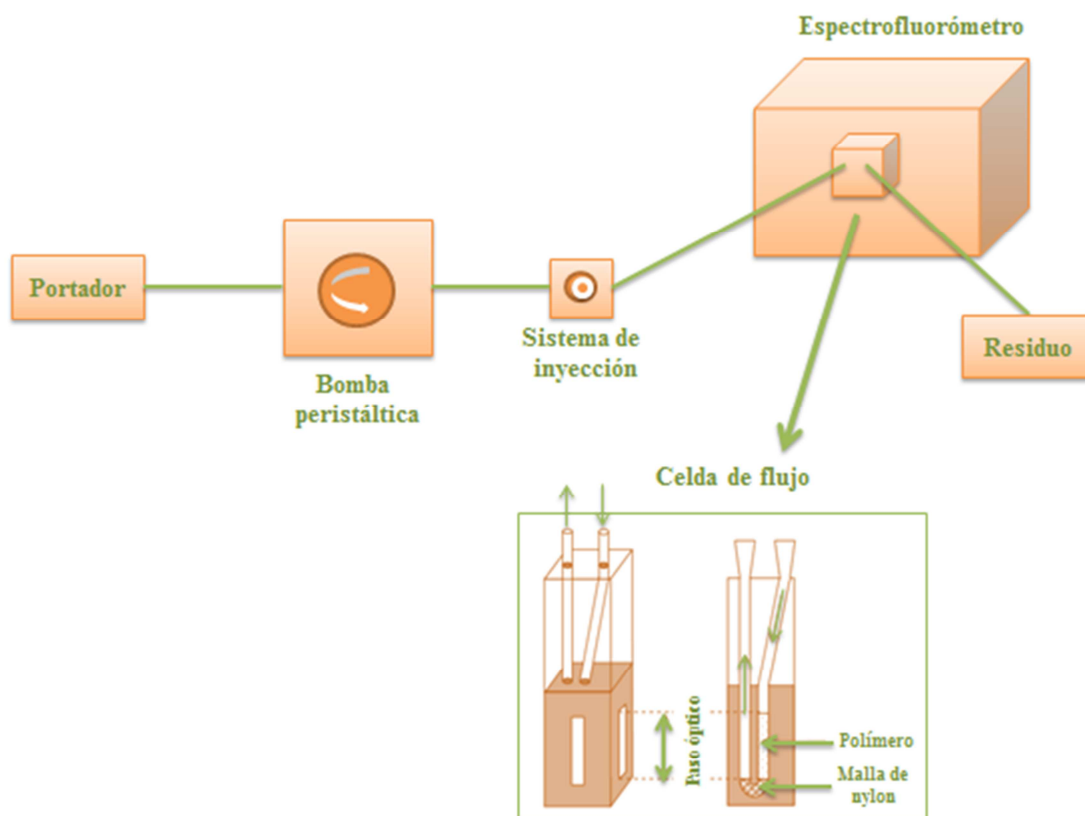
## 2.2. Instrumentación analítica

Todos los espectros de fotoluminiscencia fueron registrados con un espectrofluorómetro Perkin-Elmer LS-50B (Beaconsfield, Inglaterra) provisto de una lámpara pulsada de xenón como fuente de excitación (ancho de pulso <math><10\ \mu\text{s}</math>, 60 Hz) y un fotomultiplicador R928. El instrumento se encuentra conectado a una PC para el almacenamiento y tratamiento de datos a través del software FL Winlab. Para las medidas de fluorescencia, se utilizaron longitudes de onda de excitación de 298 nm, 310 nm y 321 nm, longitud de onda de emisión de 383 nm, anchos de banda de excitación de 5 nm y de emisión de 2,5 nm (de utilizarse otros valores de longitud de onda, se aclara en los espectros). Para las medidas de fosforescencia, se utilizaron tiempos de demora ( $t_d$ ) y de medida ( $t_m$ ) de 0,10 ms y 5,00 ms, respectivamente (ver Figura 13, Capítulo II), longitudes de onda de excitación y emisión de 298 nm y 593 nm, respectivamente, y anchos de banda de excitación de 15 nm y de emisión de 20 nm. Ambas medidas se realizaron utilizando celdas de cuarzo convencionales de 1,0 cm de camino óptico o una celda de flujo convencional (sección 2.2.1.1).

Los espectros de absorción fueron medidos en un espectrofotómetro Shimadzu UV-240 (Japón), utilizando celdas de cuarzo de 1,0 cm de camino óptico.

### 2.2.1. Sistema de inyección en flujo

El sistema de flujo utilizado en el desarrollo del optosensor se muestra en la Figura 57. El sistema posee una configuración sencilla de flujo de un solo canal, a través del cual la solución portadora es aspirada por medio de una bomba peristáltica. Las muestras se introducen en el flujo por medio de una válvula de inyección de cuatro vías, provista de un loop de 500  $\mu\text{L}$ . La válvula de inyección se encuentra acoplada en serie al sistema de bombeo y las muestras son conducidas por medio de la misma hacia la celda de flujo. La celda se encuentra dispuesta en el interior del compartimiento de celdas del espectrofluorómetro, el cual actúa como sistema de detección. El equipo se encuentra conectado a una PC que permite, a través de un software, el control del equipo, el registro de los datos y su posterior tratamiento.



**Figura 57.** Esquema del dispositivo de medida en flujo



### 2.2.1.1. Celda de flujo

Se utilizó una celda de flujo convencional, de 25  $\mu\text{L}$  de capacidad y 1,5 mm de camino óptico, en cuyo interior se empaquetó el polímero impreso de composición óptima para la detección de warfarina (Figura 57). Por el orificio de entrada a la celda se introduce una malla (tela de nylon) que, con la ayuda de una aguja, se acomoda en el fondo de la celda. Luego, con ayuda de un tip de micropipeta, que hace las veces de embudo, se introduce el polímero de forma tal que al humedecerse con la solución portadora abarque todo el paso óptico de la celda.

## 2.3. Síntesis de los MIPs

En base a los antecedentes de la literatura [142-144] y los análisis de pre-polimerización realizados (ver Resultados, sección 3.1.1), se propuso la síntesis de los MIPs utilizando MAA como monómero funcional, siguiendo dos metodologías reportadas [143, 145].

### 2.3.1. Síntesis inicial

Como una primera aproximación, en base a la experiencia en el grupo [145], se sintetizó un polímero impreso (MIP 1) con warfarina a fin de corroborar la respuesta del polímero a la presencia de dicha molécula. Se mezclaron 4,35 mg de warfarina y 8,77 mg de QDs con 3 mL de cloroformo en un tubo de borosilicato con tapa, el cual se sometió a sonicación por 15 minutos hasta disolución completa. Luego se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de MAA y 1600  $\mu\text{L}$  de EGDMA, agitando la mezcla en vórtex por 15 minutos. Por último, con el tubo sumergido en baño de hielo, se agregaron 9 mg de AIBN seguido de 5 minutos de sonicación. La mezcla se desoxigenó mediante burbujeo con nitrógeno durante 10 minutos (es necesario eliminar el oxígeno ya que inhibe la polimerización) y luego se sometió a calentamiento a 60  $^{\circ}\text{C}$  en estufa durante 16 horas. Al mismo tiempo, se preparó la misma mezcla pero sin el agregado de warfarina (NIP 1). Esto es lo que se denomina polímero no impreso (NIP). Estos polímeros ayudarán a evaluar la selectividad de los MIP. Después del período de reacción, se obtuvieron bloques sólidos blancos para ambos casos. Para utilizar estos polímeros se requiere un tamaño pequeño de partículas. Para ello, se trituro el material obtenido de manera manual utilizando un mortero de ágata y tamizando la molienda obtenida para reservar la fracción de partículas de tamaño comprendido entre 70 y 100 mesh (210-149  $\mu\text{m}$  de diámetro). A continuación, se procedió al lavado de los polímeros con un solvente de mayor polaridad que el utilizado en la síntesis de forma tal de extraer la molécula molde de la matriz polimérica.

#### 2.3.1.1. Lavado en celda de flujo

Se realizó el lavado de los polímeros en la celda de flujo con metanol. Para ello, se registró la intensidad de fosforescencia en el tiempo (fiagrama) hasta estabilización de la señal y se controlaron por absorbancia las fracciones recolectadas cada 5 minutos. Se realizaron también los espectros de fosforescencia del polímero antes y después del lavado.

### 2.3.2. Segunda síntesis

Basándose en un trabajo de bibliografía [143], se sintetizó un nuevo polímero impreso (MIP 2) con warfarina a fin de corroborar la respuesta del polímero a la presencia de dicha molécula. Se mezclaron 47,75 mg de warfarina y 4,14 mg de QDs con 2,81 mL de cloroformo en un tubo de borosilicato con tapa, el cual se agitó en vórtex por una hora y luego se sometió a sonicación por 15 minutos hasta disolución completa. Luego se adicionaron 156  $\mu\text{L}$  de MAA y 1600  $\mu\text{L}$  de EGDMA, agitando la mezcla en vórtex por 15 minutos. Por último, con el tubo sumergido en baño de hielo, se agregaron 40 mg de AIBN seguido de 5 minutos de sonicación. La mezcla se desoxigenó mediante burbujeo con nitrógeno durante 10 minutos y luego se sometió a calentamiento a 60 °C en estufa durante 16 horas. Al mismo tiempo, se preparó la misma mezcla pero sin el agregado de warfarina (NIP 2). Después del período de reacción, se obtuvieron bloques sólidos blancos para ambos casos. Se trituró el material obtenido de manera manual utilizando un mortero de ágata y se tamizó la molienda obtenida para reservar la fracción de partículas de tamaño comprendido entre 70 y 100 mesh (210-149  $\mu\text{m}$  de diámetro). A continuación, se procedió al lavado de los polímeros con un solvente de mayor polaridad que el utilizado en la síntesis de forma tal de extraer la molécula molde de la matriz polimérica.

#### 2.3.2.1. Lavado en celda de flujo

Se realizó, en primera medida, el lavado de los polímeros en la celda de flujo con metanol. Se realizaron también lavados con acetonitrilo, acetonitrilo/buffer pH 7,4 (50:50 v/v), buffer pH 7,4 y acetonitrilo/buffer pH 7,4 (15:85 v/v). Para ello, se registró la intensidad de fosforescencia en el tiempo (fiagrama) hasta estabilización de la señal y se controlaron por absorbancia las fracciones recolectadas cada 5 minutos. Se realizaron los espectros de fluorescencia y fosforescencia del polímero antes y después del lavado.

#### 2.3.2.2. Lavado en Soxhlet

Se realizó una extracción sólido-líquido con una mezcla metanol/ácido acético 90:10 (v/v) - o acetonitrilo/buffer (15:85 v/v)- mediante Soxhlet durante 24 horas. Se repitió el procedimiento de extracción, pero utilizando metanol como solvente de lavado. Se evaluaron las sucesivas fracciones de lavado, registrando sus espectros de absorción hasta verificar la desaparición de la banda correspondiente a la warfarina. Finalmente, el sólido se secó en estufa a 40 °C durante 24 horas. Se realizaron los espectros de fluorescencia y fosforescencia del polímero lavado.

### 3. Resultados y discusión

#### 3.1. Mn:ZnS QDs impresos

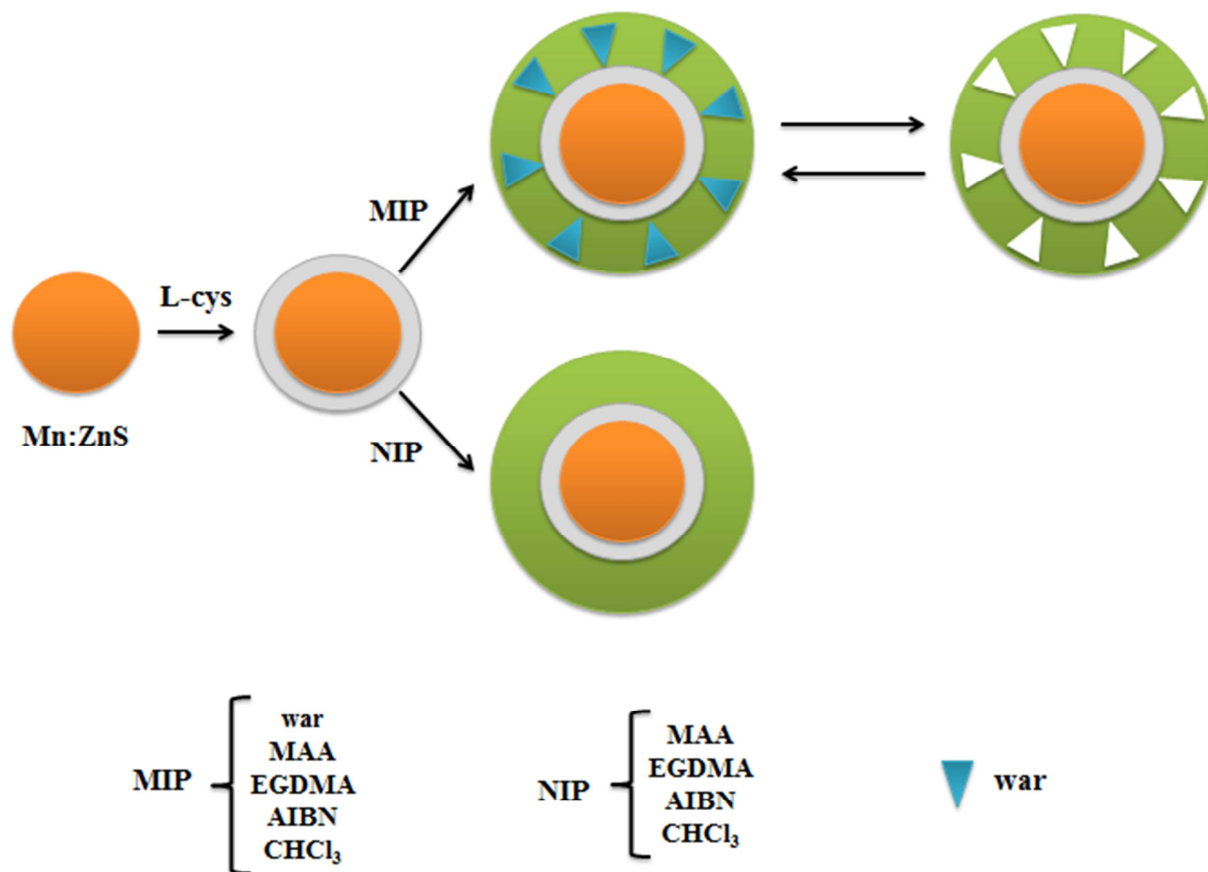


Figura 58. Resumen gráfico: Mn:ZnS QDs impresos

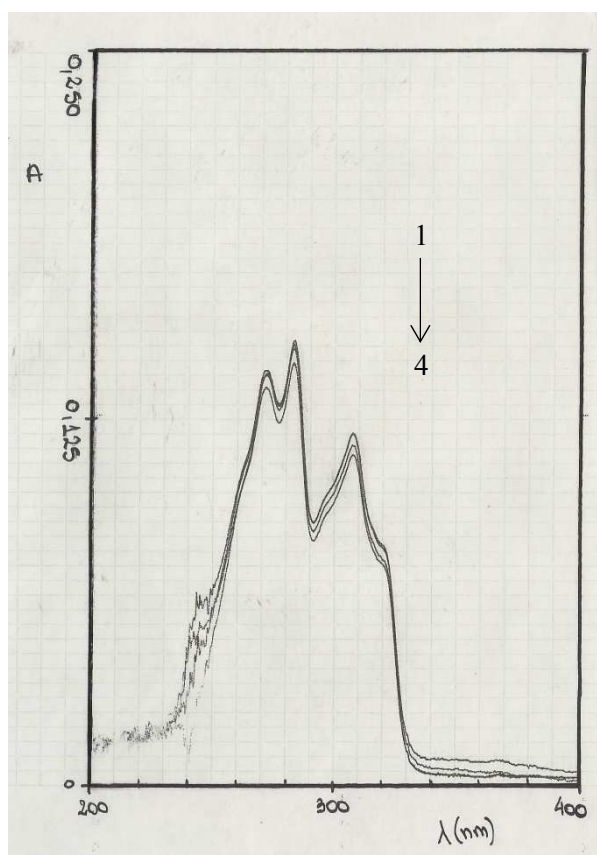
##### 3.1.1. Análisis espectroscópico y fotoluminiscente del complejo de pre-polimerización

Tal como se mencionó en la Introducción, es importante que los monómeros funcionales interactúen fuertemente con la molécula molde y formen complejos estables en un paso previo a la polimerización, al ser la fuerza y estructura de las uniones en solución lo que define la posterior afinidad y selectividad del polímero impreso. Por consiguiente, es crucial encontrar un monómero funcional adecuado que complemente a la molécula molde, maximizando y estabilizando la formación del complejo de pre-polimerización.

Se ha reportado la síntesis de MIPs utilizando warfarina como molécula molde y MAA como monómero funcional [142-144]. En particular, en el trabajo de Karlsson y colaboradores [142], se ha estudiado la naturaleza y el grado de las interacciones entre warfarina (war) y MAA: se ha determinado la constante de disociación del complejo MAA-war ( $K_D = 0,3 - 0,4$  M) con una

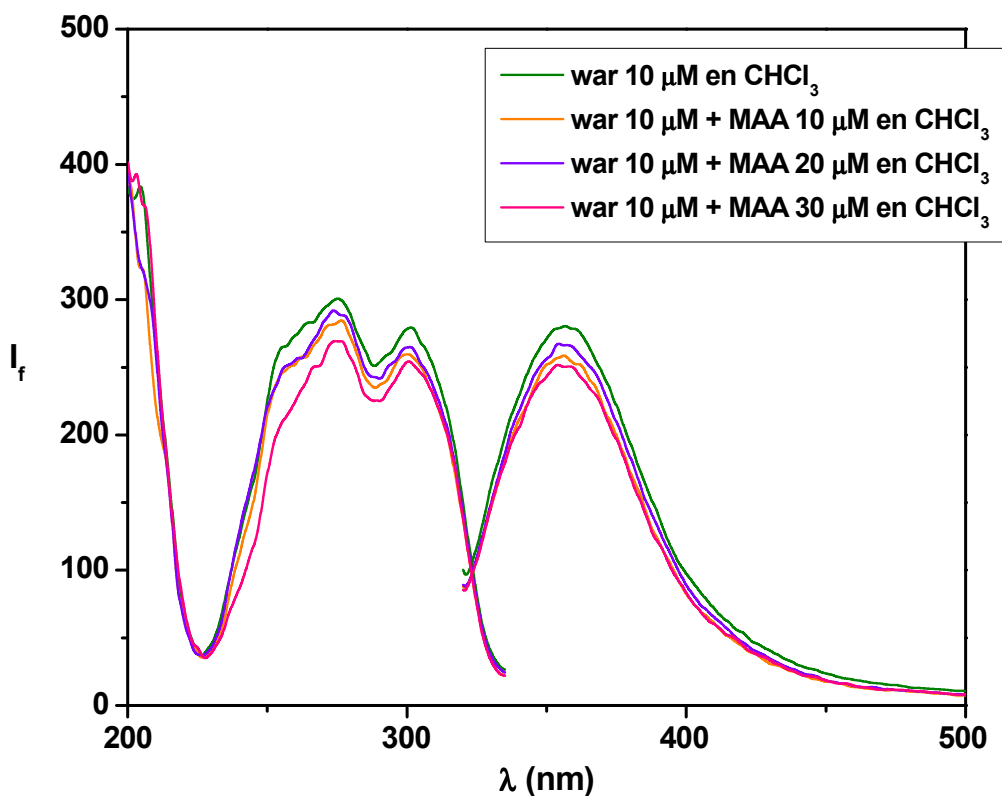
estequiometría 1:1, proveyendo el grupo ácido carboxílico del MAA dos modos significativos de unión con la war (en el grupo hidroxilo y carbonilo, sugiriendo la presencia de enlaces por puentes de hidrógeno).

Una herramienta rápida para evaluar las interacciones entre el monómero funcional y la molécula molde en solución es la titulación espectrofotométrica y/o fluorescimétrica, realizando una imitación de la pre-polimerización. Para ello, se registraron los cambios en los espectros de absorción y de emisión de fluorescencia de la warfarina por adición de concentraciones crecientes de MAA, en cloroformo (Figuras 59 y 60).



**Figura 59.** Titulación espectrofotométrica de warfarina con MAA en cloroformo  
 [war] = 10  $\mu$ M; [MAA] (1 a 4) = 0, 10, 20, 30  $\mu$ M

De la Figura 59, puede notarse que el espectro de absorción de la warfarina en cloroformo difiere del correspondiente en 20 % v/v de metanol (Capítulo I, Figura 6) debido a efectos solvatocrómicos (ver Anexo II).



**Figura 60.** Titulación fluorescimétrica de warfarina con MAA

$\lambda_{exc} = 301 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{em} = 357 \text{ nm}$ ; anchos de banda de exc/em = 10/10 nm

No se observan cambios apreciables en los espectros de absorción y fluorescencia con el agregado de MAA, lo que puede sugerir que la formación del complejo MAA-war no da lugar a modificaciones en el estado fundamental ni en el excitado. En el trabajo publicado por Karlsson y colaboradores [142], se determina la estequiometría del complejo y su constante de disociación por RMN  $H^1$  a partir del desplazamiento de tres de los protones de la warfarina por interacción con el monómero análogo deuterado del MAA (ácido acético deuterado) en cloroformo deuterado. Este método, en comparación con las titulaciones espectrofotométricas y fluorescimétricas, puede resultar más adecuado para la evaluación de las interacciones entre MAA y warfarina.

### 3.1.2. QDs impresos: síntesis inicial

#### 3.1.2.1. Lavado del MIP en celda de flujo

Se procedió al lavado del MIP obtenido (MIP 1) con metanol utilizando un sistema de flujo sencillo, rellenando la celda con el correspondiente polímero. La Figura 61 muestra el fiagrama correspondiente al lavado, la Figura 62 el control por absorbancia de las fracciones recolectadas cada 5 minutos y la Figura 63 los espectros de fosforescencia del MIP antes y después del lavado.

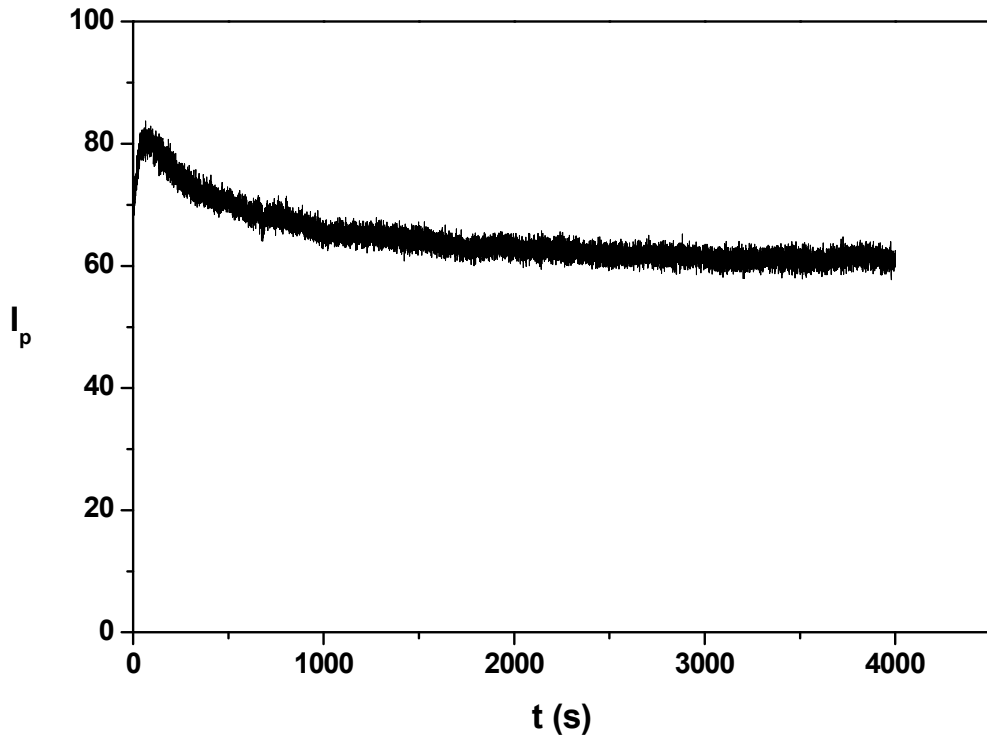


Figura 61. Diagrama: lavado del MIP con metanol (MIP 1)

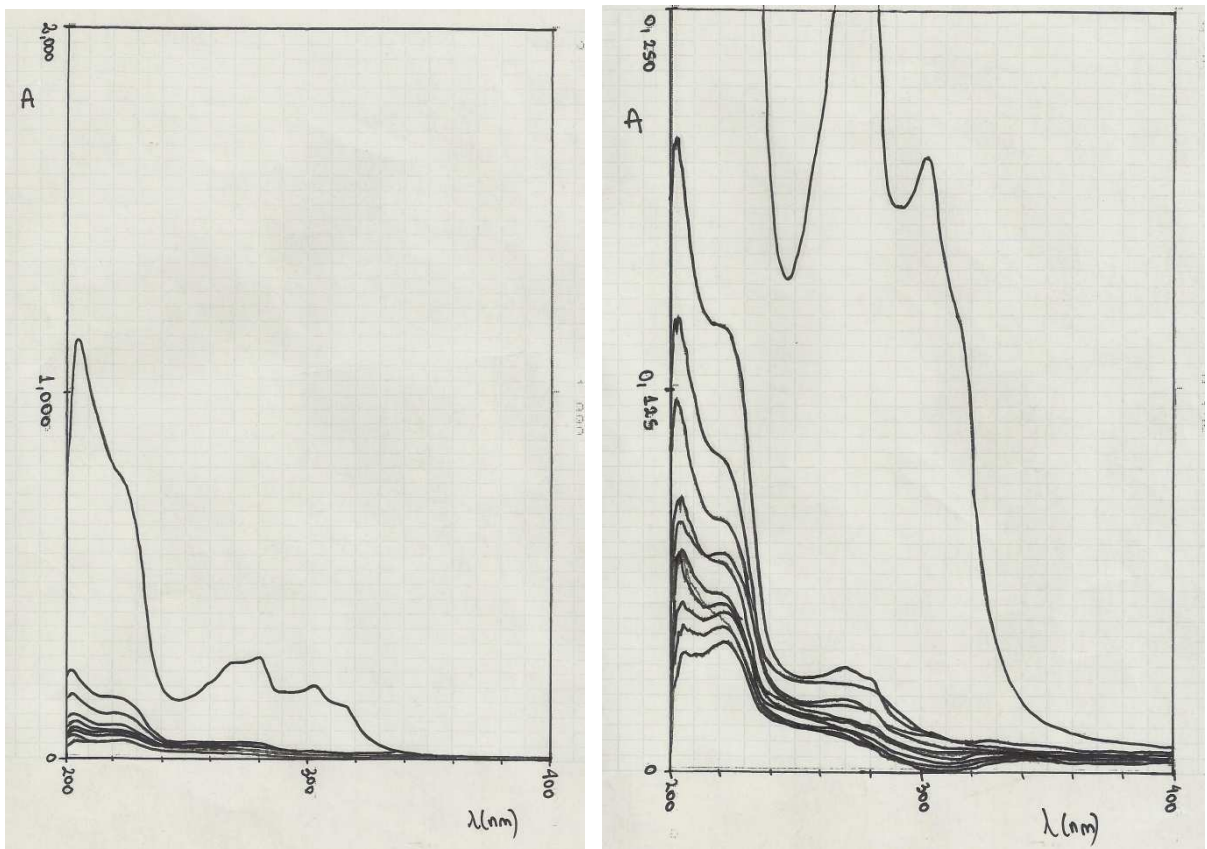


Figura 62. Espectros de absorción de las fracciones recolectadas (MIP 1)

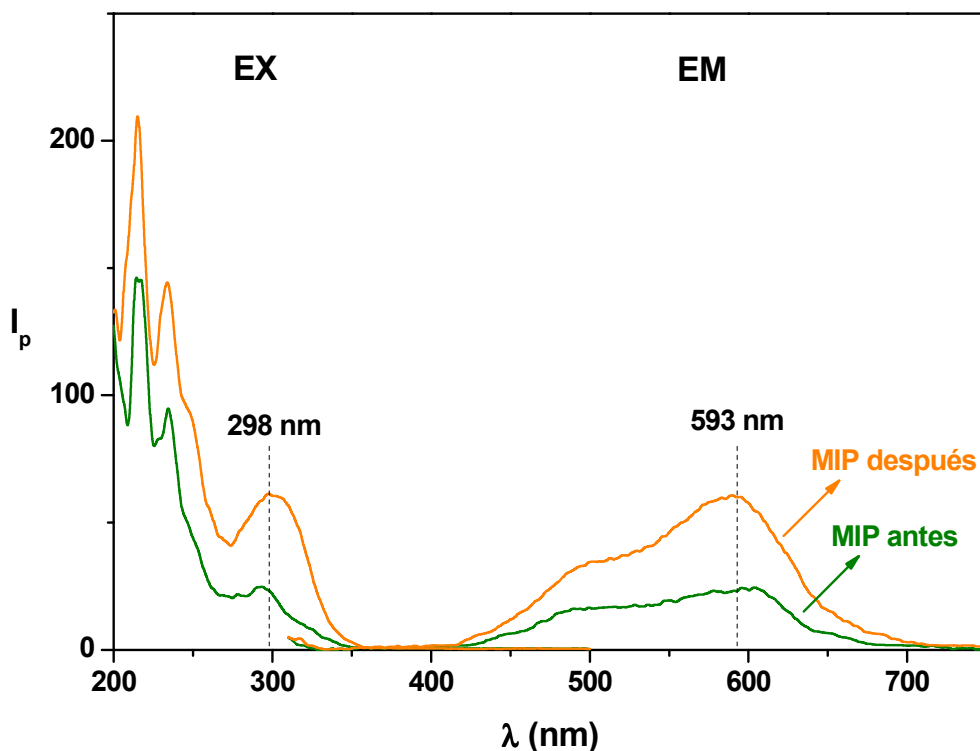


Figura 63. Espectros de fosforescencia antes y después del lavado con metanol (MIP 1)

Como puede observarse, la warfarina presente en el MIP (y las posibles impurezas) pareciera removerse en los primeros lavados: desaparece la banda de absorción correspondiente a la warfarina y aumenta la emisión de fosforescencia (la warfarina quenchea la fosforescencia del MIP).

### 3.1.2.2. Lavado del NIP en celda de flujo

Se procedió, de manera análoga, al lavado del NIP (NIP 1). La Figura 64 muestra el diagrama correspondiente al lavado, la Figura 65 el control por absorbancia de las fracciones recolectadas cada 5 minutos y la Figura 66 los espectros de fosforescencia del NIP antes y después del lavado.

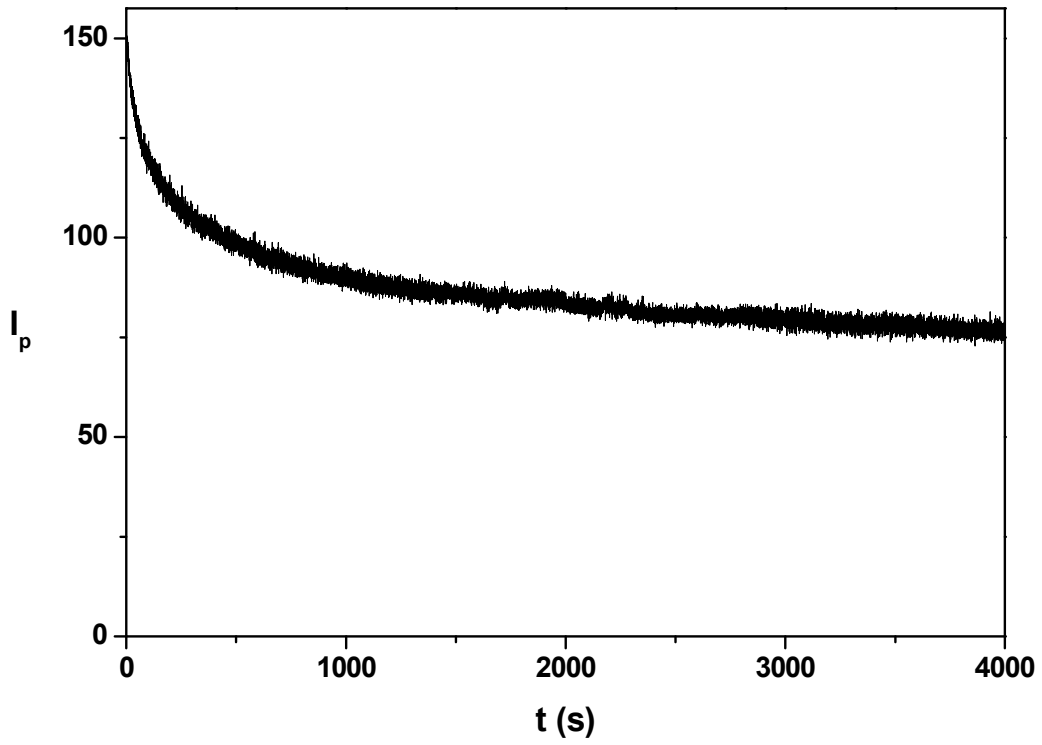


Figura 64. Diagrama: lavado del NIP con metanol (NIP 1)

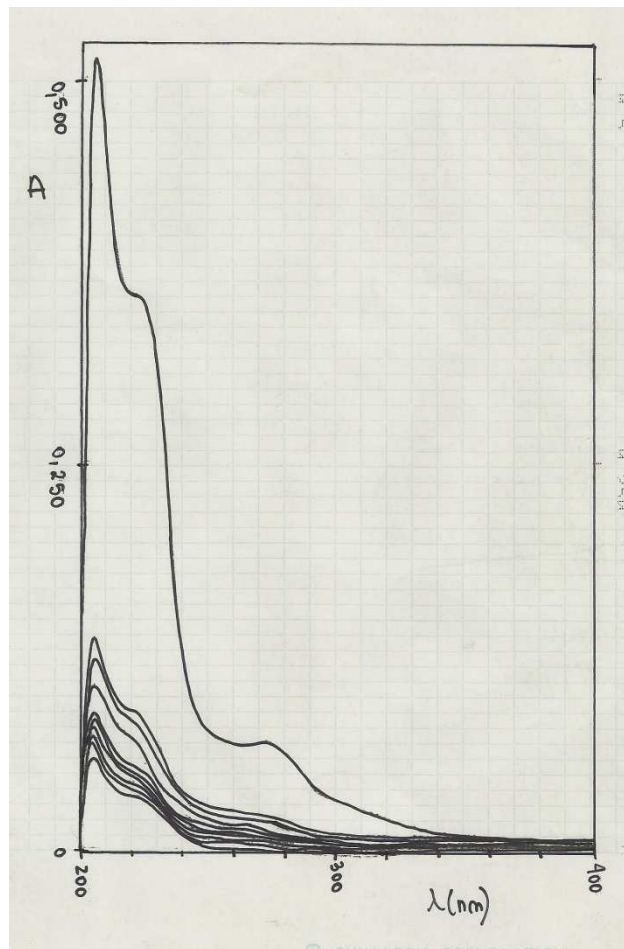
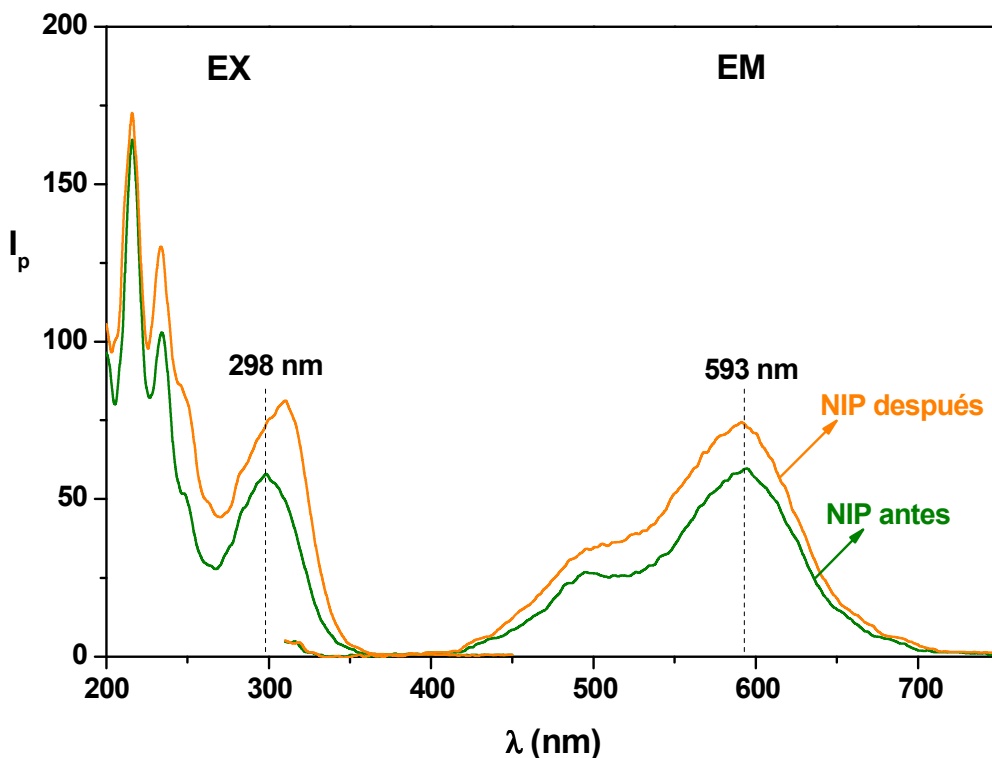


Figura 65. Espectros de absorción de las fracciones recolectadas (NIP 1)





**Figura 66.** Espectros de fosforescencia antes y después del lavado con metanol (NIP 1)

Como puede observarse, la mayoría de las posibles impurezas presentes en el NIP parecieran eliminarse en los primeros lavados: se registra una disminución en la absorbancia con los lavados y los espectros de fosforescencia aumentan su intensidad luego del mismo.

### 3.1.3. QDs impresos: segunda síntesis

#### 3.1.3.1. Lavado del NIP en celda de flujo

Se procedió al lavado del NIP obtenido (NIP 2) con metanol utilizando un sistema de flujo sencillo, rellenando la celda con el correspondiente polímero. La Figura 67 muestra el diagrama correspondiente al lavado, la Figura 68 el control por absorbancia de las fracciones recolectadas cada 5 minutos y la Figura 69 los espectros de fosforescencia del NIP antes y después del lavado.

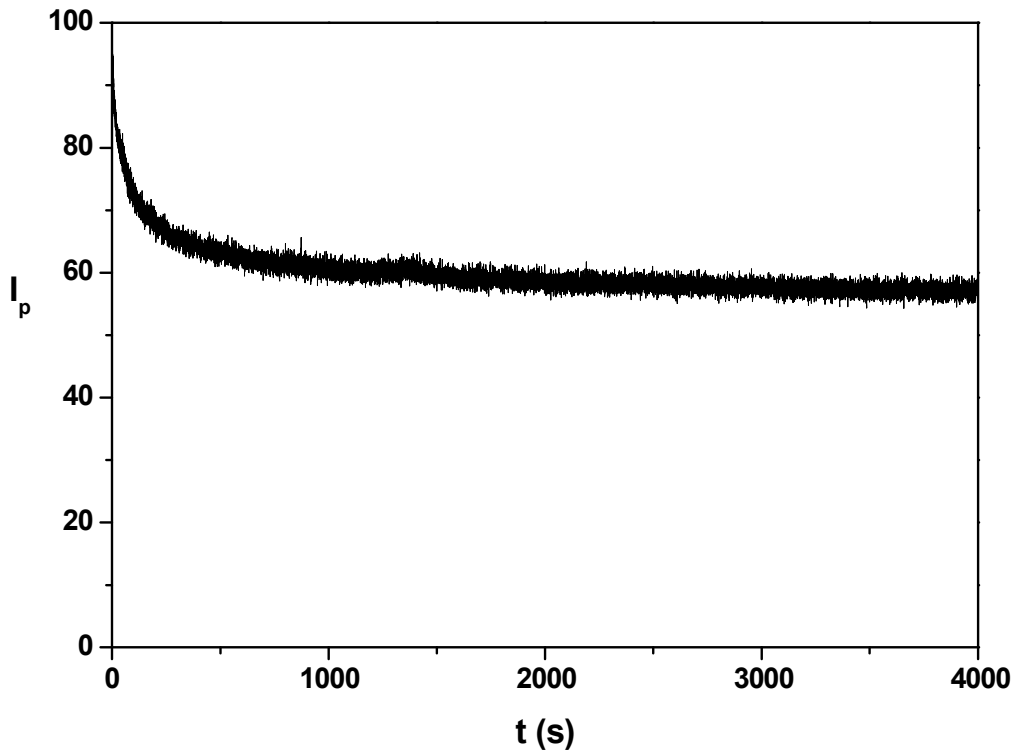


Figura 67. Diagrama: lavado del NIP con metanol (NIP 2)

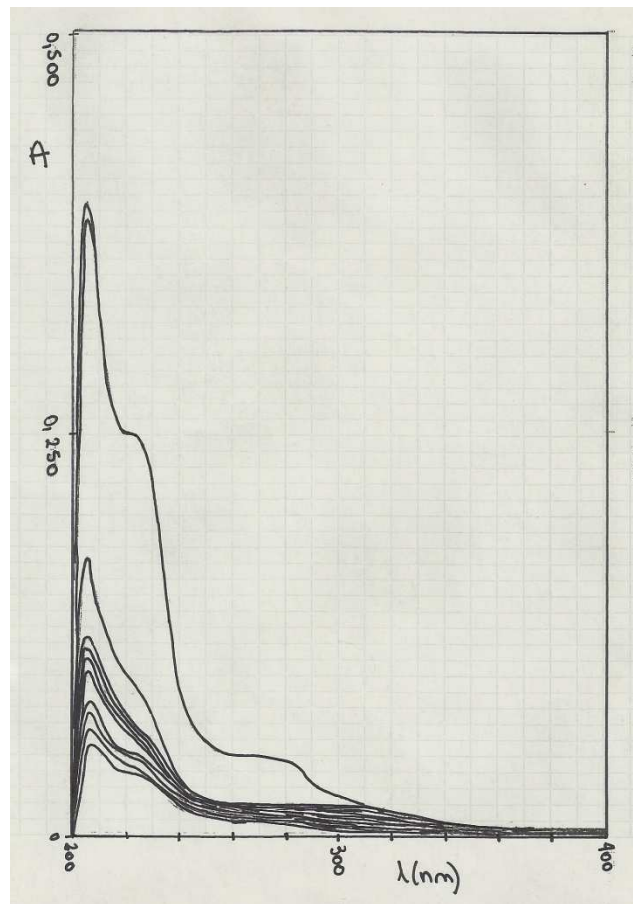
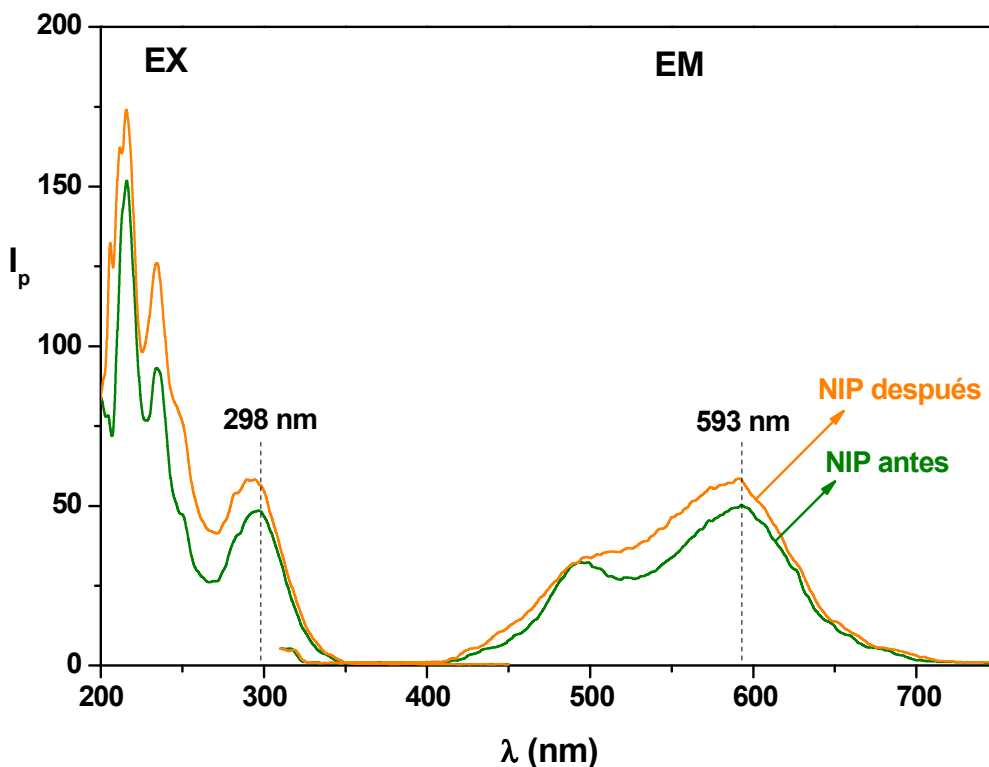


Figura 68. Espectros de absorción de las fracciones recolectadas (NIP 2)



**Figura 69.** Espectros de fosforescencia antes y después del lavado con metanol (NIP 2)

Como puede observarse, la mayoría de las posibles impurezas presentes en el NIP parecieran eliminarse en los primeros lavados: se registran altos valores de absorbancia al comienzo, disminuyendo con los lavados; a su vez, los espectros de fosforescencia aumentan su intensidad luego del lavado.

### 3.1.3.2. Lavado del MIP en celda de flujo

Se procedió, de manera análoga, al lavado del MIP (MIP 2) con metanol. La Figura 70 muestra el fiagrama correspondiente al lavado, la Figura 71 el control por absorbancia de las fracciones recolectadas cada 5 minutos, la Figura 72 los espectros de fosforescencia del MIP antes y después del lavado y la Figura 73 los espectros de fluorescencia del MIP luego del lavado.

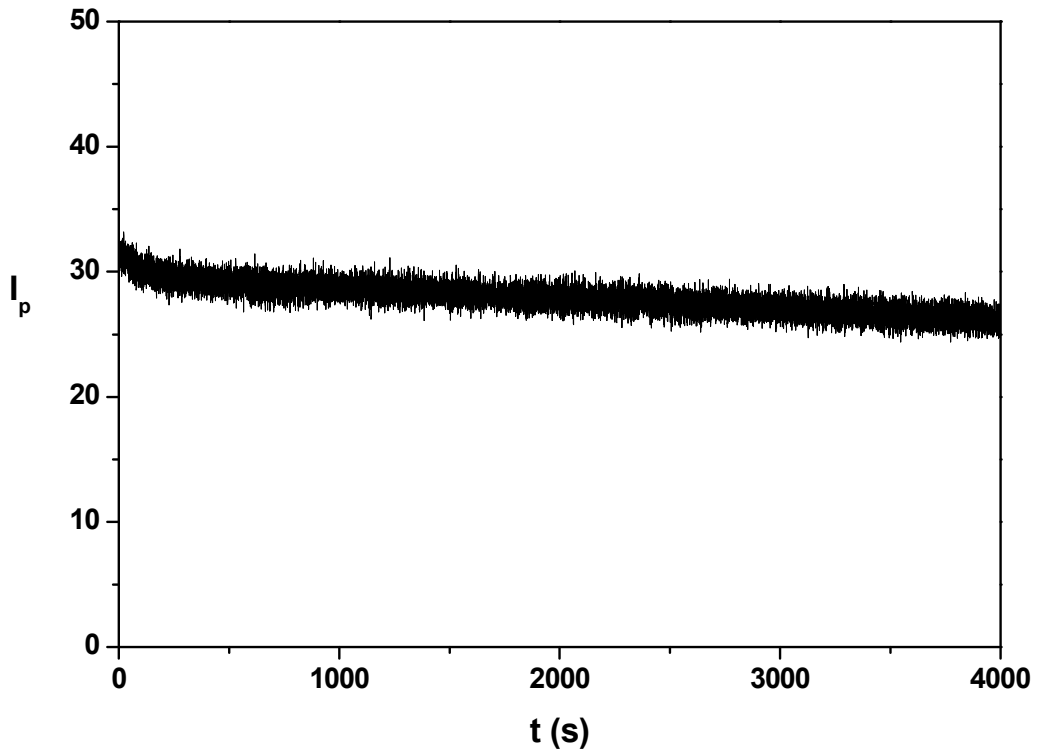


Figura 70. Diagrama: lavado del MIP con metanol (MIP 2)

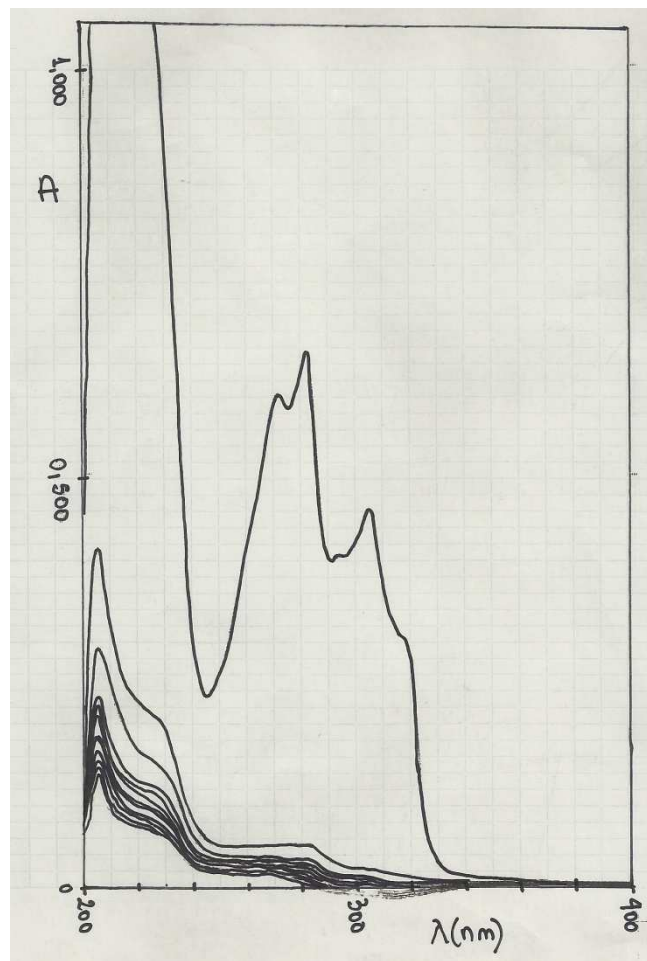


Figura 71. Espectros de absorción de las fracciones recolectadas (MIP 2)

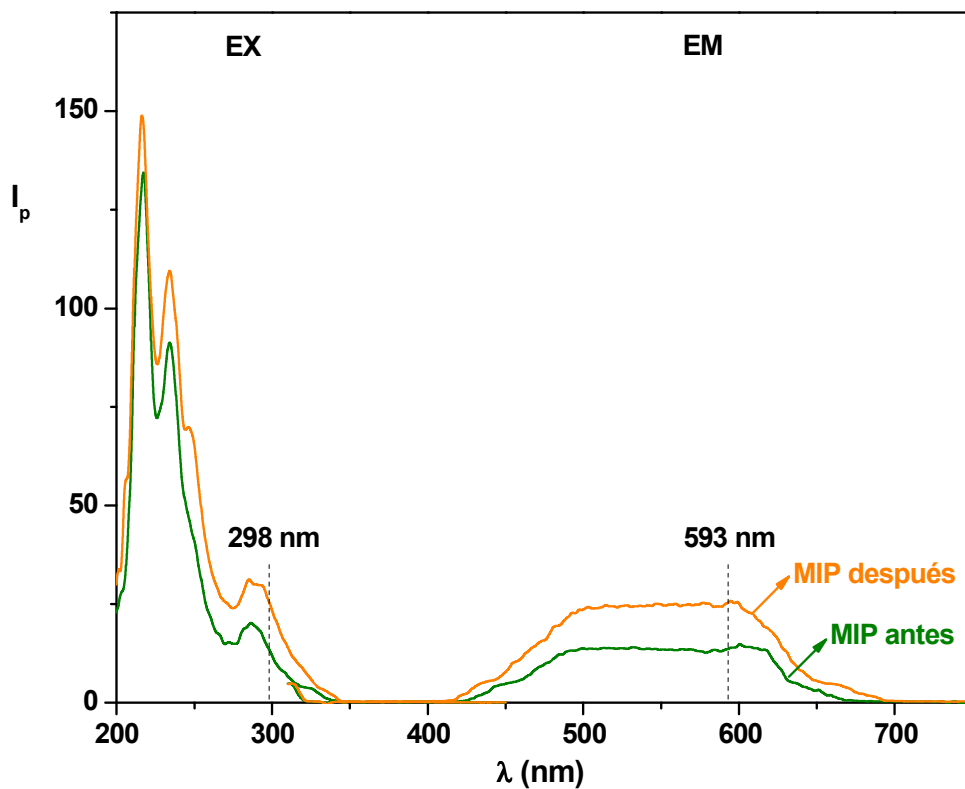


Figura 72. Espectros de fosforescencia antes y después del lavado con metanol (MIP 2)

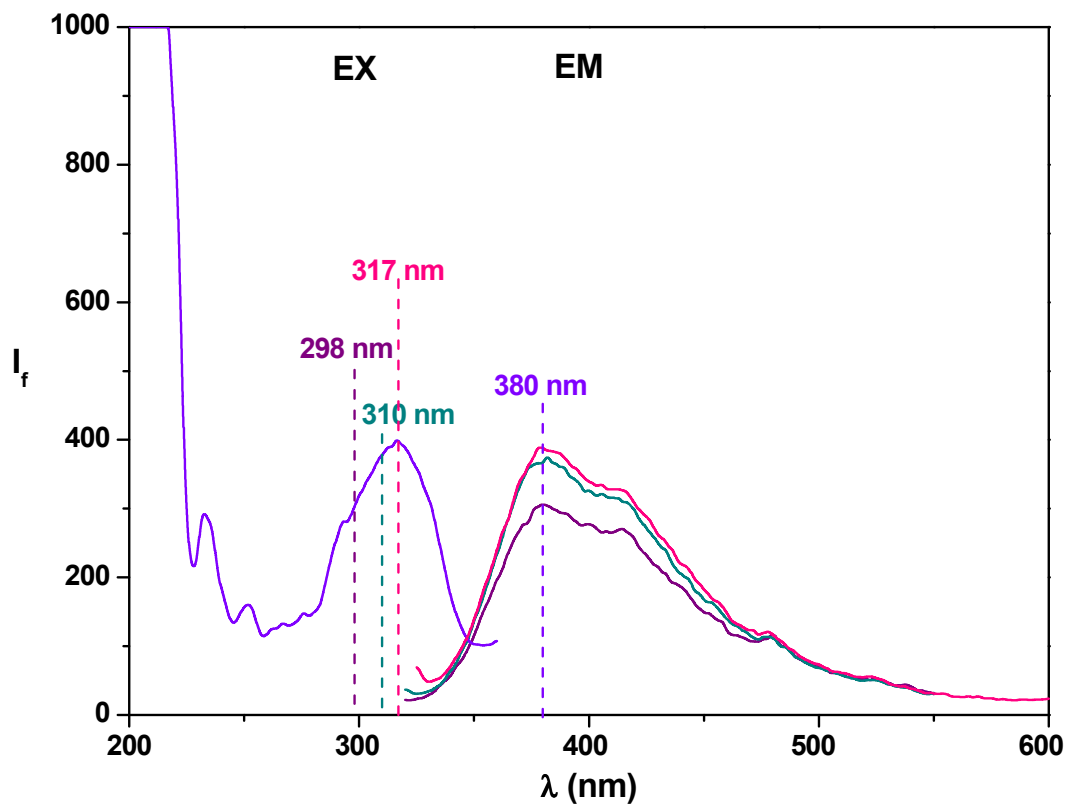


Figura 73. Espectros de fluorescencia después del lavado con metanol excitando a tres longitudes de onda (MIP 2)

Si consideramos los espectros de absorción de las fracciones recolectadas, pareciera que la warfarina es removida de sus sitios en el MIP por el metanol. Sin embargo, se observa claramente en los espectros de fluorescencia que la warfarina todavía sigue unida al QD y por ello se registra su espectro de emisión característico. Se registraron los espectros de emisión excitando a tres longitudes de onda, incluyendo la longitud de onda de excitación del QD. Si recordamos el espectro de absorción de la warfarina (Capítulo I, Figura 6), este presenta un máximo cercano a los 310 nm por lo que los tres valores de longitud de onda logran excitarla.

Considerando los fiagramas y los espectros de fosforescencia de los MIP 1, NIP 1, NIP 2 y MIP 2 (Figuras 61, 63, 64, 66, 67, 69, 70 y 72, respectivamente) lavados con metanol en celda de flujo, puede notarse que las intensidades registradas para los NIPs son similares mientras que se observa una marcada disminución (cerca de la mitad) de la correspondiente al MIP 2 respecto de la del MIP 1. Este hecho puede explicarse en función de las cantidades relativas de warfarina a QDs adicionadas en la síntesis (MIP 2: 11,53; MIP 1: 0,50); al ser mayor la cantidad de warfarina en el MIP 2, y no haberla podido eliminar completamente con el lavado, la magnitud del quenching en el MIP 2 es mayor que en el MIP 1 (la fosforescencia registrada es debida sólo a los QDs sin complejar con warfarina).

En base a estos resultados, se procedió a cambiar el solvente de lavado. Se utilizó acetonitrilo (ACN), ACN/buffer (50:50 v/v) y buffer, en períodos sucesivos de 2000 segundos cada uno. La Figura 74 muestra el fiagrama correspondiente a los lavados, las Figuras 75 y 76 los espectros de fosforescencia y fluorescencia del MIP, respectivamente, luego de cada lavado y las Figuras 77, 78, 79, 80, 81 y 82 los espectros de absorción y fluorescencia de las fracciones recolectadas.

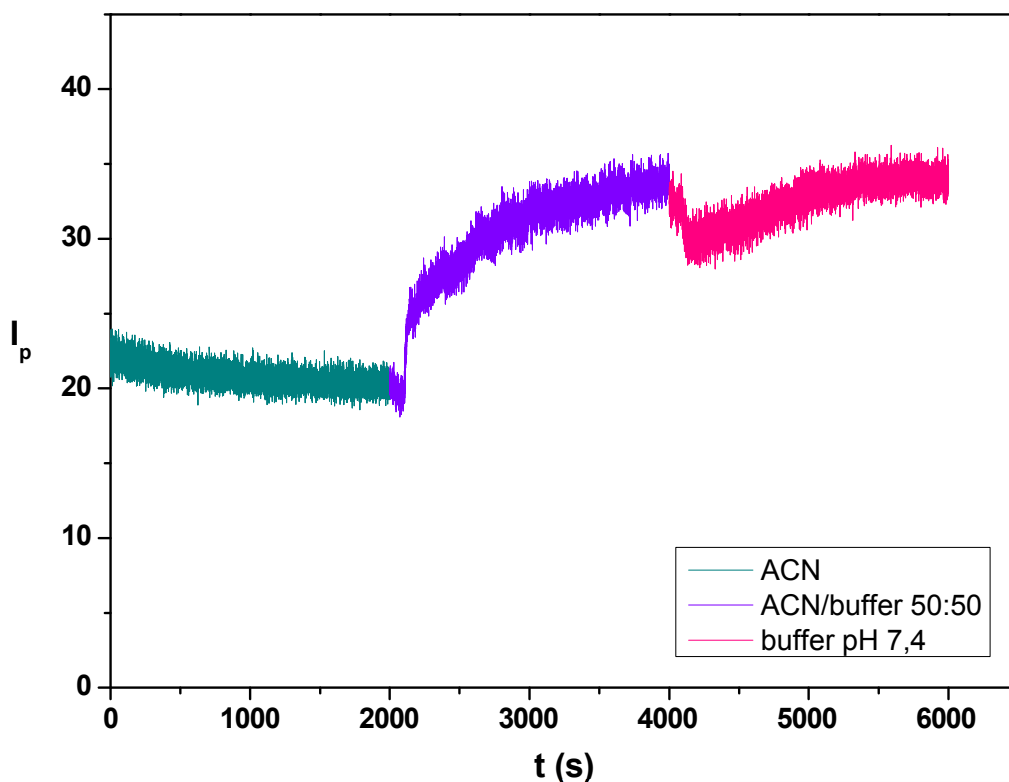


Figura 74. Fiagrama: lavados sucesivos del MIP (MIP 2)

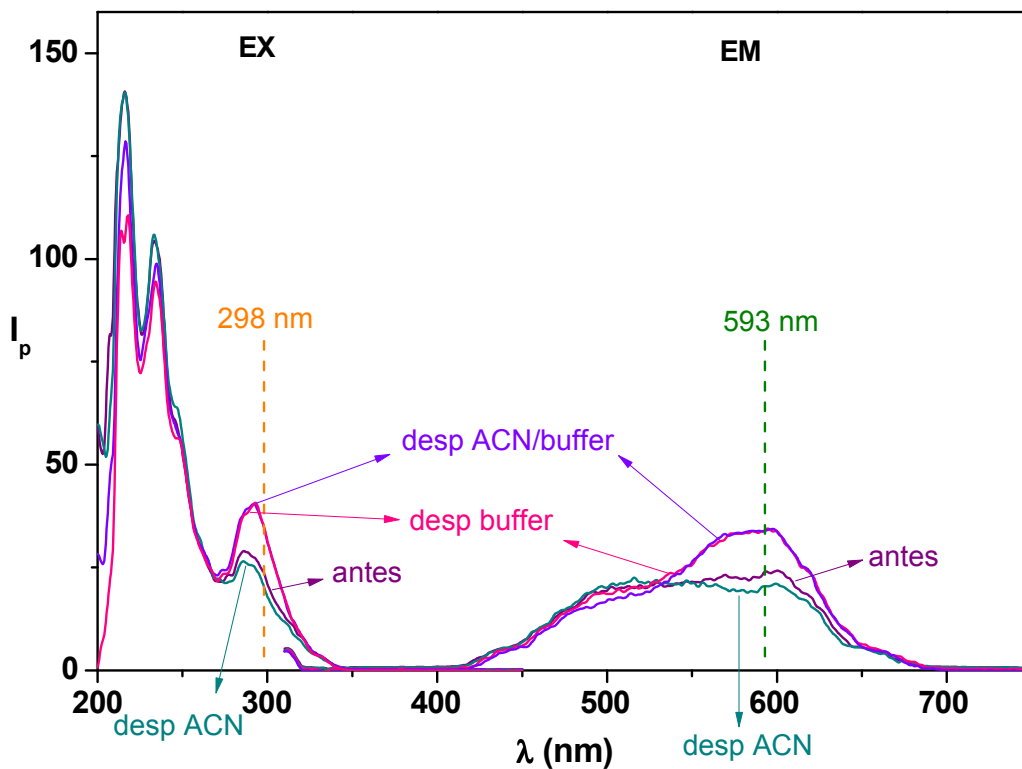


Figura 75. Espectros de fosforescencia después de los sucesivos lavados (MIP 2)

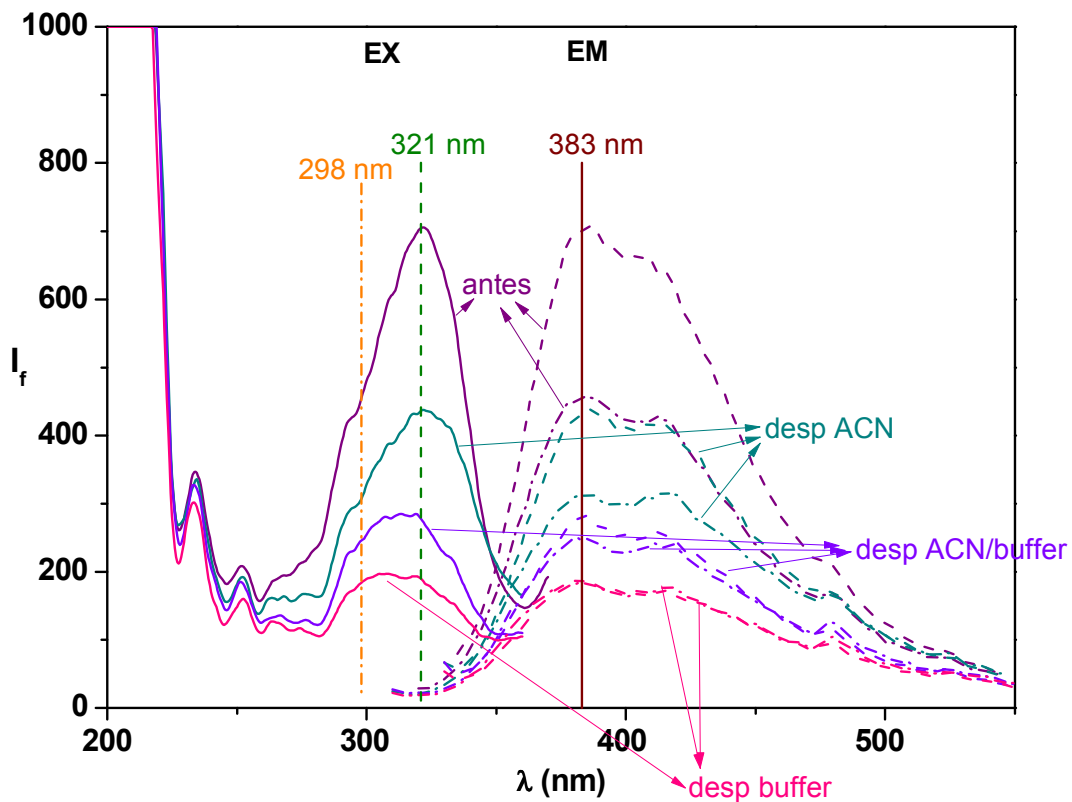


Figura 76. Espectros de fluorescencia después de los sucesivos lavados excitando a dos longitudes de onda (MIP 2)

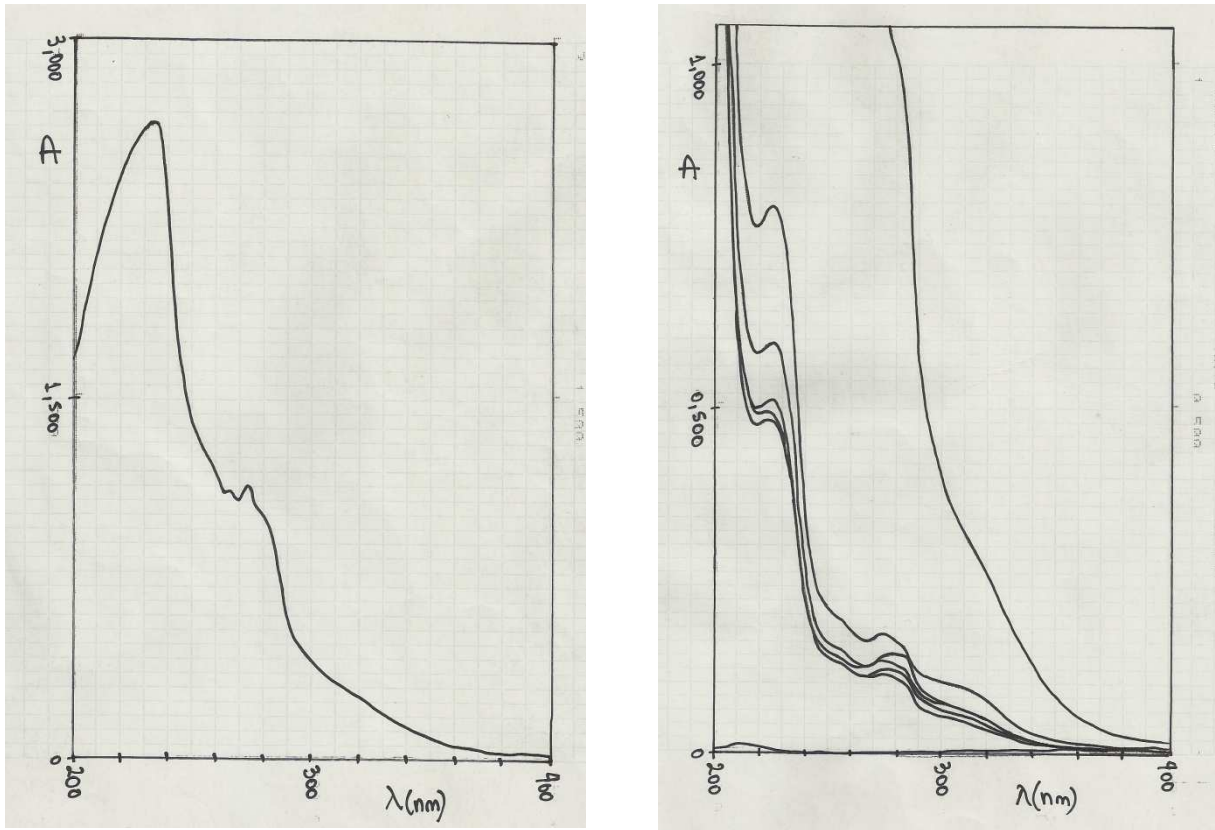


Figura 77. Espectros de absorción de las fracciones recolectadas. Lavado con ACN (MIP 2)

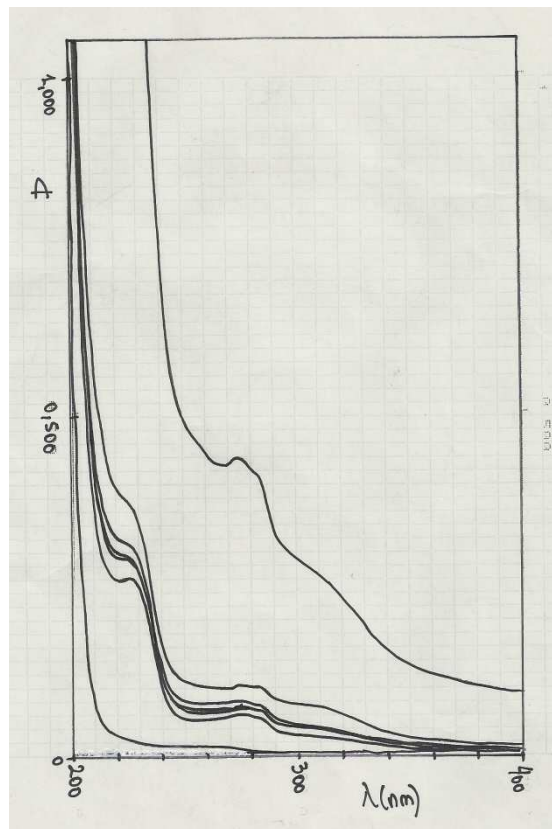


Figura 78. Espectros de absorción de las fracciones recolectadas. Lavado con ACN/buffer 50:50 v/v (MIP 2)



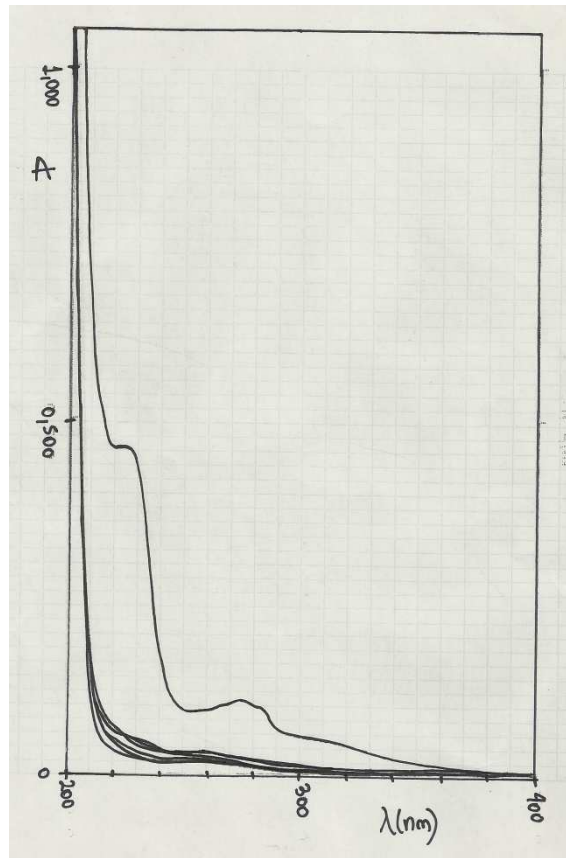


Figura 79. Espectros de absorción de las fracciones recolectadas. Lavado con buffer (MIP 2)

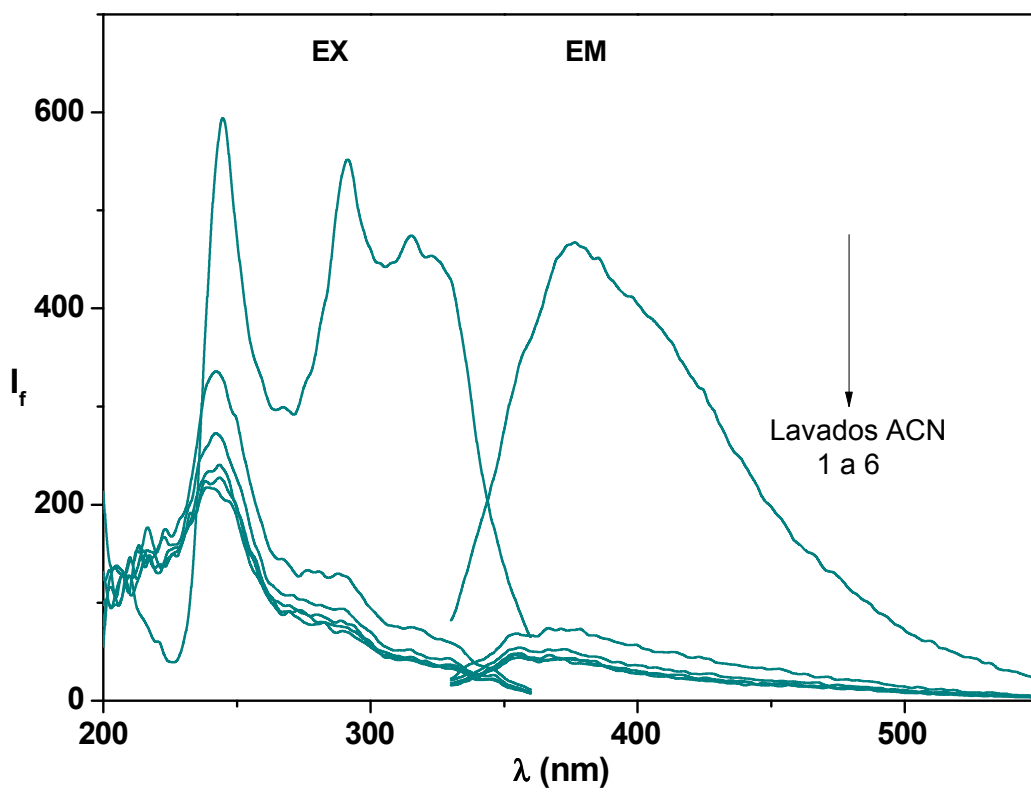


Figura 80. Espectros de fluorescencia de las fracciones recolectadas (MIP 2)

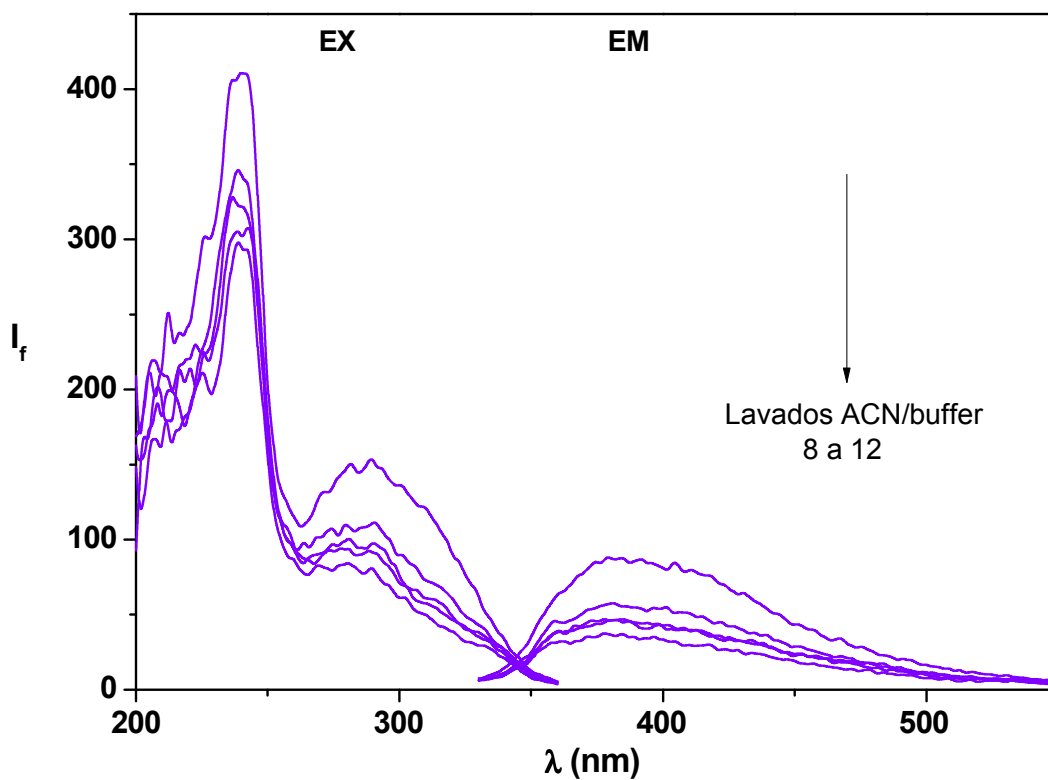


Figura 81. Espectros de fluorescencia de las fracciones recolectadas (MIP 2)

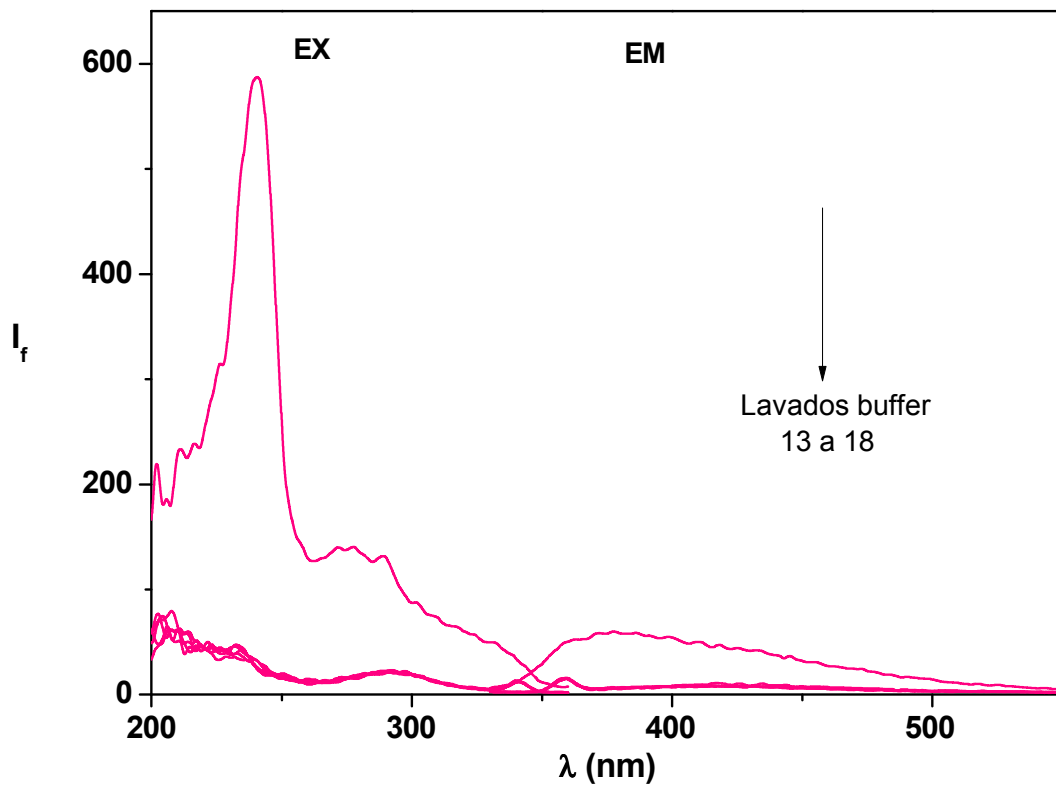
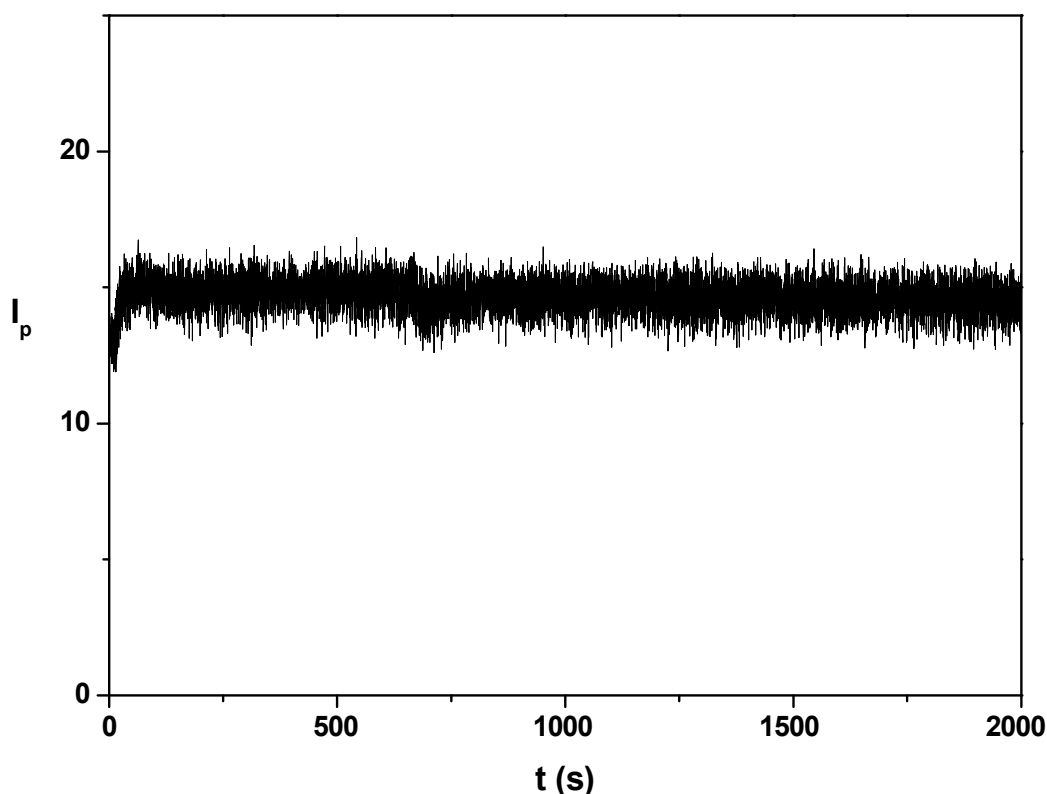


Figura 82. Espectros de fluorescencia de las fracciones recolectadas (MIP 2)

Como puede observarse en los espectros, más claramente en los de emisión de fluorescencia (Figura 76), la warfarina sigue unida al QD luego de los tres lavados realizados. Dado que los métodos de preparación de muestra para el análisis de warfarina en comprimidos comerciales se realizan en ACN/buffer (15:85 v/v), se propuso utilizar dicha proporción de solventes para el siguiente lavado. La Figura 83 muestra el fiagrama correspondiente al lavado, las Figuras 84 y 85 los espectros de fosforescencia y fluorescencia del MIP, respectivamente, antes y después del lavado y la Figura 86 los espectros de fluorescencia de las fracciones recolectadas.



**Figura 83.** Fiagrama: lavado del MIP con ACN/buffer 15:85 v/v (MIP 2)

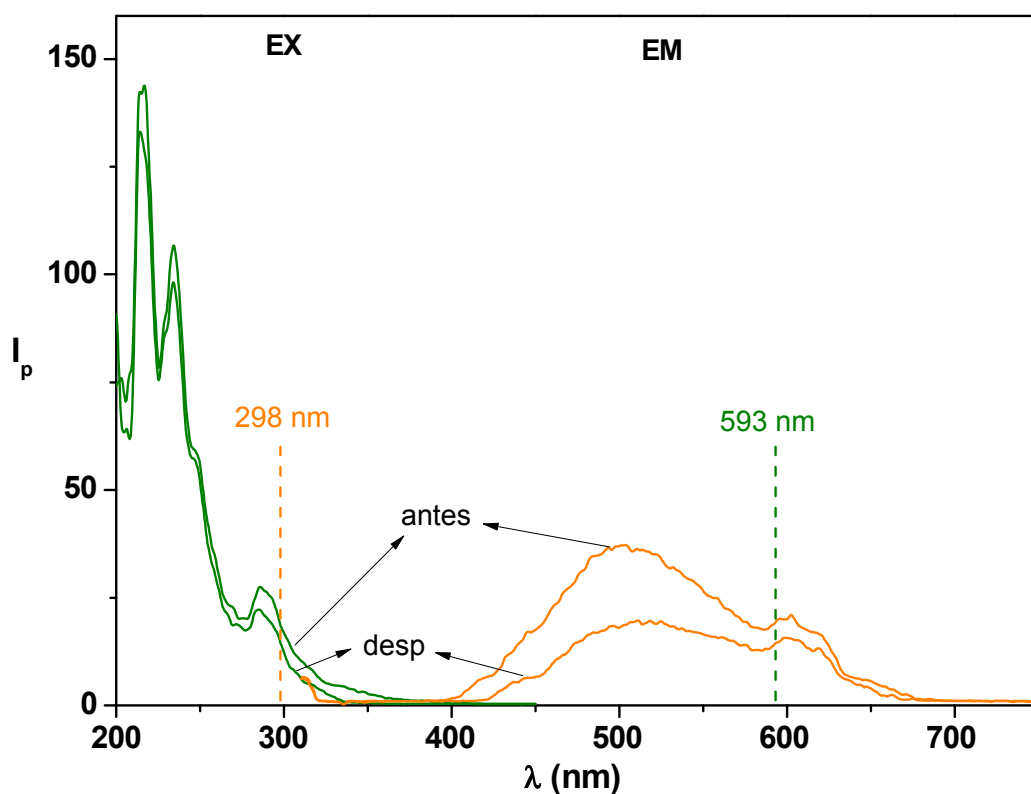


Figura 84. Espectros de fosforescencia antes y después del lavado con ACN/buffer 15:85 v/v (MIP 2)

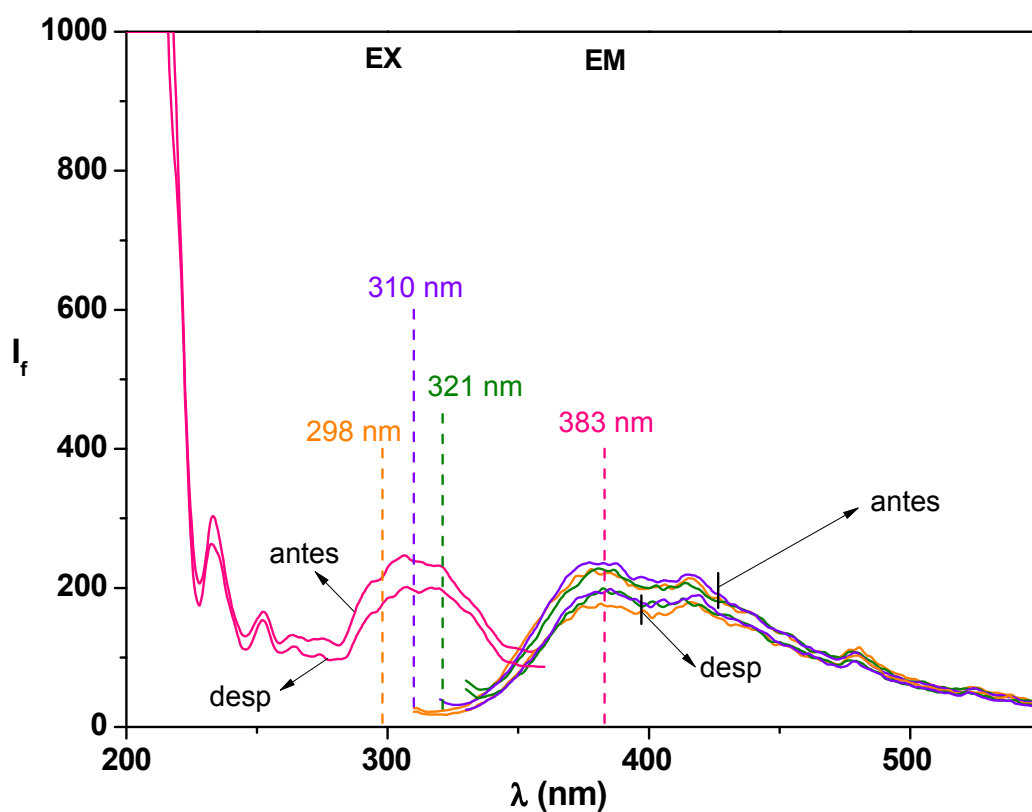
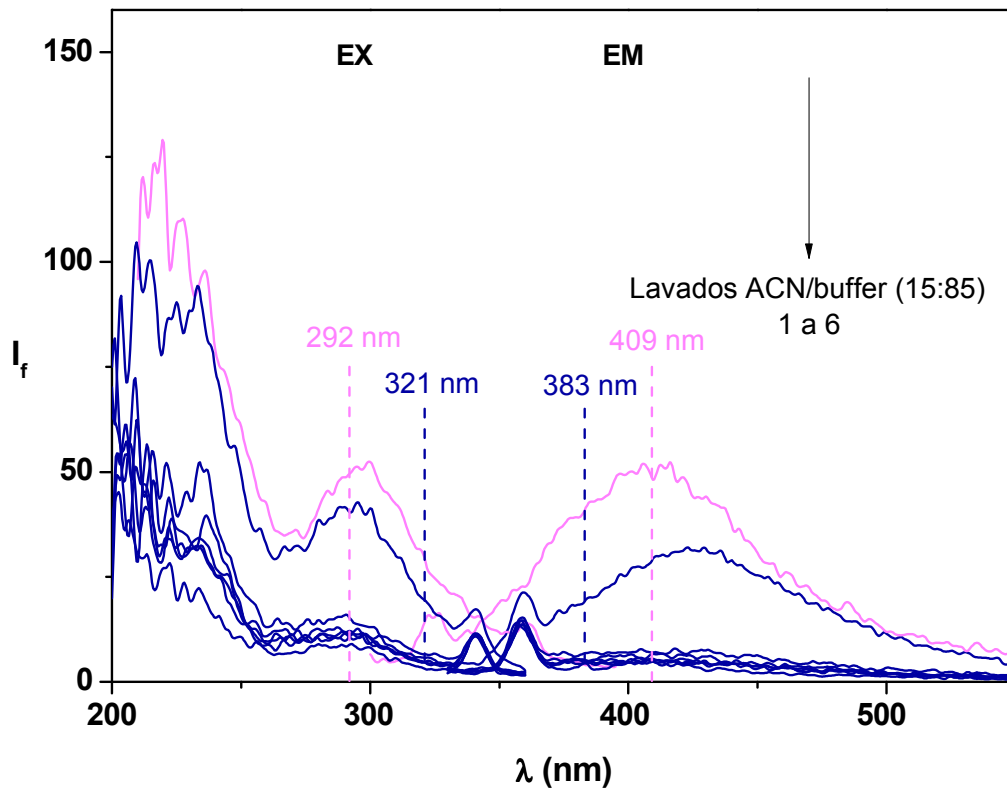
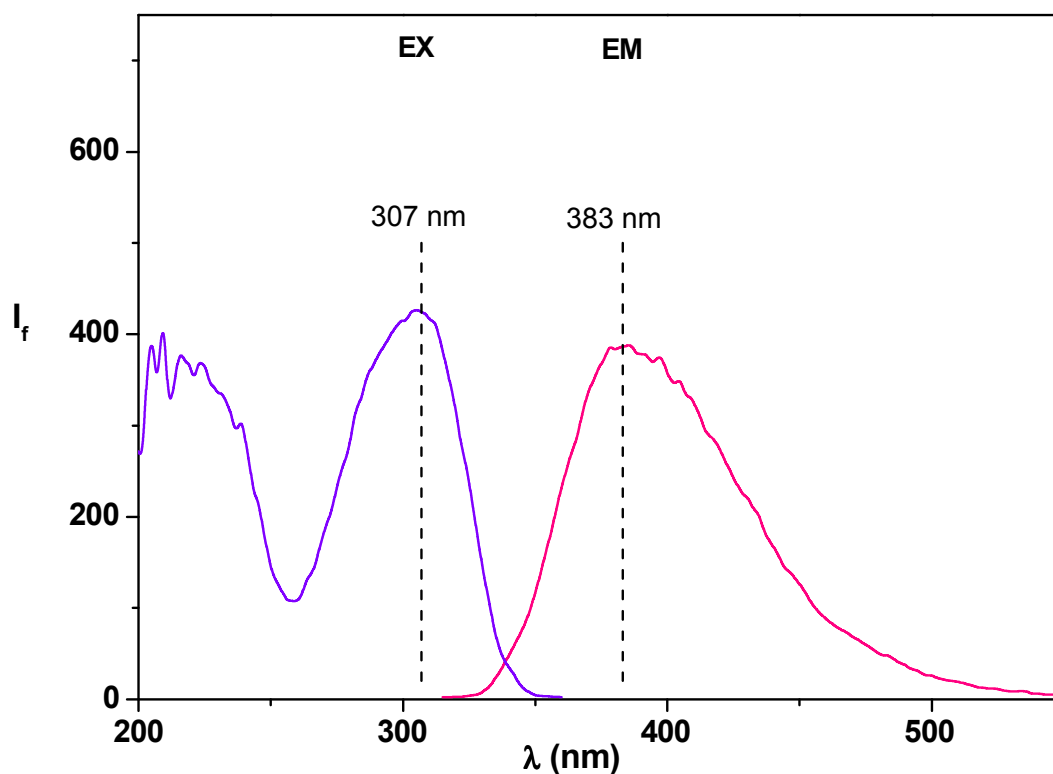


Figura 85. Espectros de fluorescencia antes y después del lavado con ACN/buffer 15:85 v/v excitando a tres longitudes de onda (MIP 2)



**Figura 86.** Espectros de fluorescencia de las fracciones recolectadas (MIP 2)

La Figura 87 muestra los espectros de excitación y emisión de la warfarina en ACN/buffer 15:85 v/v. Puede verse que el máximo de emisión se centra en 383 nm por lo que las emisiones registradas cerca de 420 nm (espectros de fluorescencia del MIP luego de los lavados) podrían corresponder a un posible lixiviado de los QDs del MIP.



**Figura 87.** Espectros de excitación y emisión de fluorescencia de la warfarina en ACN/buffer 15:85 v/v

A fin de eliminar completamente la warfarina del MIP, la cual se supone está unida fuertemente al recubrimiento de L-cisteína del QD, se probó una extracción sólido-líquido con una mezcla metanol/ácido acético 90:10 (v/v) mediante Soxhlet durante 24 horas (MIP/NIP nuevo y en mayor cantidad; en los anteriores, los lavados eran sucesivos sobre el mismo polímero empaquetado en la celda de flujo; segunda síntesis) –dos lavados-. Se repitió el procedimiento de extracción, pero utilizando sólo metanol como solvente de lavado. Los polímeros se secaron en estufa a 40 °C durante 24 horas. La Figura 88 muestra el espectro de absorción de la mezcla metanol/acético. Las Figuras 89, 90 y 91 muestran los espectros de absorción de los remanentes de solvente en los balones luego de cada lavado. Las Figuras 92 y 93 muestran los espectros de fosforescencia y fluorescencia, respectivamente, del polímero lavado.

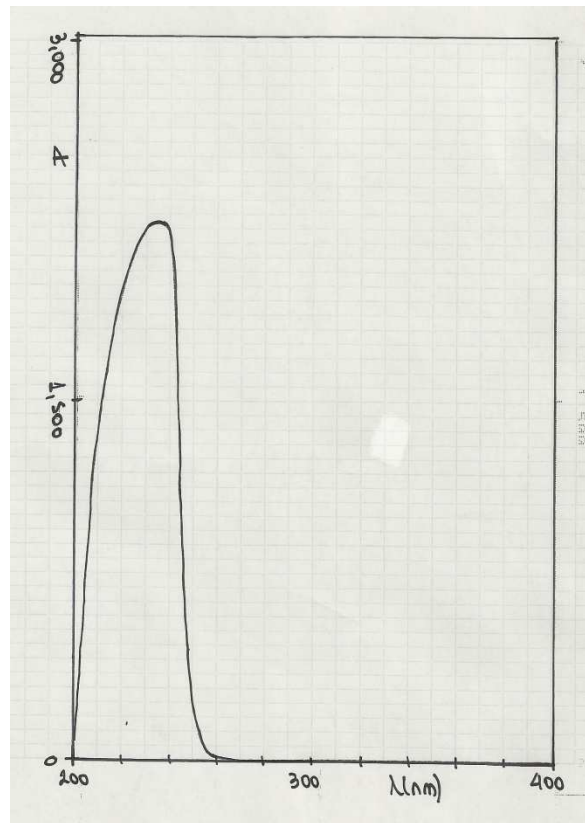


Figura 88. Espectro de absorción de la mezcla metanol/acético 90:10 v/v

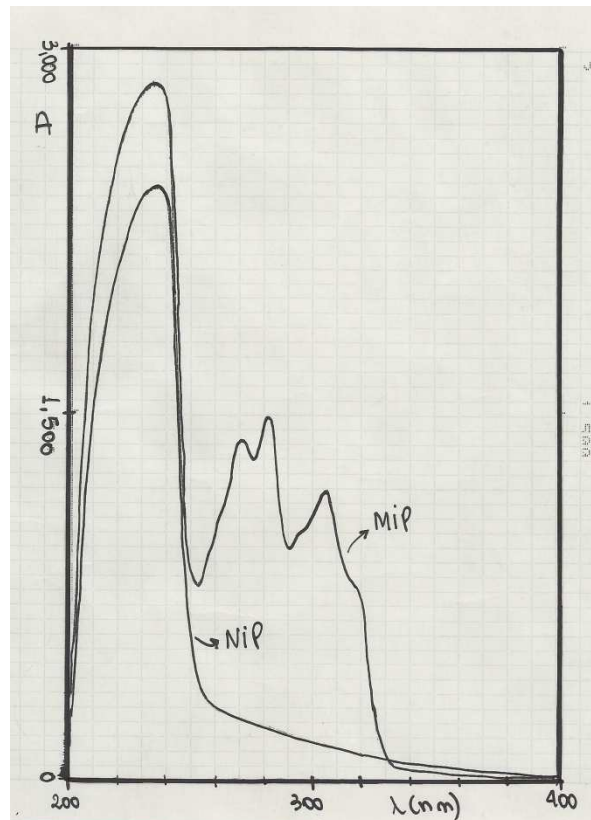


Figura 89. Espectros de absorción del primer lavado con metanol/acético 90:10 v/v

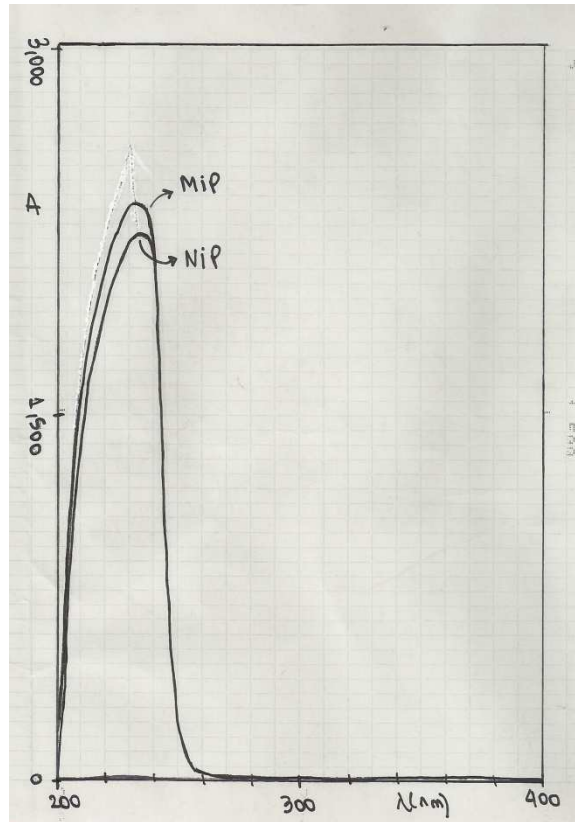


Figura 90. Espectros de absorción del segundo lavado con metanol/acético 90:10 v/v

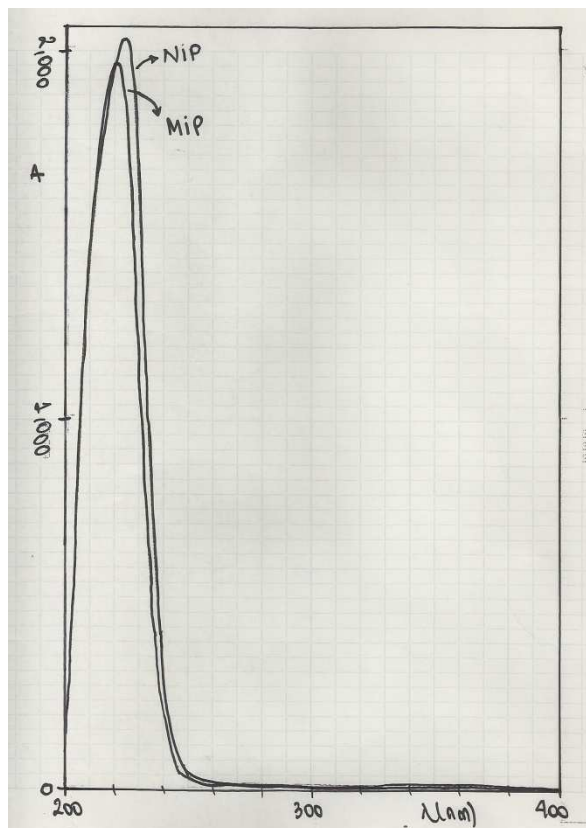


Figura 91. Espectros de absorción del lavado con metanol



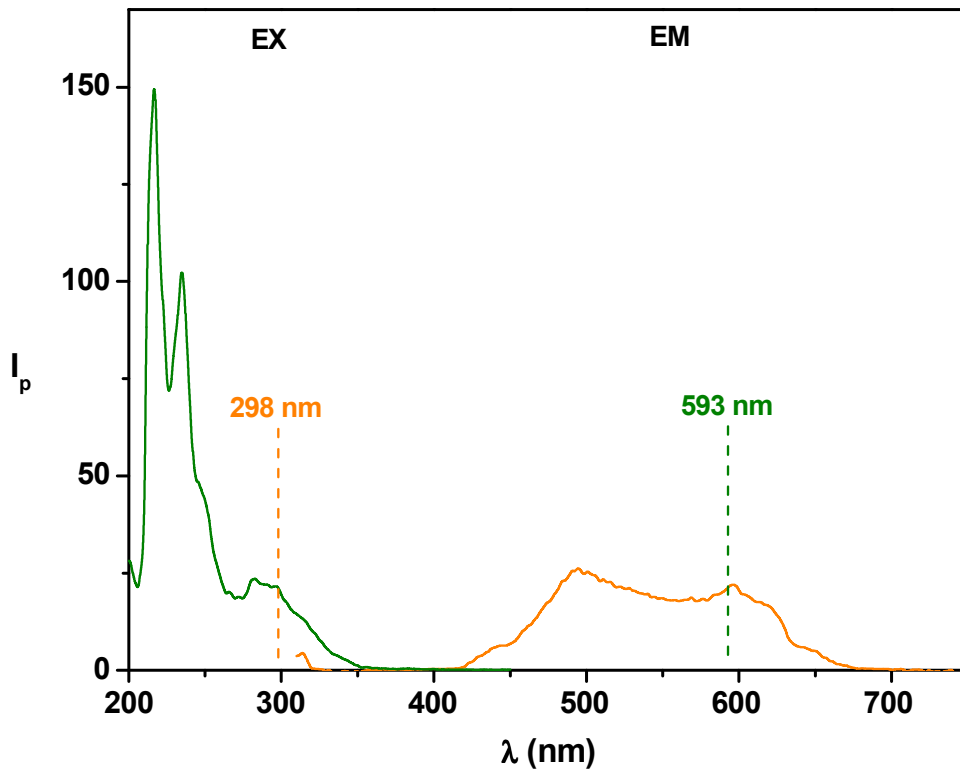


Figura 92. Espectros de fosforescencia luego del lavado con metanol/acético 90:10 v/v y metanol (MIP 2)

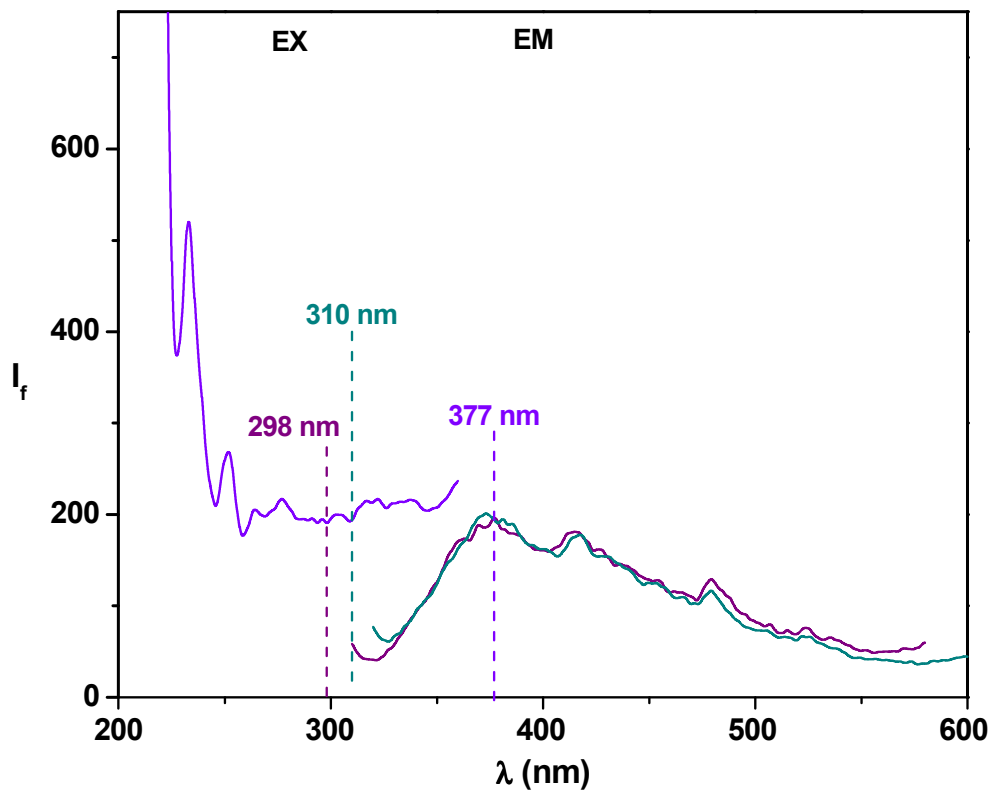
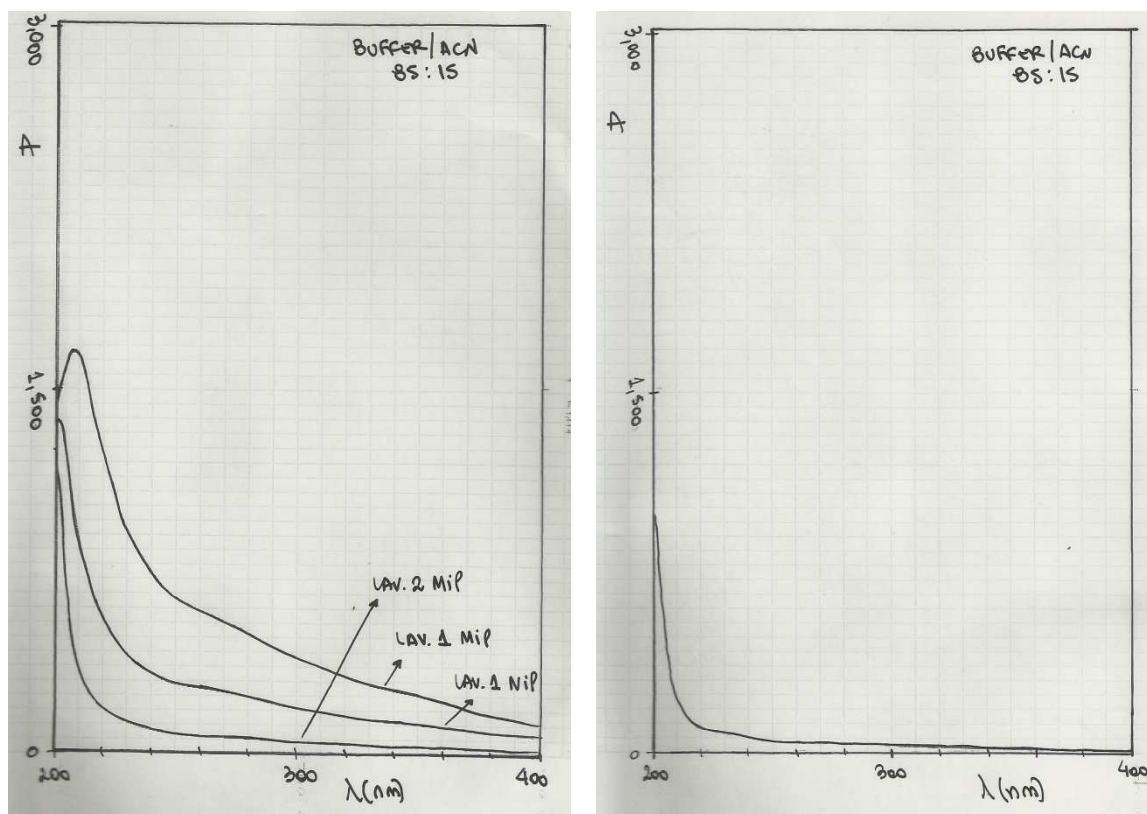


Figura 93. Espectros de fluorescencia luego de los lavados con metanol/acético 90:10 v/v y metanol, excitando a dos longitudes de onda (MIP 2)

Como puede observarse, pareciera que la warfarina es removida del MIP en el primer lavado dado que en los lavados posteriores no se observa su presencia. La Figura 92 debería compararse con la Figura 72 (MIP antes); no se observan diferencias significativas entre los espectros de fosforescencia antes y después de los lavados con metanol/acético y metanol. Si se compara la Figura 93 con la Figura 73 puede observarse que, luego de los lavados con metanol/acético y metanol, la intensidad de fluorescencia correspondiente a la banda de la warfarina es de menor intensidad que la obtenida luego del lavado con sólo metanol; el lavado con metanol/acético removería de manera más eficiente a la warfarina aunque no de manera completa (aún se observa emisión de la misma).

Se procedió a una nueva extracción en Soxhlet de los polímeros anteriormente lavados con metanol/acético y metanol. Se utilizó en primera instancia una mezcla ACN/buffer 15:85 v/v (dos lavados para el MIP, un lavado para el NIP) y luego metanol (un lavado). Las Figuras 94 y 95 muestran los espectros de absorción de los remanentes de solvente en el balón luego de cada lavado con su respectivo espectro del solvente puro. Las Figuras 96 y 97 muestran los espectros de fosforescencia y fluorescencia, respectivamente, del MIP luego del lavado con ACN/buffer y metanol.



**Figura 94.** Espectros de absorción del lavado con ACN/buffer y el correspondiente espectro de absorción de la mezcla ACN/buffer

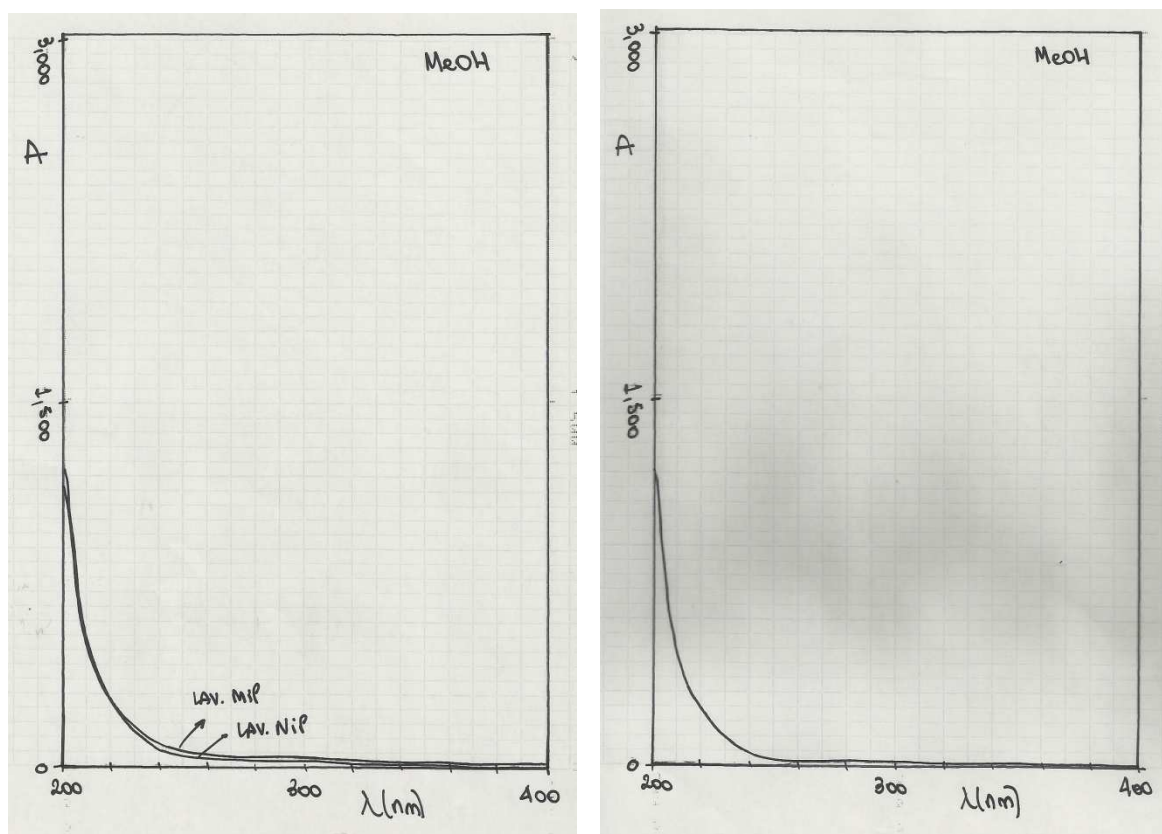


Figura 95. Espectros de absorción del lavado con metanol y el correspondiente espectro de absorción del metanol

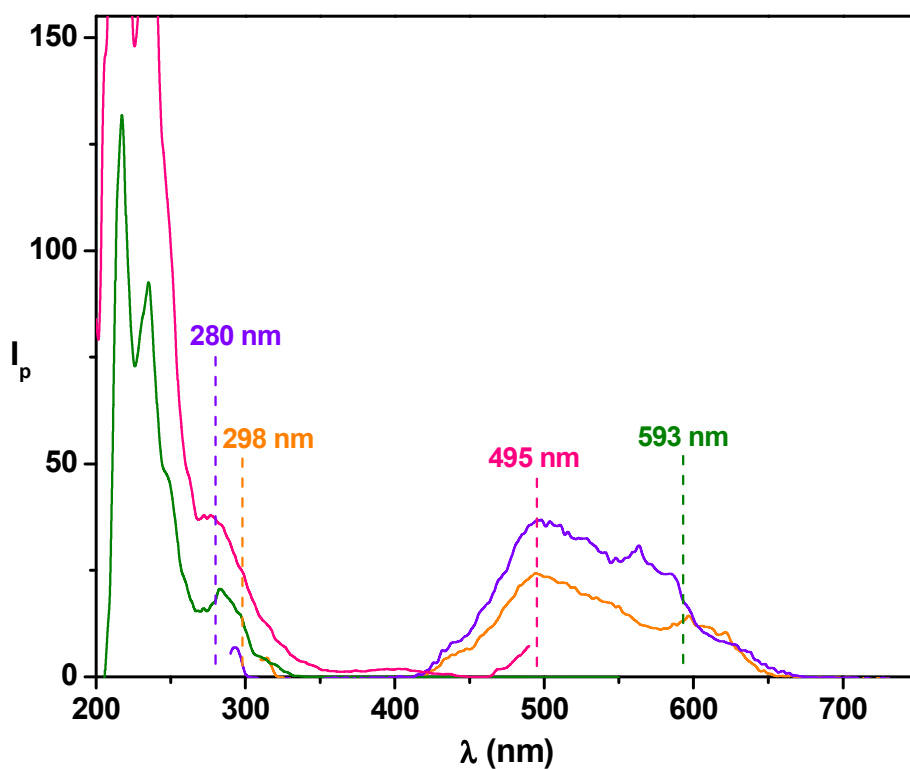
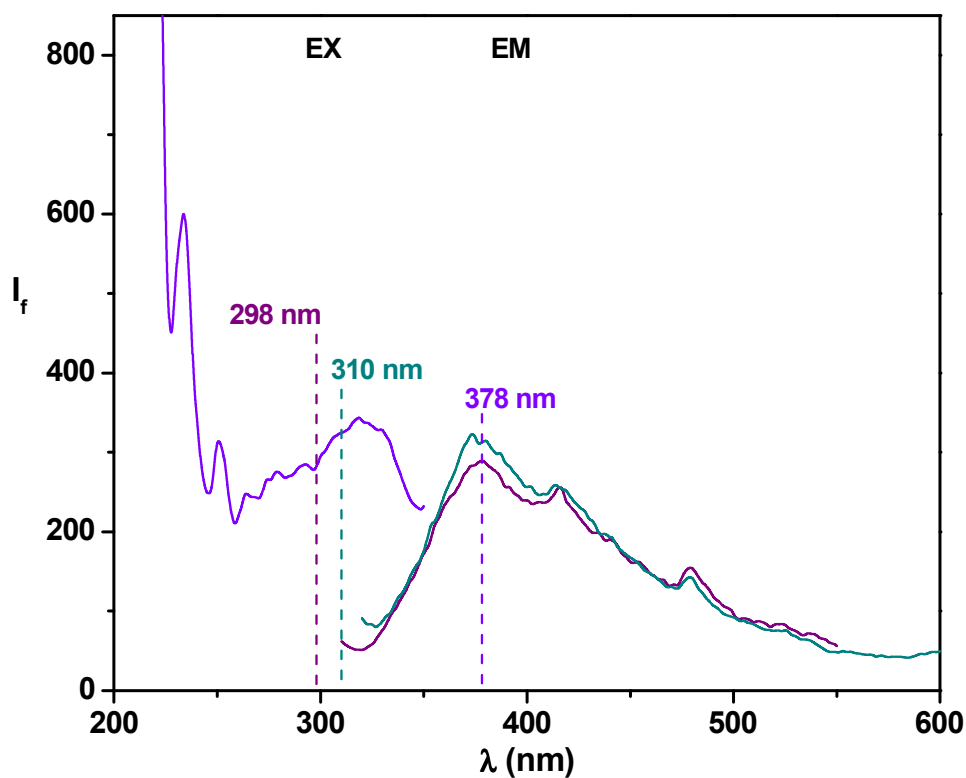


Figura 96. Espectros de fosforescencia luego del lavado con ACN/buffer y metanol, excitando a dos longitudes de onda (MIP 2)



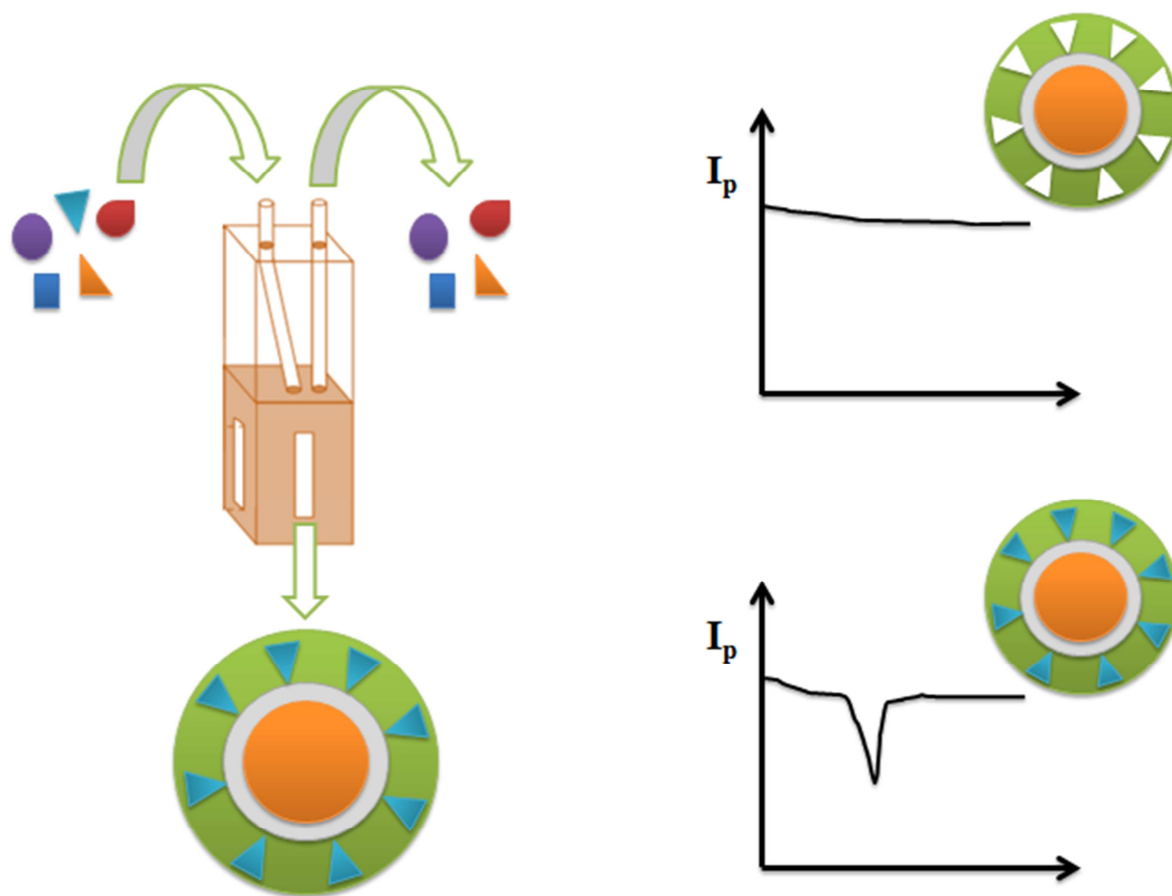
**Figura 97.** Espectros de fluorescencia luego del lavado con ACN/buffer y metanol, excitando a dos longitudes de onda (MIP 2)

En los espectros de absorción, no se observa remoción de la warfarina con los lavados. Los espectros de fluorescencia muestran que aún se encuentra en el polímero.

La Figura 96 muestra que la banda cercana a 500 nm pertenece al QD –también observada en los lavados anteriores-.

Evidentemente, no se ha podido alcanzar la extracción completa de la warfarina en los lavados sucesivos efectuados. Probablemente, la unión con la L-cisteína sea fuerte y por consiguiente el lavado de los QDs impresos no sea efectivo con los solventes convencionales.

### 3.2. Desarrollo de un optosensor para el reconocimiento selectivo de warfarina



**Figura 98.** Resumen gráfico: Desarrollo de un optosensor para el reconocimiento selectivo de warfarina

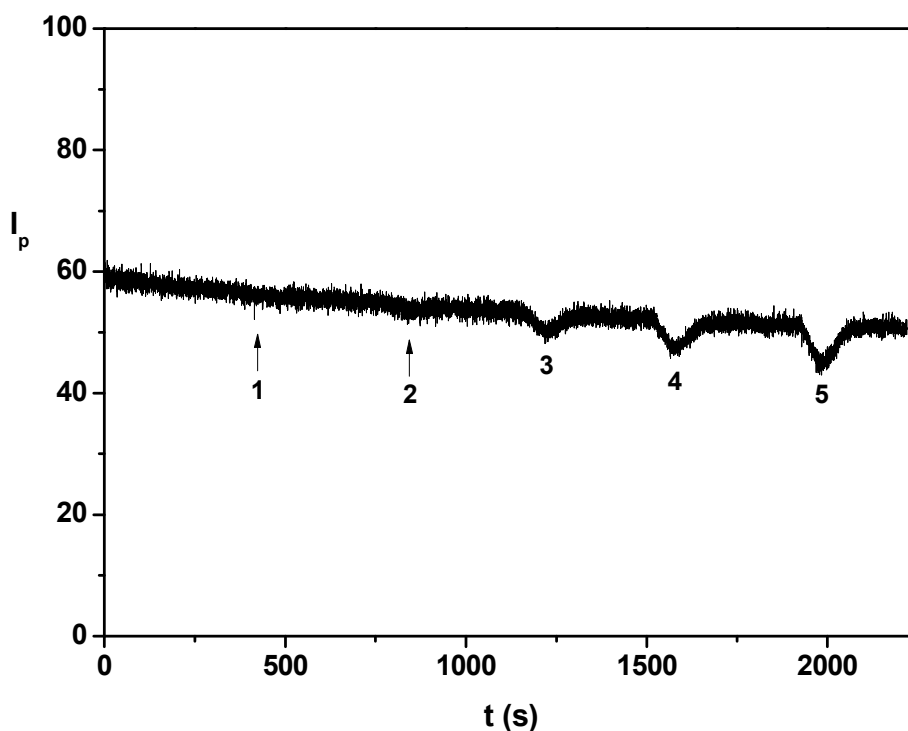
A pesar de no haber podido remover completamente a la warfarina del polímero impreso, se evaluó la capacidad del mismo como optosensor fosforescente.

#### 3.2.1. MIP/NIP primera síntesis

Luego del lavado de los polímeros con metanol en la celda de flujo, y de la estabilización de la intensidad de fosforescencia registrada en el tiempo, se procedió a la inyección de disoluciones de warfarina de concentración creciente (fase móvil: metanol).

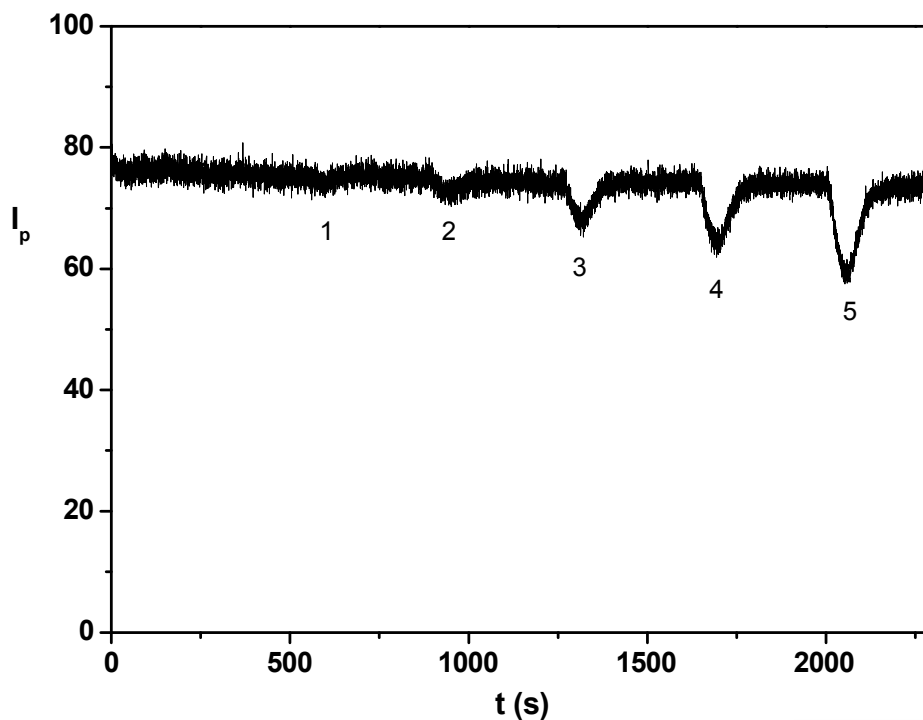
Como puede observarse en la Figura 99, el MIP es capaz de reconocer y retener a la warfarina por un determinado período de tiempo durante el cual se registra un pico negativo en la señal. El pico negativo observado puede explicarse en términos del quenching de la fosforescencia de los QDs que componen los polímeros impresos.

En el caso del NIP, éste fue capaz de reconocer a la warfarina indicando que posiblemente el mecanismo de respuesta no sólo se fundamenta en la interacción con la cavidad de reconocimiento sino también por interacción con los QDs superficiales (Figura 100).



**Figura 99.** Inyección de disoluciones de warfarina en metanol (MIP 1)

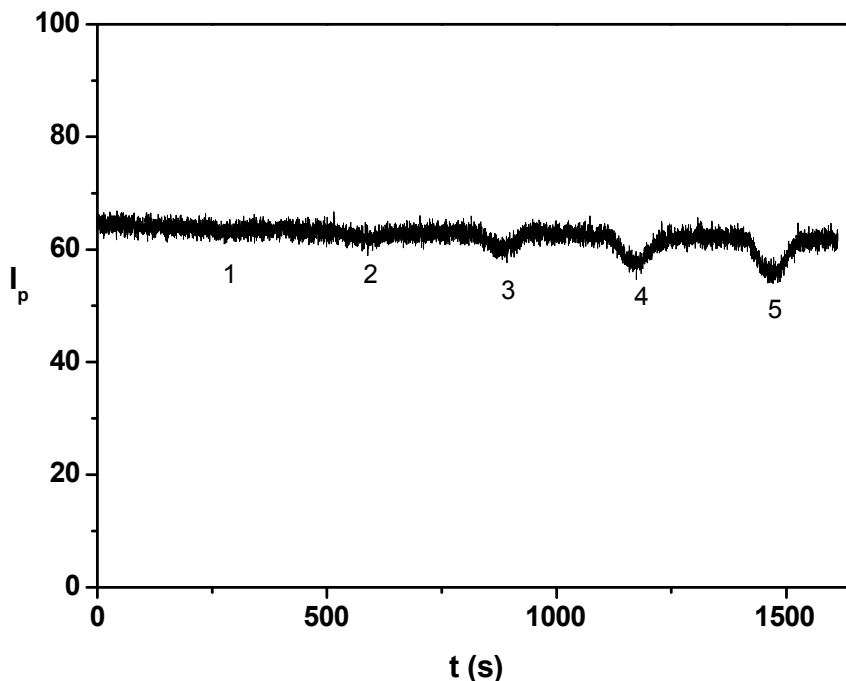
[war] (M): 1 =  $5,00 \times 10^{-6}$ ; 2 =  $1,00 \times 10^{-5}$ ; 3 =  $3,00 \times 10^{-5}$ ; 4 =  $5,00 \times 10^{-5}$ ; 5 =  $7,00 \times 10^{-5}$



**Figura 100.** Inyección de disoluciones de warfarina en metanol (NIP 1)

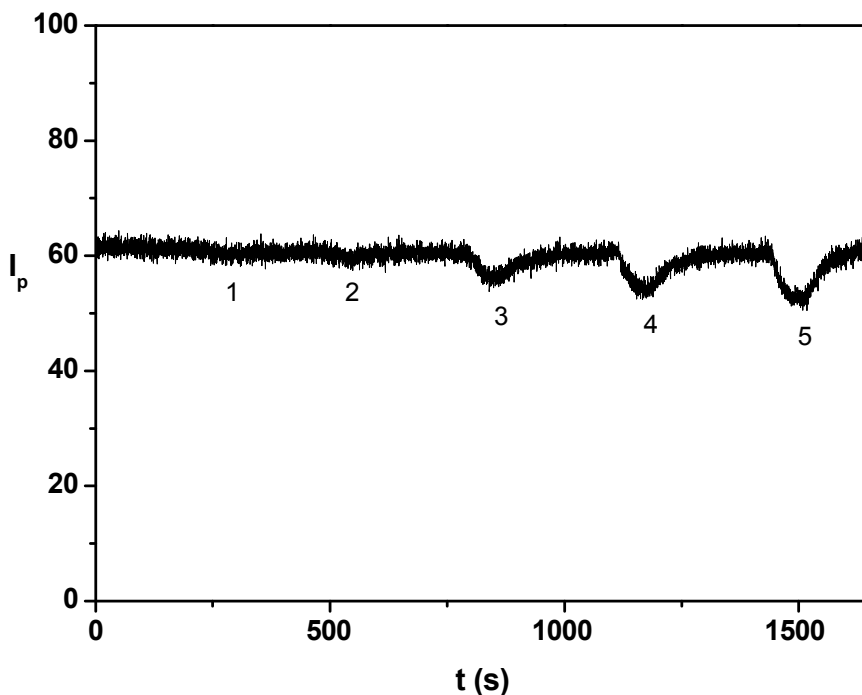
[war] (M): 1 =  $5,00 \times 10^{-6}$ ; 2 =  $1,00 \times 10^{-5}$ ; 3 =  $3,00 \times 10^{-5}$ ; 4 =  $5,00 \times 10^{-5}$ ; 5 =  $7,00 \times 10^{-5}$

A fin de verificar si los QDs superficiales, aquellos que no se encuentran rodeados por la cavidad de reconocimiento creada en la polimerización –la polimerización crearía una “capa” alrededor del QD, ver esquema de la Figura 58 y 98-, son capaces de interactuar con las demás cumarinas en estudio, se realizaron inyecciones de disoluciones de las mismas (Figuras 101, 102 y 103).



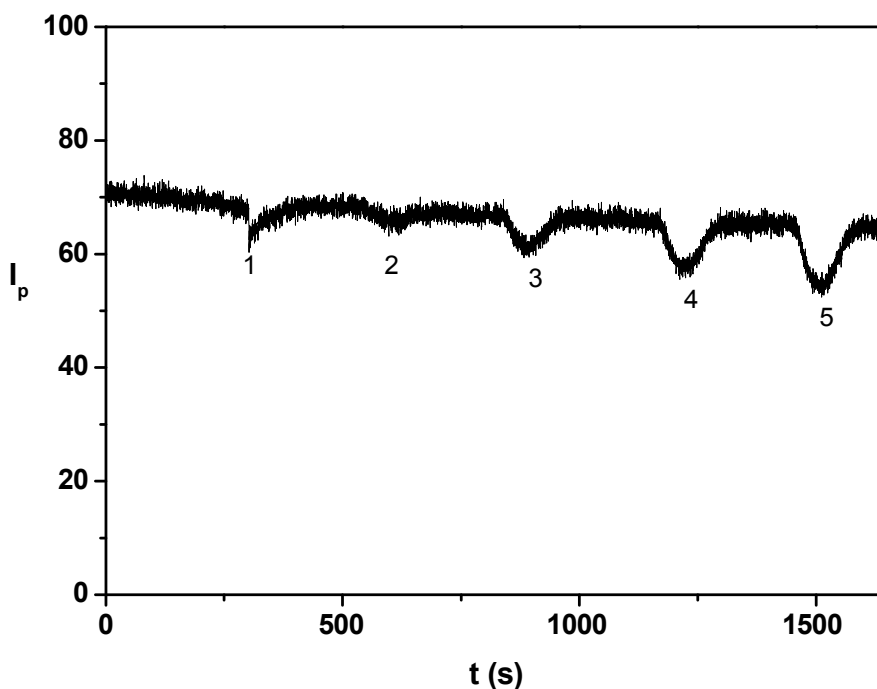
**Figura 101.** Inyección de disoluciones de cumarina en metanol (NIP 1)

[cou] (M): 1 =  $5,00 \times 10^{-6}$ ; 2 =  $1,00 \times 10^{-5}$ ; 3 =  $3,00 \times 10^{-5}$ ; 4 =  $5,00 \times 10^{-5}$ ; 5 =  $7,00 \times 10^{-5}$



**Figura 102.** Inyección de disoluciones de dicumarol en metanol (NIP 1)

[dic] (M): 1 =  $5,00 \times 10^{-6}$ ; 2 =  $1,00 \times 10^{-5}$ ; 3 =  $3,00 \times 10^{-5}$ ; 4 =  $5,00 \times 10^{-5}$ ; 5 =  $7,00 \times 10^{-5}$



**Figura 103.** Inyección de disoluciones de umbeliferona en metanol (NIP 1)

[umb] (M): 1 =  $5,00 \times 10^{-6}$ ; 2 =  $1,00 \times 10^{-5}$ ; 3 =  $3,00 \times 10^{-5}$ ; 4 =  $5,00 \times 10^{-5}$ ; 5 =  $7,00 \times 10^{-5}$

Evidentemente, la respuesta del optosensor no se basa sólo en el reconocimiento de la warfarina por la cavidad sino también por interacción con los QDs presentes en los polímeros al registrarse un quenching de la RTP del NIP. La magnitud del quenching por parte de la warfarina en el NIP es mayor al registrado en el MIP; podría pensarse que el hecho que la warfarina aún se encuentra alojada en el MIP (al no ser el lavado eficiente) imposibilita la interacción de la warfarina inyectada con los QDs del mismo, es decir, parte de los QDs quedaron unidos a la warfarina luego de la polimerización y posterior lavado con metanol.

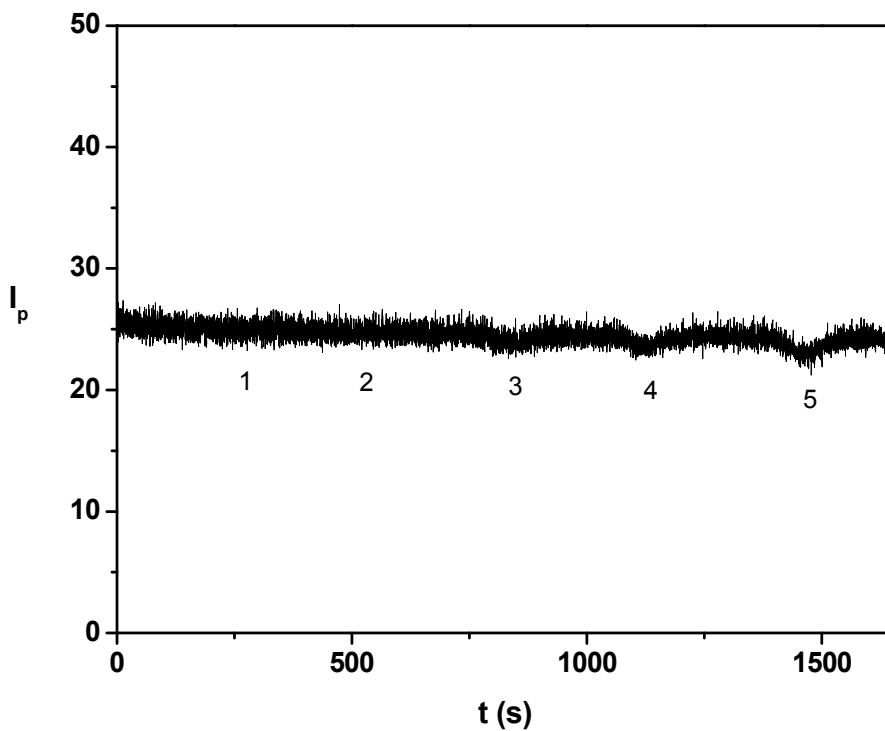
### 3.2.2. MIP/NIP segunda síntesis

Se procedió de manera análoga, verificando la capacidad de reconocimiento de los polímeros empaquetados en la celda de flujo luego de cada lavado en la misma y luego de los lavados en Soxhlet (el polímero se secaba en estufa a  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas y luego se empaquetaba en la celda de flujo para los ensayos FIA).

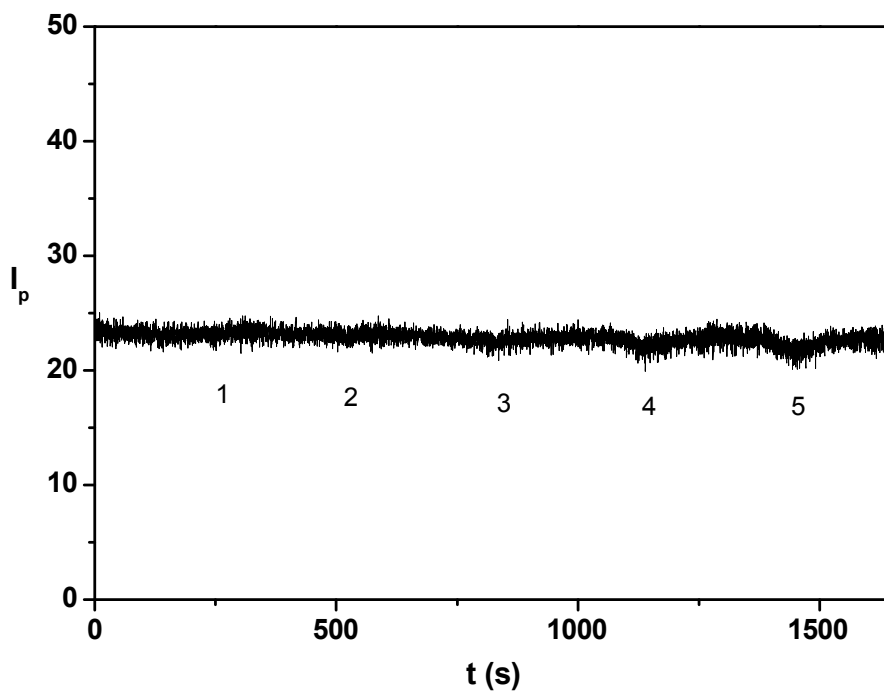
#### 3.2.2.1. Prueba luego de los lavados en celda de flujo

Las Figuras 104, 105, 106 y 107 muestran los diagramas para el MIP, lavado con metanol, luego de la inyección de disoluciones de las cumarinas en estudio (fase móvil: metanol).

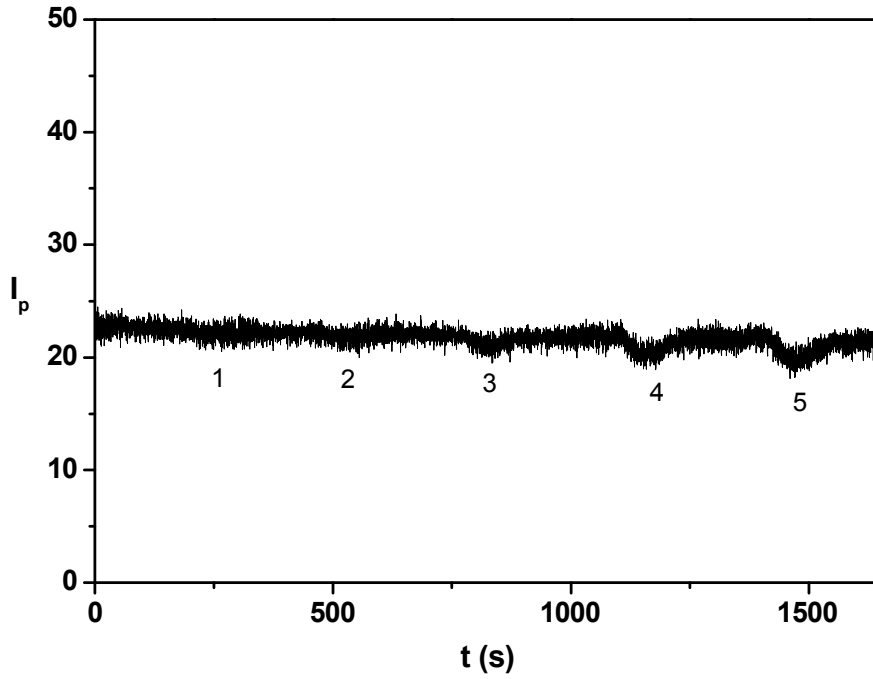




**Figura 104.** Inyección de disoluciones de warfarina en metanol (MIP 2)  
[war] (M): 1 =  $5,00 \times 10^{-6}$ ; 2 =  $1,00 \times 10^{-5}$ ; 3 =  $3,00 \times 10^{-5}$ ; 4 =  $5,00 \times 10^{-5}$ ; 5 =  $7,00 \times 10^{-5}$

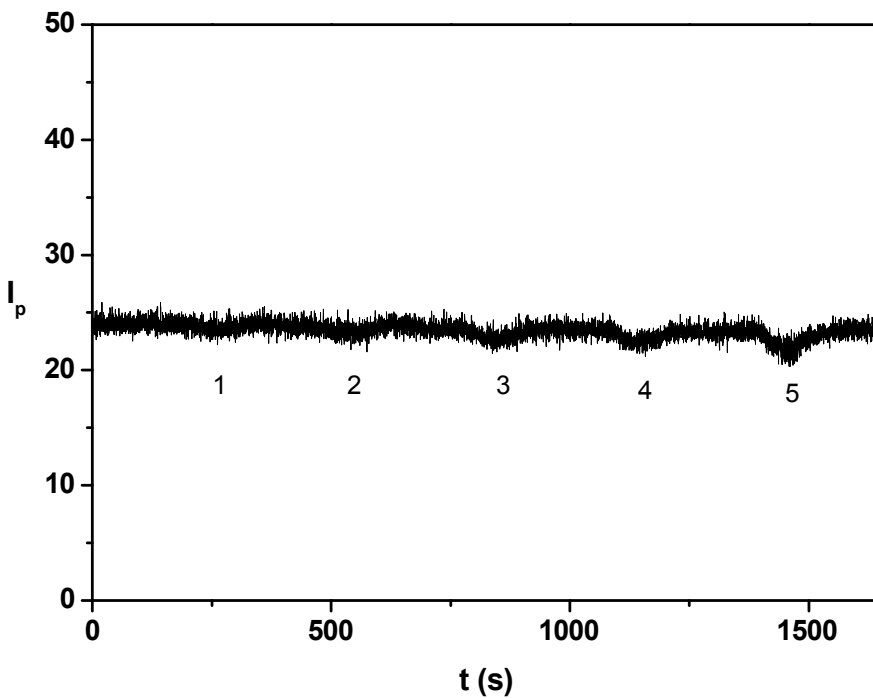


**Figura 105.** Inyección de disoluciones de cumarina en metanol (MIP 2)  
[cou] (M): 1 =  $5,00 \times 10^{-6}$ ; 2 =  $1,00 \times 10^{-5}$ ; 3 =  $3,00 \times 10^{-5}$ ; 4 =  $5,00 \times 10^{-5}$ ; 5 =  $7,00 \times 10^{-5}$



**Figura 106.** Inyección de disoluciones de dicumarol en metanol (MIP 2)

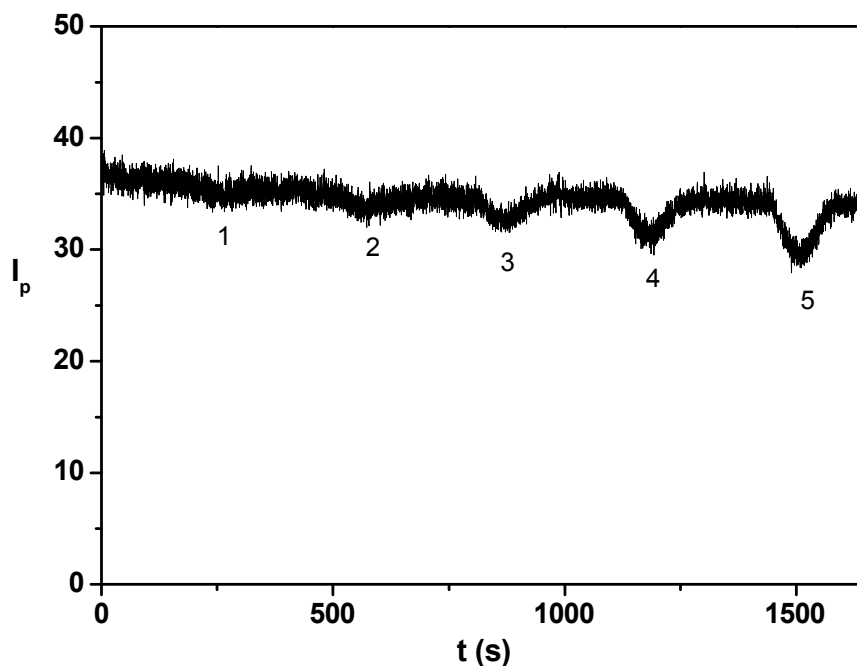
[dic] (M): 1 =  $5,00 \times 10^{-6}$ ; 2 =  $1,00 \times 10^{-5}$ ; 3 =  $3,00 \times 10^{-5}$ ; 4 =  $5,00 \times 10^{-5}$ ; 5 =  $7,00 \times 10^{-5}$



**Figura 107.** Inyección de disoluciones de umbeliferona en metanol (MIP 2)

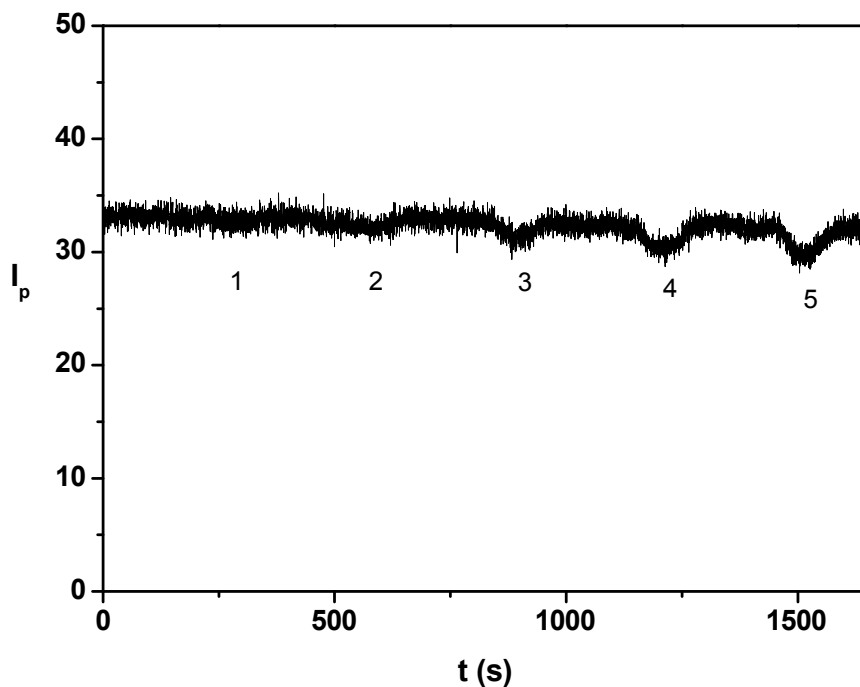
[umb] (M): 1 =  $5,00 \times 10^{-6}$ ; 2 =  $1,00 \times 10^{-5}$ ; 3 =  $3,00 \times 10^{-5}$ ; 4 =  $5,00 \times 10^{-5}$ ; 5 =  $7,00 \times 10^{-5}$

Las Figuras 108, 109, 110 y 111 muestran los diagramas para el NIP, lavado con metanol, luego de la inyección de disoluciones de las cumarinas en estudio (fase móvil: metanol).



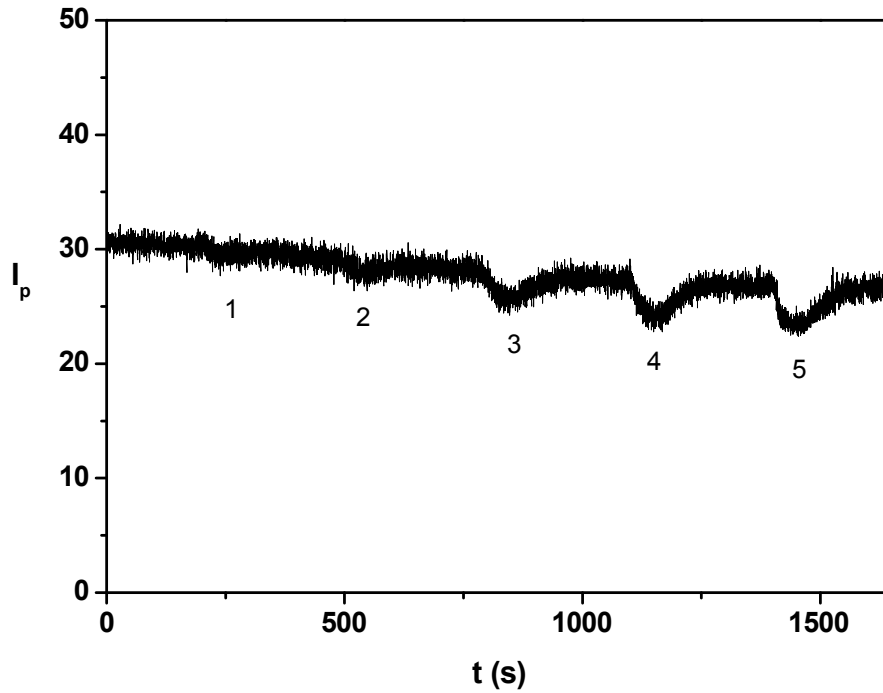
**Figura 108.** Inyección de disoluciones de warfarina en metanol (NIP 2)

[war] (M): 1 =  $5,00 \times 10^{-6}$ ; 2 =  $1,00 \times 10^{-5}$ ; 3 =  $3,00 \times 10^{-5}$ ; 4 =  $5,00 \times 10^{-5}$ ; 5 =  $7,00 \times 10^{-5}$

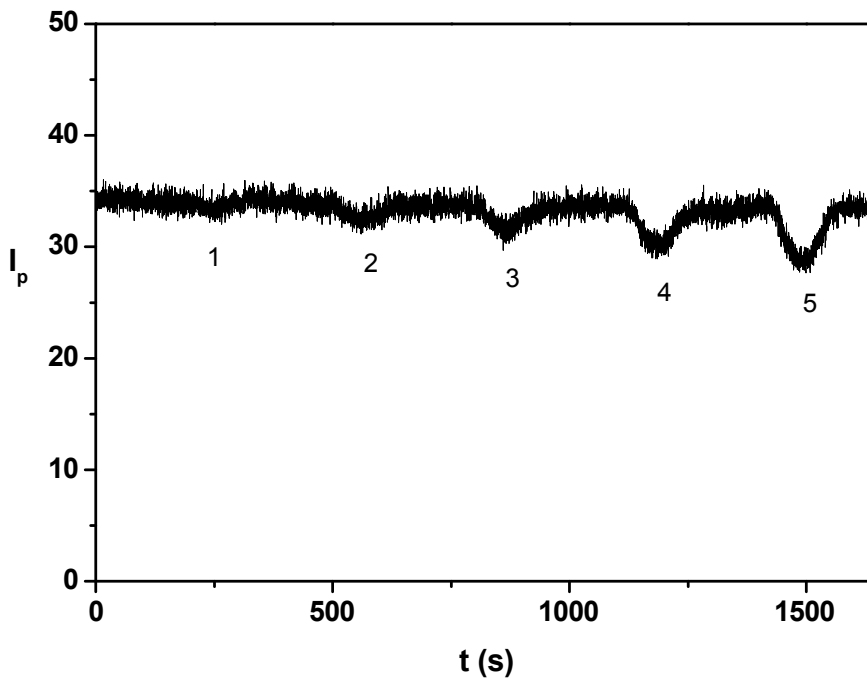


**Figura 109.** Inyección de disoluciones de cumarina en metanol (NIP 2)

[cou] (M): 1 =  $5,00 \times 10^{-6}$ ; 2 =  $1,00 \times 10^{-5}$ ; 3 =  $3,00 \times 10^{-5}$ ; 4 =  $5,00 \times 10^{-5}$ ; 5 =  $7,00 \times 10^{-5}$



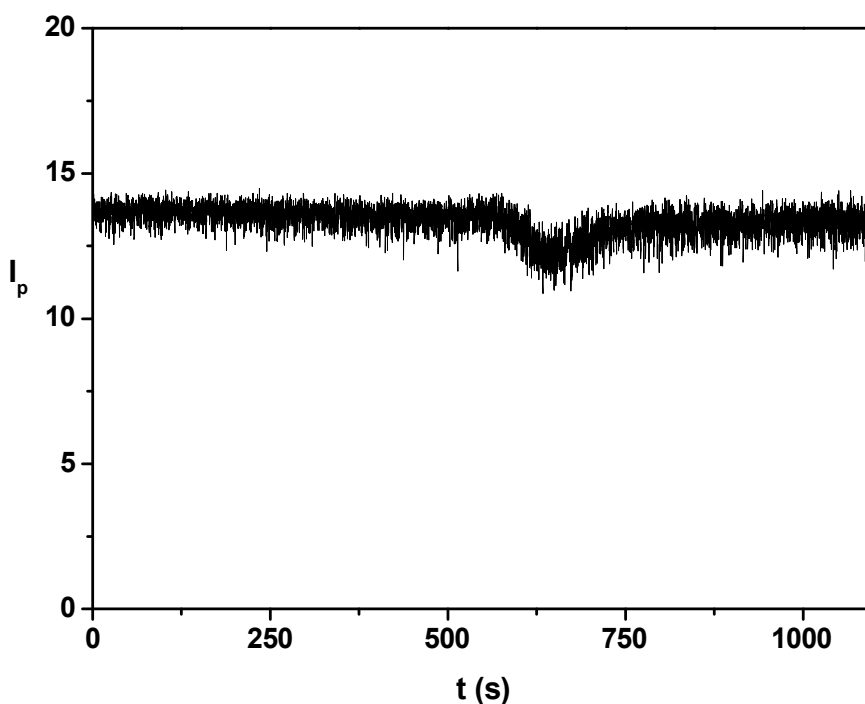
**Figura 110.** Inyección de disoluciones de dicumarol en metanol (NIP 2)  
[dic] (M): 1 =  $5,00 \times 10^{-6}$ ; 2 =  $1,00 \times 10^{-5}$ ; 3 =  $3,00 \times 10^{-5}$ ; 4 =  $5,00 \times 10^{-5}$ ; 5 =  $7,00 \times 10^{-5}$



**Figura 111.** Inyección de disoluciones de umbeliferona en metanol (NIP 2)  
[umb] (M): 1 =  $5,00 \times 10^{-6}$ ; 2 =  $1,00 \times 10^{-5}$ ; 3 =  $3,00 \times 10^{-5}$ ; 4 =  $5,00 \times 10^{-5}$ ; 5 =  $7,00 \times 10^{-5}$

De los fiagramas, se puede notar: (i) la emisión de fosforescencia base es menor que la correspondiente a la primera síntesis, (ii) la respuesta del NIP es mayor que la del MIP para todas la cumarinas. El primer punto para el caso de los MIPs se explica en función de la mayor relación warfarina/QD adicionada en la segunda síntesis respecto de la primera; a mayor cantidad de warfarina presente, mayor es el quenching de la fosforescencia del MIP. En el caso de los NIPs, la cantidad de QD adicionada en la segunda síntesis es menor que la adicionada en la primera por lo que la intensidad de fosforescencia base es menor para el NIP 2 (menor cantidad de luminóforos presentes). El segundo punto puede explicarse en base a la presencia de la warfarina en el MIP y su consiguiente interacción con los QDs: la fosforescencia base del MIP es menor a la del NIP, sólo los QDs que no se encuentren interaccionando con la warfarina son los que podrán interaccionar con las cumarinas adicionadas (incluyendo a la warfarina).

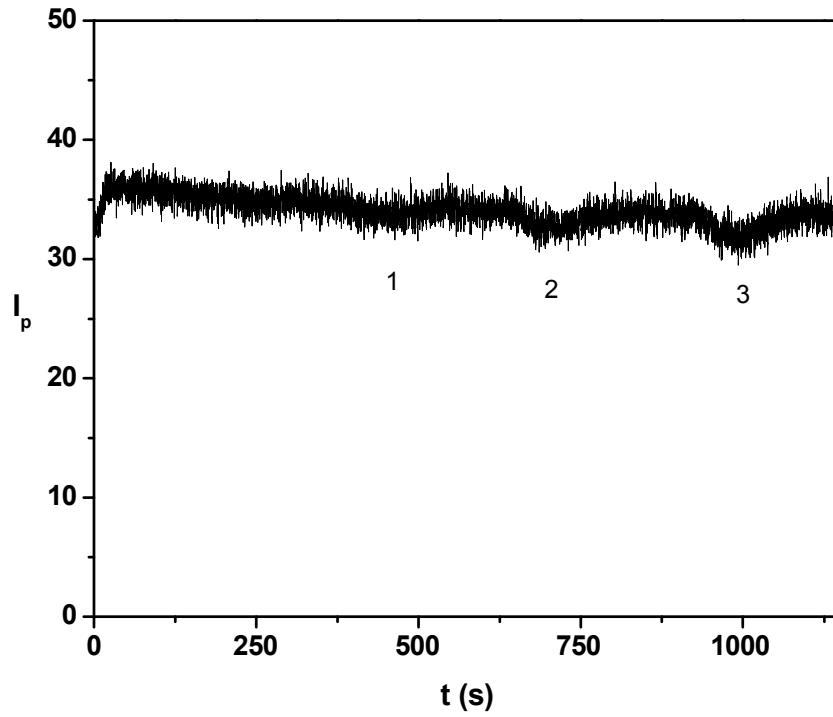
Luego de los lavados del MIP con ACN, ACN/buffer 50:50 v/v, buffer y ACN/buffer 15:85 v/v (lavados sucesivos), se inyectó una disolución de warfarina  $7,00 \times 10^{-5}$  M en ACN/buffer (15:85 v/v). La Figura 112 muestra el fiagrama obtenido (fase móvil: ACN/buffer 15:85 v/v). Como puede verse, la intensidad de fosforescencia base es menor a la registrada en las Figuras 104 a 107 lo que podría indicar un posible lixiviado de los QDs con los lavados; la respuesta del MIP sigue siendo baja.



**Figura 112.** Inyección de una disolución de warfarina en ACN/buffer 15:85 v/v (MIP 2)

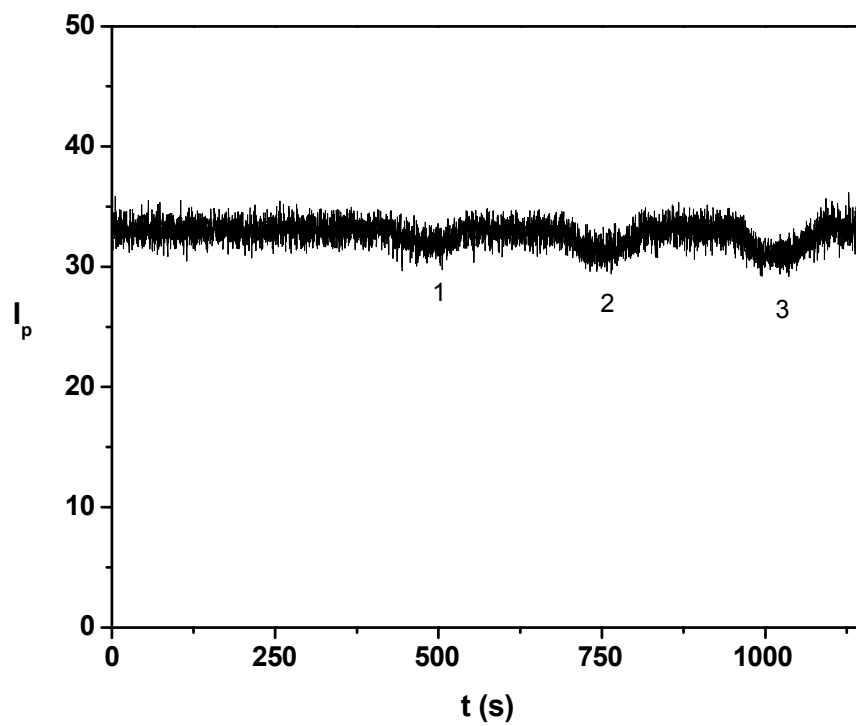
### 3.2.2.2. Prueba luego de los lavados en Soxhlet

Las Figuras 113, 114, 115 y 116 muestran los fiagramas para el MIP, lavado con metanol/acético 90:10 v/v y metanol, luego de la inyección de disoluciones de las cumarinas en estudio (fase móvil: metanol).



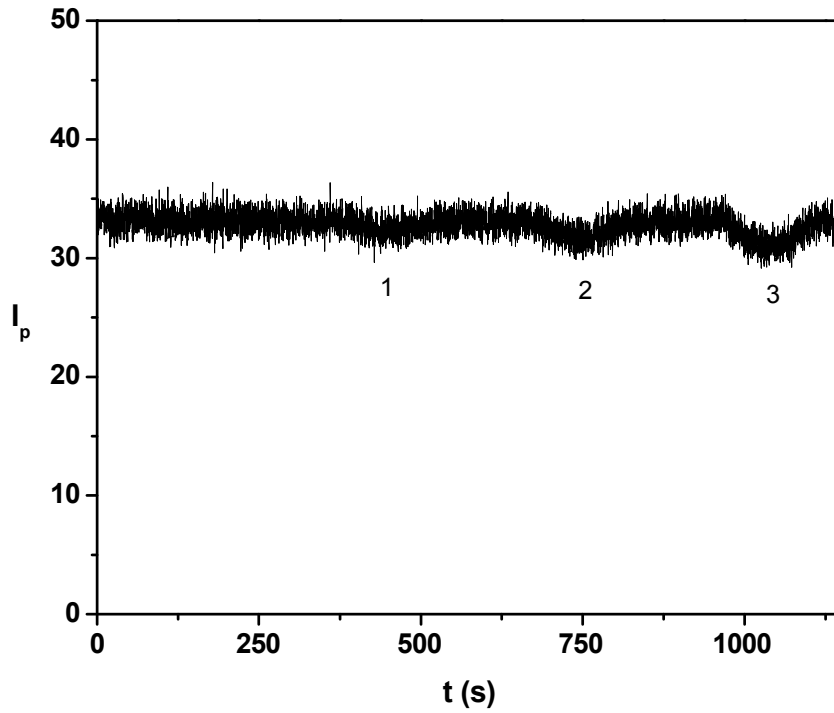
**Figura 113.** Inyección de disoluciones de warfarina en metanol (MIP 2)

[war] (M): 1 =  $3,00 \times 10^{-5}$ ; 2 =  $5,00 \times 10^{-5}$ ; 3 =  $7,00 \times 10^{-5}$

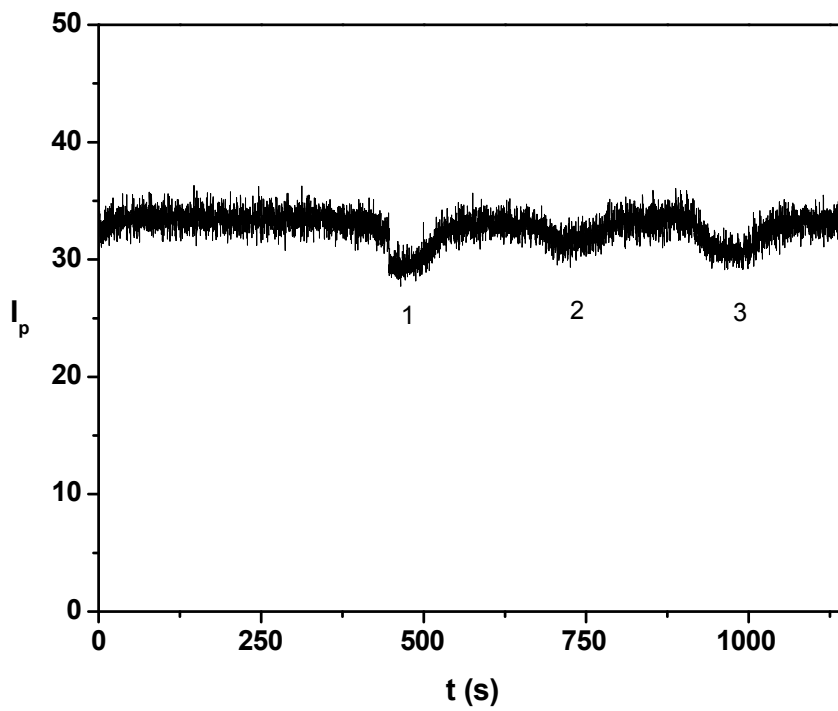


**Figura 114.** Inyección de disoluciones de cumarina en metanol (MIP 2)

[cou] (M): 1 =  $3,00 \times 10^{-5}$ ; 2 =  $5,00 \times 10^{-5}$ ; 3 =  $7,00 \times 10^{-5}$



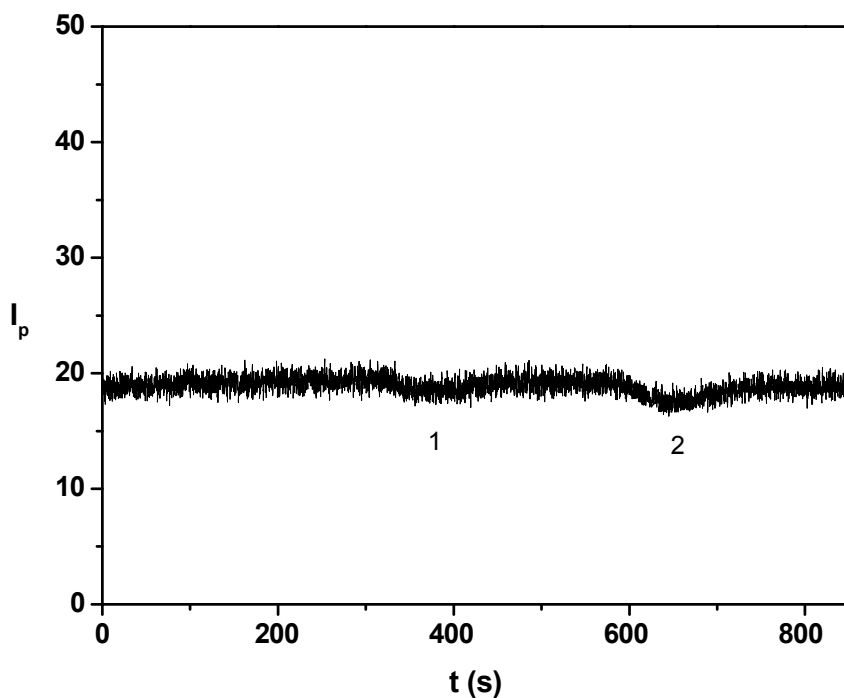
**Figura 115.** Inyección de disoluciones de dicumarol en metanol (MIP 2)  
[dic] (M): 1 =  $3,00 \times 10^{-5}$ ; 2 =  $5,00 \times 10^{-5}$ ; 3 =  $7,00 \times 10^{-5}$



**Figura 116.** Inyección de disoluciones de umbeliferona en metanol (MIP 2)  
[umb] (M): 1 =  $3,00 \times 10^{-5}$ ; 2 =  $5,00 \times 10^{-5}$ ; 3 =  $7,00 \times 10^{-5}$

Si bien la fosforescencia base del MIP es levemente mayor que la correspondiente al primer lavado con metanol en celda de flujo (Figuras 104 a 107), la respuesta hacia las cumarinas es análoga (baja).

La Figura 117 muestra el fiagrama para el MIP luego de lavado con ACN/buffer 15:85 v/v y metanol, luego de la inyección de disoluciones de warfarina (fase móvil: ACN/buffer 15:85 v/v).



**Figura 117.** Inyección de disoluciones de warfarina en ACN/buffer 15:85 v/v (MIP 2)  
 [war] (M): 1 =  $3,00 \times 10^{-5}$ ; 2 =  $7,00 \times 10^{-5}$

Nuevamente, como puede notarse, la intensidad de fosforescencia base disminuye con los lavados y la respuesta del MIP hacia la warfarina no mejora.



#### 4. Conclusiones

Se evaluó la inmovilización de los quantum dots de ZnS dopados con Mn sobre matrices poliméricas a fin de obtener fases sensoras fosforescentes. Se utilizó la técnica de impresión molecular sobre la superficie del quantum dot con el objeto de crear cavidades de reconocimiento selectivo para la warfarina (molécula molde).

Aun cuando no se logró extraer completamente a la warfarina de los polímeros impresos sintetizados (dos metodologías de síntesis), los mismos, junto con sus respectivos polímeros no impresos, fueron evaluados como fases sensoras. Ambos polímeros impresos mostraron tener capacidad de reconocimiento hacia las cumarinas en estudio, siendo no selectivos para la warfarina. Los polímeros no impresos también fueron capaces de reconocer a las cumarinas por lo que se supone el mecanismo de reconocimiento en este caso se basa en la interacción de las cumarinas con los quantum dots presentes en los polímeros. La respuesta registrada de los polímeros no impresos para las cumarinas fue mayor a la correspondiente a los polímeros impresos; esto se explica en el hecho que la warfarina no ha sido completamente removida del polímero por lo que parte de los quantum dots se encuentran interaccionando con la misma y por tanto es menor la cantidad de sitios de interacción disponibles (se traduce en una menor señal de fosforescencia base al tener menos luminóforos –QDs- sin complejar).

Probablemente, en base a los resultados obtenidos, la inmovilización de los quantum dots no sea la mejor opción a fin de desarrollar una fase sensora de reconocimiento selectivo dada la sensibilidad de los estados superficiales de los mismos; una de sus mayores ventajas se convierte en una desventaja al intentar crear cavidades que restrinjan la interacción.



El presente trabajo de tesis doctoral ha abordado distintas temáticas en lo que respecta al estudio de métodos fotoluminiscentes que permitan la determinación cuantitativa de cumarinas. El desarrollo de sensores ópticos fosforescentes (optosensores) como herramienta analítica para la detección de cumarinas ha sido el eje a seguir durante la investigación realizada.

Una de las principales ventajas de un optosensor, o sensor tipo celda de flujo, es su excelente compatibilidad con los sistemas de análisis por inyección en flujo, donde es posible integrar la separación con la detección en sistemas dinámicos (el analito de interés es inmovilizado temporalmente en la fase estacionaria empaquetada en el camino óptico de la celda de flujo). Así, recordando el objetivo general del presente trabajo de tesis doctoral, el desarrollo de un optosensor sería la antesala de la utilización del mismo como potencial técnica separativa complementaria a otros sistemas analíticos. En los últimos años, la combinación de las técnicas de impresión molecular con los sistemas de microextracción en fase sólida (MISPME) ha ampliado el horizonte hacia nuevas metodologías de, principalmente, pre-tratamiento de muestra selectivos, estables y reutilizables.

Los capítulos del presente trabajo detallan las metodologías empleadas a fin de obtener un sistema fotoluminiscente adecuado que permita su adaptación a sistemas de detección dinámicos, con respuestas selectivas, sensibles y rápidas. A continuación, se resume lo expuesto en cada uno de ellos.

El Capítulo I ha presentado una introducción al tema en estudio, estableciendo los lineamientos generales y las consideraciones a tener en cuenta a la hora de desarrollar metodologías fotoluminiscentes.

El Capítulo II se ha enfocado en la fosforescencia a temperatura ambiente del complejo de inclusión 1-bromonaftaleno/ $\beta$ -ciclodextrina/ciclohexano y su uso como sensor en estado líquido de cumarinas. Los largos tiempos de estabilización del sistema han generado una imposibilidad práctica en su adaptación como fase sensora.

El Capítulo III se ha dirigido al estudio de nanomateriales semiconductores fotoluminiscentes (quantum dots) los cuales, al combinar la sensibilidad de los estados superficiales con una emisión del tipo fosforescente, han brindado una alternativa viable en el desarrollo de sensores en estado líquido de cumarinas y su posterior adecuación como fase sensora.

El Capítulo IV se ha centrado en el desarrollo de una fase sensora para warfarina, inmovilizando el sistema optimizado en el capítulo previo sobre una matriz polimérica. La síntesis de quantum dots impresos (polímero de impresión molecular sobre la superficie del quantum dot) y su posterior empaquetamiento en una celda de flujo con detección fotoluminiscente ha permitido el desarrollo de un optosensor. La respuesta del mismo hacia la warfarina no ha sido selectiva debido a la presencia de quantum dots no sólo en las proximidades de la cavidad de reconocimiento (como se hubiese esperado) si no a lo largo de toda la matriz polimérica. Aun cuando la respuesta del polímero impreso no fue selectiva para warfarina, el desarrollo de un optosensor basado en la inmovilización de los quantum dots para la detección de cumarinas ha sido posible, como lo ha demostrado el polímero no impreso; es decir, se ha podido obtener una fase sensora de reconocimiento hacia una familia de

compuestos (cumarinas). Luego de las optimizaciones que sean necesarias, la adaptación de la metodología desarrollada seguida a una técnica separativa parece ser viable.

---

## *Referencias*

- [1] J. M. Costa-Fernández, A. Sanz-Medel en Fosforescencia Molecular Analítica: una aproximación práctica, A. Fernández Gutiérrez, S. G. Schulman (Eds), Universidad de Granada, 2001
- [2] C. A. Parker, Photoluminescence of Solutions, Elsevier Publishing Company, Amsterdam, The Netherlands, 1968
- [3] R. J. Hurtubise, Phosphorimetry: Theory, Instrumentation, and Applications, VCH Publishers, United States of America, 1990
- [4] M. Gunshefski, J. A. Santana, J. Stephenson, J. D. Winefordner, Appl. Spectrosc. Rev. 27 (1992) 143-192
- [5] R. J. Hurtubise, Anal. Chim. Acta 351 (1997) 1-22
- [6] J. Kuijtit, F. Ariese, U.A.Th. Brinkman, C. Gooijer, Anal. Chim. Acta 488 (2003) 135-171
- [7] A. F. Gutiérrez, S. G. Schulman (eds.), Fosforescencia Molecular Analítica: una aproximación práctica, Universidad de Granada, Granada, España, 2001
- [8] A. Hulanicki, S. Glab, F. Ingman, Pure & Appl. Chem. 63 (1991) 1247-1250
- [9] J. J. Donkerbroek, J. J. Elzas, C. Gooijer, R. W. Frei, N. H. Velthorst, Talanta 28 (1981) 717-723
- [10] A. Segura Carretero, A. Salinas Castillo, A. Fernández Gutiérrez, Crit. Rev. Anal. Chem. 35 (2005) 3-14
- [11] Y. L. Peng, Y. T. Wang, Y. Wang, W. J. Jin, J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry 173 (2005) 301-308
- [12] M. E. Díaz García, A. Sanz-Medel, Anal. Chem. 58 (1986) 1436-1440
- [13] L. D. Li, Y. Zhao, Y. G. Wu, A. J. Tong, Talanta 46 (1998) 1147-1154
- [14] A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco, B. Cañabate Díaz, A. Fernández Gutiérrez, Anal. Chim. Acta 361 (1998) 217-222
- [15] J. R. Lakowicz, Principles of Fluorescence Spectroscopy, third ed., Springer Publisher, New York, 2006
- [16] E. P. Kirby, in Excited States of Proteins and Nucleic Acids, R. F. Steiner, L. Weinryb (Eds.), Plenum Press, New York, 1971
- [17] K. Rohini, P. S. Srikumar, J. Thermodyn. Catal. 5: 130 (2014)
- [18] S. M. Sethna, N. M. Shah, Chem. Rev. 36 (1945) 1-62
- [19] J. R. S. Hoult, M. Payá, Gen. Pharmac. 27 (1996) 713-722
- [20] A. Lacy, R. O'Kennedy, Curr. Pharm. Des. 10 (2004) 3797-3811
- [21] S. R. Trenor, A. R. Shultz, B. J. Love, T. E. Long, Chem. Rev. 104 (2004) 3059-3077
- [22] F. Borges, F. Roleira, N. Milhazes, L. Santana, E. Uriarte, Curr. Med. Chem. 12 (2005) 887-916
- [23] C. W. Loomis, W. J. Racz, Anal. Chim. Acta 106 (1979) 155-159
- [24] M. Ueland, G. Kvalheim, P. E. Lønning, S. Kvinnsland, Therapeutic Drug Monitoring 7 (1985) 329-335
- [25] J. M. Steyn, H. M. Van Der Merwe, J. Chromatogr. 378 (1986) 254-269

- [26] Y. W. J. Wong, P. J. Davis, *J. Chromatogr.* 469 (1989) 281-291
- [27] J. Dalbacke, I. Dahlquist, C. Persson, *J. Chromatogr. A* 507 (1990) 381-387
- [28] S. Sharifz, H. C. Michaelis, E. Lotterer, J. Bircher, *J. Liq. Chromatogr.* 16 (1993) 1263-1278
- [29] H. Takahashi, T. Kashima, S. Kimura, N. Muramoto, H. Nakahata, S. Kubo, Y. Shimoyama, M. Kajiwara, H. Echizen, *J. Chromatogr. B* 701 (1997) 71-80
- [30] A. Medvedovici, F. David, P. Sandra, *Talanta* 44 (1997) 1633-1640
- [31] H. Pouliquen, V. Fauconnet, M-L. Morvan, L. Pinault, *J. Chromatogr. B* 702 (1997) 143-148
- [32] D. De Orsi, L. Gagliardi, L. Turchetto, D. Tonelli, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 17 (1998) 891-895
- [33] M. E. Fernández Izquierdo, J. Quesada Granados, M. Villalón Mir, M. C. López Martínez, *Food Chem.* 70 (2000) 251-258
- [34] P. R. Ring, J. M. Bostick, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 22 (2000) 573-581
- [35] R. M. S. Celeghini, J. H. Y. Vilegas, Fernando M. Lanças, *J. Braz. Chem. Soc.* 12 (2001) 706-709
- [36] V. K. Boppana, W. H. Schaefer, M. J. Cyronak, *J. Biochem. Biophys. Methods* 54 (2002) 315-326
- [37] M. U. B. Kammerer, J. Kirchheiner, A. Rane, J-O. Svensson, *J. Chromatogr. B* 809 (2004) 217-226
- [38] I. Locatelli, V. Kmetec, A. Mrhar, I. Grabnar, *J. Chromatogr. B* 818 (2005) 191-198
- [39] A. Osman, K. Arbring, T. L. Lindahl, *J. Chromatogr. B* 826 (2005) 75-80
- [40] L. S. de Jager, G. A. Perfetti, G. W. Diachenko, *J. Chromatogr. A* 1145 (2007) 83-88
- [41] G. Vecchione, B. Casetta, M. Tomaiuolo, E. Grandone, M. Margaglione, *J. Chromatogr. B* 850 (2007) 507-514
- [42] C. Sproll, W. Ruge, C. Andlauer, R. Godelmann, D. W. Lachenmeier, *Food Chem.* 109 (2008) 462-469
- [43] J. Su, C. Zhang, W. Zhang, Y-H. Shen, H-L. Li, R-H. Liu, X. Zhang, X-J. Hub, W-D. Zhang, *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 2111-2117
- [44] J. Malakova, P. Pavek, L. Svecova, I. Jokesova, P. Zivny, V. Palicka, *J. Chromatogr. B* 877 (2009) 3226-3230
- [45] Z. Zuo, S. K. Wo, C. M. Y. Lo, L. Zhou, G. Cheng, J. H. S. You, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 52 (2010) 305-310
- [46] M. Hadjmohammadi, H. Ghambari, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 61 (2012) 44-49
- [47] H. Ghambari, M. Hadjmohammadi, *J. Chromatogr. B* 899 (2012) 66-71
- [48] N. A. Siddique, M. Mujeeb, M. Aamir, A. Husain, *Am. J. Pharm Tech. Res.* 2 (2012) 568-577
- [49] H. M. Marwani, E. M. Bakhsh, *Am. J. Anal. Chem.* 4 (2013) 8-16
- [50] K. Hroboňová, A. Spevak, Ľ. Spišská, J. Lehotay, J. Čižmárik, *Chem. Papers* 67 (2013) 477-483

- [51] Y-H. Wang, B. Avula, N. P. D. Nanayakkara, J. Zhao, I. A. Khan, *J. Agric. Food Chem.* 61 (2013) 4470–4476
- [52] K. Hrobonňová, J. Lehotay, J. Čižmárik, J. Sádecká, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 36 (2013) 486–503
- [53] T. Lomonaco, S. Ghimenti, I. Piga, M. Onor, B. Melai, R. Fuoco, F. Di Francesco, *J. Chromatogr. A* 1314 (2013) 54–62.
- [54] Y. Shen, C. Han, B. Liu, Z. Lin, X. Zhou, C. Wang, Z. Zhu, *J. Dairy Sci.* 97 (2014) 679–686
- [55] F. Ahmadi, E. Yawari, M. Nikbakht, *J. Chromatogr. A* 1338 (2014) 9–16
- [56] O. Y. Alshogran, A. J. Ocquea, J. Zhao, B. W. Day, F. A. Leblond, V. Pichetted, T. D. Nolin, *J. Chromatogr. B* 944 (2014) 63–68
- [57] M. M. Ghoneim, A. Tawfik, *Anal. Chim. Acta* 511 (2004) 63–69
- [58] S. S.M. Hassan, W. H. Mahmoud, M. A.F. Elmosallamy, M. H. Almarzooqi, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 39 (2005) 315–321
- [59] L-H. Wang, H-H. Liu, *Molecules* 14 (2009) 3538-3550
- [60] D. M. Miyano, T. Lima, F. R. Simões, M. A. La-Scalea, H. P. M. Oliveira, L. Codognoto, *J. Braz. Chem. Soc.* 25 (2014) 602-609
- [61] B. Rezaei, O. Rahmanian, A. A. Ensafi, *Sens. Actuators B Chem.* 196 (2014) 539–545
- [62] P. Gareil, *J. Chromatogr.* 615 (1993) 317-325
- [63] Q. Zhou, W-P. Yau, E. Chan, *Electrophoresis* 24 (2003) 2617–2626
- [64] M. Wang, Z. Cai, L. Xu, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 4045–4051
- [65] C. S. P. Sastry, T. Thirupathi Rao, A. Sailaja, J. Venkateswara Rao, *Talanta* 38 (1991) 1107-1109
- [66] H. C. Hollifield, J. D. Winefordner, *Talanta* 14 (1967) 103-107
- [67] S. Y. Su, E. Asafu-Adjaye, S. Ocak, *Analyst* 109 (1984) 1019-1023
- [68] F. Garcia Sánchez, C. Cruces Blanco, *Anal. Chim. Acta* 222 (1989) 177-188
- [69] S. Panadero, A. Gómez-Hens, D. Pérez-Bendito, *Talanta* 40 (1993) 225-230
- [70] P. Solich, M. Polášek, R. Karlíček, *Anal. Chim. Acta* 308 (1995) 293-298
- [71] S. Ishiwata, M. Kamiya, *Chemosphere* 34 (1997) 783-789
- [72] L. F. Capitán-Vallvey, M. K. A. Deheidell, R. Avidad, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 37 (1999) 1–6
- [73] R. Badía, M. E. Díaz-García, *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 4256-4260
- [74] G. de Armas, M. Miró, J. M. Estela, V. Cerdà, *Anal. Chim. Acta* 467 (2002) 13–23
- [75] Z. Chang, H-T. Yan, *J. Lumin.* 132 (2012) 811–817
- [76] A. Dehbozorgi, J. Tashkhourian, S. Zare, *J. Fluoresc.* 25 (2015) 1887-1895
- [77] M. L. Bender, M. Kamiyama, *Cyclodextrin Chemistry*, Springer-Verlag, New York, 1978
- [78] J. Szejtli, *Cyclodextrin Technology*, Topics in Inclusion Science, J. E. D. Davies (Ed), Springer-Science+Business Media, B.V., 1988



- [79] A. Muñoz de la Peña, M. C. Mahedero García, A. Bautista Sánchez, Fosforescencia a temperatura ambiente en disoluciones de ciclodextrinas, en Fosforescencia Molecular Analítica: una aproximación práctica, A. Fernández Gutiérrez, S. G. Schulman (Eds), Universidad de Granada, 2001
- [80] Y. L. Peng, Y. T. Wang, Y. Wang, W. J. Jin, *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry* 173 (2005) 301–308
- [81] A. Muñoz de la Peña, M. C. Mahedero, A. Espinosa-Mansilla, A. B. Sanchez, M. Reta, *Talanta* 48 (1999) 15–21
- [82] Y. S. Wei, C. S. Liu, S. S. Zhang, *J. Chin. Anal. Chem.* 19 (1991) 533–537
- [83] Y. P. Zhu, L. D. Li, A. J. Tong, *Spectrosc. Spect. Anal.* 18 (1998) 617–621
- [84] S. Hamai, *J. Am. Chem. Soc.* 111 (1989) 3951–3954
- [85] A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco, *Appl. Spectrosc.* 52 (1998) 420–425
- [86] G. M. Escandar, A. Muñoz de la Peña, *Anal. Chim. Acta* 370 (1998) 199–205
- [87] L. X. Mu, Y. Wang, Z. Zhang, W. J. Jin, *Anal. Lett.* 37 (2004) 1168–1180
- [88] H. R. Zhang, Y. S. Wei, W. J. Jin, C. S. Liu, *Anal. Chim. Acta.* 484 (2003) 111–120
- [89] J. W. Xie, J. G. Xu, G. Z. Chen, C. S. Liu, *Sci. Chin. (Ser. B)* 26 (1996) 269–273
- [90] V. B. Nazarov, V. G. Avakyan, M. V. Alfimov, T. G. Vershinnikova, *Russ. Chem. Bull. (Int. Ed.)* 52 (2003) 916–922
- [91] Y. L. Peng, W. J. Jin, F. Feng, *Spectrochim. Acta Part A* 61 (2005) 3038–3042
- [92] A. Muñoz de la Peña, T. Ndou, J. B. Zun, K. Green, D. Live, I. M. Warner, *J. Am. Chem. Soc.* 113 (1991) 1572–1577
- [93] S. Hamai, *J. Phys. Chem.* 93 (1989) 2074–2078
- [94] G. Nelson, G. Patonay, I. M. Warner, *Anal. Chem.* 60 (1988) 274–279
- [95] G. Nelson, I. M. Wauner, *J. Phys. Chem.* 94 (1990) 576–581
- [96] J. B. Zang, A. Muñoz de la Peña, T. T. Ndou, *J. Phys. Chem.* 95 (1991) 6701–6706
- [97] A. Ponce, P. A. Wong, J. J. Way, Daniel, G. Nocera, *J. Phys. Chem.* 97 (1993) 11137–11142
- [98] X. K. Chen, L. Mou, L. D. Li, A. J. Tong, *Chin. J. Anal. Chem.* 27 (1999) 125–128
- [99] X. Z. Du, Y. Zhang, Y. B. Jiang, L. R. Lin, X. Z. Huang, G. Z. Chen, *Acta Chim. Sin.* 18 (1997) 1935–1938
- [100] X. Z. Du, Y. Zhang, Y. B. Zhang, X. Z. Huang, G. Z. Chen, *Spectrochim. Acta Part A* 53 (1997) 671–677
- [101] X. Z. Du, Y. Zhang, X. Z. Huang, Y. B. Jiang, Y. Q. Li, G. Z. Chen, *Appl. Spectrosc.* 50 (1996) 1273–1276
- [102] X. Z. Du, Y. Zhang, Y. B. Jiang, X. Z. Huang, G. Z. Chen, *Talanta* 44 (1997) 511–515
- [103] J. J. Wu, Y. Wang, J. B. Chao, L. N. Wang, W. J. Jin, *J. Phys. Chem. B* 108 (2004) 8915–8919
- [104] R. A. Femia, L. J. Cline Love, *J. Phys. Chem.* 89 (1985) 1897–1901
- [105] S. Hamai, N. Mononobe, *Photochem. Photobiol. A* 91 (1995) 217–221
- [106] S. Haimai, J. Kudou, *Photochem. Photobiol. A* 113 (1998) 135–140

- [107] United States Pharmacopeia Convention, United States Pharmacopeia 36 - National Formulary 31 (USP36-NF31), 2013, vol. 36, p. 5588
- [108] N. J. Turro, J. D. Bolt, Y. Kuroda, I. Tabushi, *Photochem. Photobiol.* 35 (1982) 69-72
- [109] N. J. Turro, T. Okubo, C. J. Chung, *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 1789-1794
- [110] N. J. Turro, G. S. Corallid, X. Li, *Photochem. Photobiol.* 37 (1983) 149-153
- [111] Y.-X. Zhu, J.-H. Peng, Y. Zhang, *Anal. Chim. Acta* 583 (2007) 364-369
- [112] Y. Zhang, Y.-X. Zhu, G.-L. Huang, F. Ren, F.-L. Zheng, S.-J. Kim, *Bull. Korean Chem. Soc.* 22 (2001) 1397-1399
- [113] W. K. Hartmann, M. H. B. Gray, A. Ponce, D. G. Nocera, P. A. Wong, *Inorg. Chim. Acta* 243 (1996) 239-248
- [114] X.-Z. Du, Y. Zhang, Y.-B. Jiang, L.-R. Lin, X.-Z. Huang, G.-Z. Chen, *J. Photochem. Photobiol., A* 112 (1998) 53-57
- [115] Y.-S. Wei, W.-J. Jin, R.-H. Zhu, G.-W. Xing, C.-S. Liu, S.-S. Zhang, B.-L. Zhou, *Spectrochim. Acta Part A* 52 (1996) 683-690
- [116] X.-Z. Du, Y. Zhang, X.-Z. Huang, Y.-Q. Li, Y.-B. Jiang, G.-Z. Chen, *Spectrochim. Acta Part A*, 52 (1996) 1541-1545
- [117] C. García-Ruiz, X. S. Hu, F. Ariese, C. Gooijer, *Talanta* 66 (2005) 634-640
- [118] M. R. Eftink, in *Topics in Fluorescence Spectroscopy*, 2, J. R. Lakowicz (Ed.), Kluwer Academic Publishers, 2002
- [119] Y. Matsui, K. Mochida, *Bull Chem Soc Japan* 52 (1979) 2808-2814
- [120] H. A. Benesi, J. H. Hildebrand, *J. Am. Chem. Soc.* 71 (1949) 2703-2707
- [121] K. A. Connors, *Binding Constants. The Measurement of Molecular Complex Stability*, John Wiley & Sons, 1987
- [122] W. J. Parak, L. Manna, F. C. Simmel, D. Gerion, P. Alivisatos, *Quantum Dots in Nanoparticles From Theory to Application*, G. Schmid (ed), Wiley-VCH, 2004
- [123] R. N. Bhargava, D. Gallagher, X. Hong, A. Nurmikko, *Phys. Rev. Lett.* 72 (1994) 416-419
- [124] Y. Lou, Y. Zhao, J. Chena, J. Zhu, *J. Mater. Chem. C* 2 (2014) 595-613
- [125] S. Saprà, A. Prakash, A. Ghangrekar, N. Periasamy, D. D. Sarma, *J. Phys. Chem. B* 109 (2005) 1663-1668
- [126] E. Sotelo-Gonzalez, L. Rocés, S. García-Granda, M. T. Fernandez-Argüelles, J. M. Costa-Fernández, A. Sanz-Medel, *Nanoscale* 5 (2013) 9156-9161
- [127] R. Beaulac, P. I. Archer, D. R. Gamelin, *J. Solid State Chem.* 181 (2008) 1582-1589
- [128] J. M. Costa-Fernández, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, *Trends in Anal. Chem.* 25 (2006) 207-218
- [129] E. Sotelo-Gonzalez, M. T. Fernandez-Argüelles, J. M. Costa-Fernández, A. Sanz-Medel, *Anal. Chim. Acta* 712 (2012) 120-126
- [130] C. A. Parker, W. T. Rees, *Analyst* 85 (1960) 587-600
- [131] A. K. Kole, C. S. Tiwary, P. Kumbhakar, *J. Appl. Phys.* 113 (2013) 114308 (1-11)

- [132] Drug stereochemistry: analytical methods and pharmacology, K. Józwiak, W. J. Lough, I. W. Wainer (Eds), 3rd ed., Informa Healthcare, London, 2012
- [133] T. Kosa, T. Maruyama, M. Otagiri, *Pharm. Res.* 14 (1997) 1607-1612
- [134] K. J. Fehske, U. Schläfer, U. Wollert, W. E. Müller, *Mol. Pharmacol.* 21 (1981) 387-393
- [135] T. Peters, *Adv. Protein Chem.* 37 (1985) 161–245
- [136] Q. Wang, Y. Kuo, Y. Wang, G. Shin, C. Ruengruglikit, Q. Huang, *J. Phys. Chem. B* 110 (2006) 16860-16866
- [137] Y. Mingdi, O. Ramström (Eds), *Molecularly Imprinted Materials: Science and Technology*, Marcel Dekker, New York, 2005
- [138] B. Sellergren, A. J. Hall, *Molecularly Imprinted Polymers*, in *Supramolecular Chemistry: From Molecules to Nanomaterial*, P. Gale, J. Steed (Eds), John Wiley & Sons Ltd., New Jersey, 2012
- [139] S-W. Lee, T. Kunitake (Eds), *Handbook of Molecular Imprinting: Advanced Sensor Applications*, CRC Press, Florida, 2012
- [140] H-F. Wang, X-P. Yan, *Molecularly Imprinted Room Temperature Phosphorescent Optosensors for Environmental Pollutants*, in *Handbook of Molecular Imprinting: Advanced Sensor Applications*, S-W. Lee, T. Kunitake (Eds), CRC Press, Florida, 2012
- [141] G. Vasapollo, R. Del Sole, L. Mergola, M. R. Lazzoi, A. Scardino, S. Scorrano, G. Mele, *Int. J. Mol. Sci.* 2011, 12, 5908-5945
- [142] B. C. G. Karlsson, A. M. Rosengren, I. Näslund, P. O. Andersson, I. A. Nicholls, *J. Med. Chem.* 53 (2010) 7932–7937
- [143] A. M. Rosengren, B. C. G. Karlsson, I. A. Nicholls, *Int. J. Mol. Sci.* 14 (2013) 1207-1217
- [144] F. Ahmadi, E. Yawari, M. Nikbakht, *J. Chromatogr. A*, 1338 (2014) 9–16
- [145] H. A. Andreetta, L. Bruzzone, *Anal. Letters* 41 (2008) 36-45

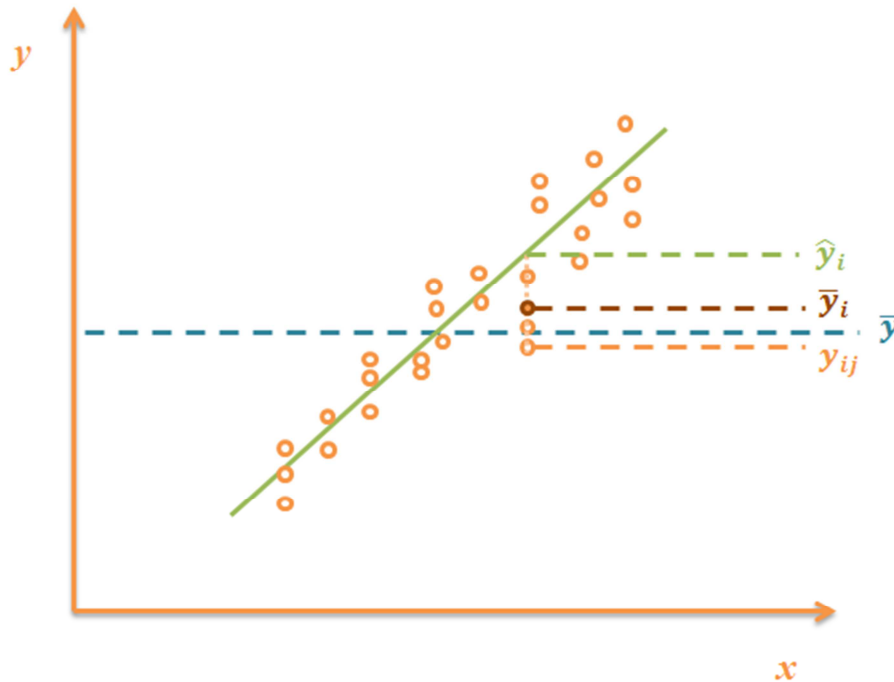
## *Tratamiento estadístico*

## 1. Curva de calibración

### 1.1. Regresión lineal con replicados

Modelo:  $y = a + bx$

A fin de evaluar si existe correlación entre las variables  $x$  e  $y$  (ensayo de correlación) y si el modelo lineal propuesto es el adecuado –los datos se ajustan a un modelo lineal- (ensayo de falta de ajuste), se realiza un ANAVA:



Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad ( $\phi$ )	Cuadrado medio	F calculado	F crítico
<b>Regresión</b>	$S_R = \sum_{i=1}^m (n_i (\hat{y}_i - \bar{y})^2)$	$p-1$	$s_R^2 = S_R / (p - 1)$	$s_R^2 / s_E^2$	$F_R (\phi_R, \phi_E; \alpha)$
<b>Falta de ajuste</b>	$S_{FA} = \sum_{i=1}^m (n_i (\bar{y}_i - \hat{y}_i)^2)$	$m-p$	$s_{FA}^2 = S_{FA} / (m - p)$	$s_{FA}^2 / s_E^2$	$F_{FA} (\phi_{FA}, \phi_E; \alpha)$
<b>Error</b>	$S_E = \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^{n_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$	$N-m$	$s_E^2 = S_E / (N - m)$		
<b>Total</b>	$S_T = \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^{n_i} (y_{ij} - \bar{y})^2$	$N-1$			

$p$  = parámetros de la regresión;  $m$  = niveles de  $x$ ;  $N$  = número total de datos

### 1.1.1. Ensayo de correlación

$$\begin{cases} H_0 : r^2 = 0 \\ H_1 : r^2 \neq 0 \end{cases}$$

Si  $F_R$  calculado es mayor a  $F_R$  crítico, se rechaza  $H_0$ : existe correlación entre las variables.

### 1.1.2. Ensayo de falta de ajuste

$$\begin{cases} H_0 : \text{No hay falta de ajuste} \\ H_1 : \text{Hay falta de ajuste} \end{cases}$$

Si  $F_{FA}$  calculado es menor a  $F_{FA}$  crítico, se acepta  $H_0$ : el modelo lineal propuesto es el adecuado.

## 1.2. Predicción de la concentración de una muestra incógnita

Replicando la incógnita  $r$  veces:

(i) Se estima la concentración para cada una de las réplicas:

$$\hat{x}_0 = \frac{y_0 - a}{b}$$

(ii) Se calcula la desviación estándar de la predicción de la incógnita:

$$s(\hat{x}_0) = \frac{s(\hat{y})}{b} \sqrt{\left[ \frac{1}{r} + \frac{1}{N} + \frac{(\bar{x}_0 - \bar{x})^2}{\sum_i (n_i (x_i - \bar{x})^2)} \right]}$$

$\bar{x}_0$ : valor medio de las concentraciones de la incógnita

(iii) Se informa el valor hallado como el promedio de la concentración con su correspondiente intervalo de confianza:

$$\hat{x}_0 \pm t_{\alpha, N-2} s(\hat{x}_0)$$

## 1.3. Ensayo de comparación de pendientes

Dadas las pendientes de dos curvas de calibración, puede realizarse una prueba de significación  $t$  a fin de determinar si las mismas difieren entre sí.

Se calcula un  $t$  experimental y se lo compara con un  $t$  crítico con un nivel de significación  $\alpha$  y  $(n_1 + n_2 - 4)$  grados de libertad, donde  $n_i$  es el número de datos de cada curva.

$$t_{exp} = \frac{b_1 - b_2}{\sqrt{s_{ep}^2 \left( \frac{1}{\sum(x_{i1} - \bar{x})^2} + \frac{1}{\sum(x_{i2} - \bar{x})^2} \right)}}$$

$$s_{ep}^2 = \frac{(n_1 - 2)s_{y1}^2 + (n_2 - 2)s_{y2}^2}{n_1 + n_2 - 4}$$

donde  $b_i$  es la pendiente y  $s_{y_i}^2$  la varianza residual de la curva de calibración.

Si  $t_{calc} < t_{crit}$ , las pendientes no difieren entre sí con un nivel de significación  $\alpha$ .

## 2. Exactitud y precisión del método analítico

### 2.1. Exactitud

Concordancia entre la medida obtenida respecto al valor verdadero.

Se realiza un test de hipótesis:

$$\begin{cases} H_0 : \bar{x} = x_0 \\ H_1 : \bar{x} \neq x_0 \end{cases}$$

Se calcula un  $t_{exp}$ :

$$t_{exp} = \frac{(\bar{x} - x_0)\sqrt{n}}{s_x}$$

y se lo compara con el valor t de Student de tabla, para (n-1) grados de libertad y  $\alpha = 0,05$ .

n = número de datos (replicados a cada nivel de concentración)

$s_x$  = desviación estándar

$$s_x = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

Si  $t_{exp}$  es menor al  $t_{tabla}$ , se acepta  $H_0$ : el método es exacto en los niveles de concentración estudiados.

### 2.2. Precisión

Grado de concordancia entre las mediciones obtenidas independientemente bajo las condiciones establecidas.

Se define el coeficiente de variación o desviación estándar relativa (DER -RSD en inglés-):

$$C_v = \frac{s_x \cdot 100}{\bar{x}}$$

Generalmente se acepta un valor de RSD < 15%.



### 3. Cifras de mérito del método analítico

Las cifras de mérito (“figures of merit”) de un método analítico se utilizan regularmente con el propósito de calificar un método determinado y comparar sus propiedades analíticas con las provistas por otras técnicas. Incluyen, entre otras, las que se listan a continuación [H.C. Goicoechea, A.C. Olivieri, La Calibración en Química Analítica, primera ed., Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, 2007].

#### 3.1. Sensibilidad de calibración

La sensibilidad de calibración es igual a la pendiente de la recta de calibrado:

$$SEN = b$$

Indica la variación de una respuesta producida por una unidad de variación de concentración del analito.

#### 3.2. Sensibilidad analítica

La sensibilidad de calibración no es adecuada para comparar dos métodos analíticos cuando estos están basados en respuestas de diferente naturaleza. Para ello es preferible utilizar la llamada sensibilidad analítica  $\gamma$ , definida por la relación entre la sensibilidad y el ruido instrumental. Este último puede estimarse como el desvío estándar de los residuos de la regresión lineal,  $s_{y/x}$ .

$$\gamma = SEN / s_{y/x}$$

#### 3.3. Límite de detección

Es la mínima concentración detectable de manera confiable por la técnica. El límite de detección (LOD) se calcula en función del desvío estándar de la concentración predicha para una muestra blanco ( $s_o$ ).

$$LOD = 2 \times t_{0.05, n-2} \times s_o$$

$$s_o = \frac{s_{y/x}}{b} \sqrt{\frac{1}{r} + \frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{Q_{xx}}}$$

$$Q_{xx} = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$$

r: número de réplicas; n: número de datos; b: pendiente de la recta de calibrado.

### 3.4. Límite de cuantificación

Es la mínima concentración cuantificable en forma confiable. Este parámetro (LOQ) se toma como la concentración correspondiente a diez veces el desvío estándar (en unidades de concentración) del blanco:

$$\text{LOQ} = 10 \times s_0$$

### 3.5. Intervalo dinámico

Se considera que va desde la menor concentración detectable (LOD) hasta la pérdida de relación entre respuesta y concentración.

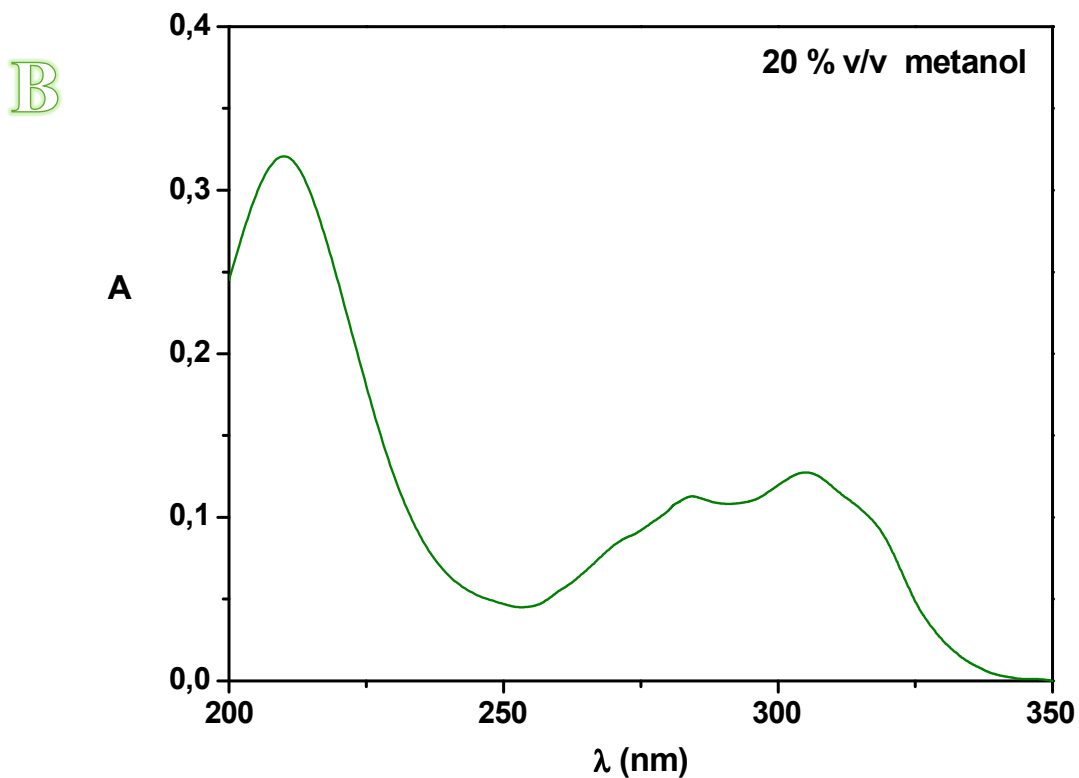
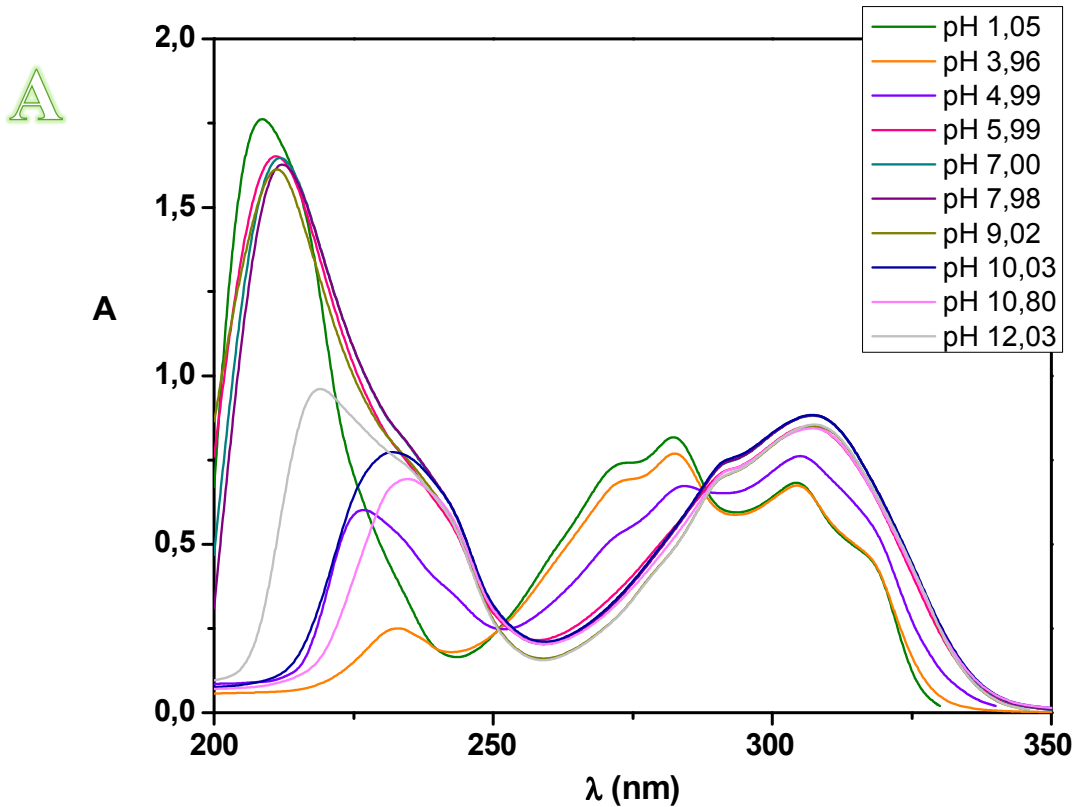
### 3.6. Intervalo lineal

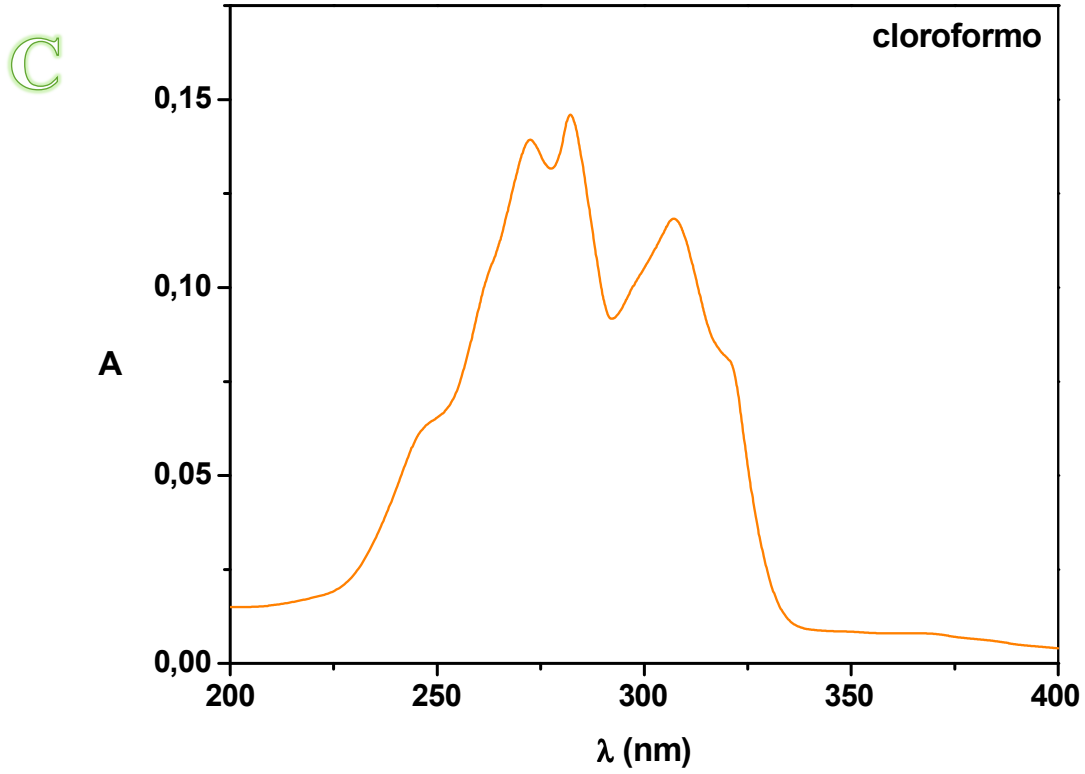
Se considera que el intervalo lineal comprende desde la menor concentración que puede medirse (LOQ) hasta la pérdida de la linealidad.

Es útil para este fin examinar visualmente la distribución de los residuos de la regresión: para un comportamiento lineal se espera que la distribución de los residuos sea al azar, y que la variabilidad interna de las réplicas a cada nivel de concentración sea comparable a la variabilidad global.

## *Solvatocromismo de la warfarina*

Dada la estructura molecular de la warfarina (Capítulo I, Figura 5), pueden observarse cambios en los espectros de absorción en función del pH o disolvente utilizado. A fin de tener en cuenta los efectos solvatoacrómicos, se realizaron los espectros de absorción de la warfarina a distintos pH (Figura A,  $[war] = 6,00 \times 10^{-5} M$ ), en 20 % v/v de metanol (Figura B,  $[war] = 1,00 \times 10^{-5} M$ ) y en cloroformo (Figura C,  $[war] = 1,00 \times 10^{-5} M$ ) –disolventes utilizados en el desarrollo de la tesis doctoral–.





Puede notarse, a partir de los espectros, que es importante definir bien las condiciones experimentales de medida y mantenerlas constantes a fin de no cometer errores.

---

## *Agradecimientos*

Quisiera comenzar los agradecimientos con una frase que considero se aplica a todos los ámbitos de la vida: “*Cosecharás tu siembra*”.

Este trabajo de tesis doctoral es el fruto de esa semilla de confianza que hace cinco años atrás *Cecilia* y *Liliana* depositaron en mí. Si hoy soy lo que soy científica y académicamente es gracias a esas dos personas maravillosas que me han enseñado muchísimo y me han acompañado y respetado en cada decisión que, equivocadamente o no, he tomado. Mi más sincero agradecimiento a mis directoras, hoy han cosechado un logro más.

A mi *familia* y *amigos*, gracias por hacer que este camino haya sido más fácil de transitar.

A *Roberta* y a todos los que forman parte del *LIDMA*, gracias por su compañerismo.

Hoy he podido alcanzar esta tan ansiada meta gracias a la presencia de ustedes y especialmente a la inestimable compañía de *Liliana* día a día, mi gran “*maestra*” desde hace ya casi nueve años.